

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

# Atividade antifúngica de actinomicetos frente a isolados de *Bipolaris sorokiniana*.

Cristina de Castro Spadari<sup>1\*</sup>, Sueli T. Van Der Sand (Or.)<sup>1</sup>

Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas na forma de Artigo Científico, a ser submetido para a Revista Brasileira de Biociências.

Porto Alegre, novembro 2010

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

\* autor para contato: E-mail: [spadaricris@gmail.com](mailto:spadaricris@gmail.com)

## RESUMO

*Bipolaris sorokiniana* é um fungo fitopatogênico do trigo e outras monocotiledôneas, que ocasiona moléstias como mancha marrom das folhas, podridão radicular e ponta preta dos grãos. Este fungo é capaz de sobreviver no solo ou em restos vegetais infectados sendo difícil eliminá-lo completamente das regiões agrícolas afetadas, assim, um sistema de controle do mesmo se faz necessário. Como o controle constante com fungicidas apresenta problemas ambientais e resistência do fitopatógeno, a utilização do controle biológico representa uma estratégia alternativa e com potencial. Bactérias do grupo dos actinomicetos são conhecidas por produzirem metabólitos secundários com grande potencial antibacteriano e antifúngico, assim, esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de 25 isolados de *Streptomyces* sp. frente a 10 isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*. O *Streptomyces* sp. com maior potencial antifúngico foi selecionado através do ensaio de dupla-camada. O ensaio de produção e otimização do composto antifúngico foi realizado utilizando os meios de cultura AC (amido caseína), ISP2 (4g extrato de levedura, 10g extrato de malte, 4g dextrose, água destilada para 1L), TSB (tripticaseína de soja) e Czapek-Dox. O isolado 1S inibiu 100% dos fungos no ensaio de dupla-camada, porém nas culturas líquidas não demonstrou a atividade fungicida esperada, possivelmente por estar presente em baixa concentração. Mais estudos devem ser realizados para encontrar as condições ideais para a produção do composto antifúngico do *Streptomyces* 1S.

**Palavras-chave:** controle biológico, *Streptomyces* sp., fitopatógenos.

## ABSTRACT

### **Antifungal activity of actinomycetes against *Bipolaris sorokiniana* isolates.**

*Bipolaris sorokiniana* is a phytopathogenic fungus of wheat and other winter cereals. This phytopathogen is responsible for different diseases like spot blotch, common root rot, and black point of the grain. This fungus can survive in the soil or on infected plant debris, so that it is difficult to eliminate them completely from affected regions. For this reason it is necessary to improve the control system of the pathogen. So far the control is done using fungicides, but it presents environmental problems caused by chemical control and the phytopathogen acquires resistance to the products. Taking in account these considerations, the use of biological control represents a useful strategy. It is well known that bacteria from the actinomycetes group produces secondary metabolites such as antibacterial and antifungal potential; thereby this study aims to evaluate the antifungal activity of 25 strains of *Streptomyces* sp. against 10 isolates of the fungus *Bipolaris sorokiniana*. The *Streptomyces* with greater antifungal activity was selected by means of the double-layer method. Afterwards the optimization of production was done using submerge culture. For this purpose, AC (starch and casein broth), ISP2, TSB (trypticasein soya broth) and Czapek-Dox.. Isolate 1S inhibited 100% of the fungus in the double-layer assay; however, it didn't show any fungicidal activity growing in submerge cultures. Further studies should be conducted to find the ideal conditions for producing the antifungal compound of strain *Streptomyces* 1S.

**Key-words:** Biological control, *Streptomyces*, phytopathogen.

## INTRODUÇÃO

*Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok) Shoemaker, teleomorfo: *Cochliobolus sativus* (Tto & Kuribayashi) Dredchs. ex Dastur. é um fungo fitopatogênico encontrado em todo o mundo, responsável por diferentes moléstias no trigo e outras monocotiledôneas (Bakonyi *et al.* 1997). Plantas com helmintosporiose apresentam sintomas como mancha marrom das folhas, podridão radicular e ponta preta dos grãos, mudas infectadas desenvolvem lesões necróticas marrom escuro nas raízes, coroas e bainhas. As infecções nas raízes e coroa podem ser tão graves que as plantas infectadas secam sem produzir sementes (Kumar *et al.* 2002, Asad *et al.* 2009). O trigo (*Triticum aestivum*) é uma das culturas mais afetadas pelo *B. sorokiniana*, sendo que os danos na produção podem variar de 20 a 80% (Duveiller & Gilchrist 1994, Kumar *et al.* 2007).

O controle desse fitopatógeno é difícil e caro, por ele infectar folhas, coroa, rizomas e raízes de espécies sensíveis e poder estar ativo em uma ou mais plantas em todo o período de crescimento (Salehpour *et al.* 2005), além de mostrar variabilidade morfológica, fisiológica e genética (Weikert-Oliveira *et al.* 2002, Müller *et al.* 2005, Poloni *et al.* 2009). As estratégias para o controle de *B. sorokiniana* incluem o tratamento de sementes, uso de fungicidas nas folhas, práticas de manejo do solo e resistência do hospedeiro (Matusinsky *et al.* 2010). No entanto, na agricultura são utilizados principalmente fungicidas químicos (Zhang & Yuen 1999, Khamna *et al.* 2009) que causam severos efeitos negativos como o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos agentes aplicados e seus impactos ambientais não-alvo (Gerhardson 2002, Compant *et al.* 2005), além de estarem associados a custos elevados (Zhang & Yuen 1999, Kumar *et al.* 2007). Desta forma, o controle biológico com microrganismos está sendo considerado como uma alternativa ou uma forma complementar

de redução do uso de produtos químicos na agricultura (Gerhardson 2002, Compant *et al.* 2005, Khamna *et al.* 2009).

Sabe-se que os actinomicetos são um grupo promissor de microrganismos capazes de produzir metabólitos bioativos (Bachiega *et al.* 2005). Os actinomicetos estão, naturalmente presentes no solo e, quando testados *in vitro*, cepas do gênero *Streptomyces* têm mostrado um grande potencial para produzir antibióticos que reduzem ou inibem o crescimento e desenvolvimento de patógenos de plantas comuns no solo (Bressan & Figueiredo 2008). Várias espécies da família Streptomycetaceae têm sido amplamente estudadas devido à capacidade de produzir metabólitos secundários, como antibióticos, enzimas extracelulares entre outros (Soares *et al.* 2009).

Deste modo, esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de 25 isolados de *Streptomyces* sp. isolados de processo de compostagem frente a dez isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Isolados**

Para esse estudo, foram utilizados dez isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*, sendo sete isolados oriundos de regiões do Brasil e três de outras regiões do mundo (Tab. 1). Os 25 isolados de *Streptomyces* utilizados tiveram origem em composto de processo de compostagem. Todos os microrganismos utilizados pertenciam à coleção de microrganismos do laboratório de bacteriologia e micologia ambiental da UFRGS.

Os isolados fúngicos foram mantidos em ágar batata dextrose (BDA) e estocados a 4°C e os isolados de *Streptomyces* foram estocados em meio ágar amido caseína (ACA - 10g

amido, 0,3g caseína, 2g KNO<sub>3</sub>, 2g NaCl, 2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05g MgSO<sub>4</sub>, 0,02g CaCO<sub>3</sub>, 0,01g FeSO<sub>4</sub>, 15g ágar, água destilada para completar 1L) e mantidos a 4°C.

### **Avaliação de patogenicidade**

Os isolados de *B. sorokiniana* foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar cenoura (20g cenoura, 20g ágar, água destilada para completar 1L) e incubados a 28° C por 10 dias. Em seguida, adicionou-se 4mL de solução salina estéril (0,85%) e tween 80 (0,01%) e com auxílio de uma alça de Drigalski removeu-se os esporos da cultura. A suspensão foi acondicionada em tubo de ensaio e diluições foram realizadas para a obtenção de uma suspensão com  $1 \times 10^7$  esporos/mL. A concentração foi ajustada através da contagem de conídios em câmara de Neubauer.

Sementes de trigo foram submetidas à desinfestação utilizando-se álcool 70% (1min), hipoclorito 2,5% (1min) e três lavagens em água destilada estéril. Posteriormente, 100 sementes foram colocadas em cada tubo contendo a suspensão de esporos previamente ajustada, por 24 horas. Após esse período, as sementes foram distribuídas em quatro repetições de 25 sementes sobre papel filtro, previamente umedecido com água destilada estéril. Os mesmos foram enrolados e incubados em BOD a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas (12h luz/12h escuro). No décimo dia, após a infestação, foi avaliado o número de sementes germinadas e não germinadas, com lesão de colmo, lesão da folha e podridão da semente.

### **Avaliação da atividade antifúngica**

A atividade antifúngica dos isolados de actinomicetos foi determinada através do método de dupla-camada. Os isolados de *Streptomyces* foram inoculados por picada em placas contendo meio de cultura ACA e incubados por dez dias a 30°C. Os isolados do fungo

foram inoculados em meio de cultura BDA e incubados por sete dias a 28°C. Sempre tendo cuidado para que os períodos de incubação terminassem juntos. Os fungos crescidos foram usados para preparar a suspensão de esporos, conforme Carissimi (2009). Foram colocados 3mL de solução salina (0,85%) estéril sobre as colônias e com o auxílio de uma alça de Drigalski os esporos foram removidos e esta mistura transferida para tubos de vidro estéreis. A concentração final de esporos foi ajustada para  $5 \times 10^4$  esporos/mL, através da contagem de conídios em câmara de Neubauer. Dessa suspensão, 1mL foi homogeneizada com 9mL de meio BDA liquefeito e essa mistura foi vertida sobre as placas contendo os *Streptomyces* crescidos. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28°C por cinco dias. Após o período de incubação, observou-se a presença ou ausência de halos de inibição.

### **Produção de extratos**

O microrganismo que demonstrou potencial antifúngico frente aos isolados de *B. sorokiniana* no ensaio de dupla-camada foi selecionado para produção e otimização do composto. Primeiramente, foram utilizados como substrato os caldos AC, ISP2 (4g extrato de levedura, 10g extrato de malte, 4g dextrose, água destilada para 1L), TSB (caldo tripticaseína de soja) e Czapek-Dox (30g sacarose, 2g NaNO<sub>3</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>, 0,5g KCl, 0,01g FeSO<sub>4</sub>, água destilada para 1L). O extrato foi produzido em duas etapas: o pré-inóculo, no qual o isolado de *Streptomyces* foi inoculado em 50mL de cada meio de cultura e incubado por 48 horas a uma temperatura de 30°C com rotação constante de 100rpm. Posteriormente, uma alíquota de 5mL do pré-inóculo foi transferida para frascos de 250mL contendo 50mL de meio. As culturas foram crescidas por sete dias e a cada 24 horas foi retirada uma amostra, o mesmo experimento foi repetido para os meios AC e ISP2 e as amostras coletadas a cada 12h por 72h. As amostras de extratos foram esterilizadas através do sistema de filtração com bomba de vácuo, utilizando membrana 0,22µm.

### **Atividade antifúngica dos extratos**

A atividade antifúngica dos extratos foi testada através do método de difusão em poço em placas de Petri contendo 20mL de meio BDA, onde foi semeada a suspensão de esporos ( $5 \times 10^4$  esporos/mL) dos isolados de *B. sorokiniana*. Em seguida, foram feitos poços de 9mm de diâmetro no meio de cultura e em cada um deles foi colocado 100 $\mu$ L de cada extrato. As placas foram colocadas sob refrigeração por 16 horas para ocorrer a difusão dos metabólitos no meio de cultura. Após esse período, as placas foram incubadas a 28° C por cinco dias. A análise do resultado foi realizada através da observação dos halos de inibição a partir do segundo dia de incubação.

### **Ensaio de antagonismo direto**

No ensaio de antagonismo, foi analisado o *Streptomyces* selecionado contra os isolados de *B. sorokiniana*. Foram utilizadas placas contendo meio ACA e meio ISP2. O isolado de *Streptomyces* selecionado anteriormente foi repicado em uma extremidade da placa de Petri e o isolado fúngico na extremidade oposta. As placas foram incubadas a 28° C por um período de sete dias. Ao término desse período, foi avaliado o efeito antifúngico do isolado de *Streptomyces*.

## **RESULTADOS**

### **Avaliação de patogenicidade**

Os dez isolados de *Bipolaris sorokiniana* utilizados neste estudo apresentaram-se patogênicos. Todos promoveram os sintomas de helmintosporiose, tendo sido avaliados a podridão das sementes, a mancha marrom das folhas e dos colmos, assim como a quantidade de sementes que germinou ou não (Tab. 2).



### **Avaliação da atividade antifúngica**

A atividade antifúngica dos 25 isolados de *Streptomyces* foi testada em duplicata através do método da dupla-camada. Neste ensaio foi possível observar que o isolado *Streptomyces* 1S foi 100% eficiente contra as amostras do fungo *B. Sorokiniana* testadas (Fig. 1). O isolado 6S mostrou atividade antifúngica apenas contra um isolado fúngico, o BS18M2, os demais isolados de *Streptomyces* não apresentaram atividade contra os fitopatógenos (Tab. 3).

### **Atividade antifúngica dos extratos**

Os diferentes extratos produzidos com o *Streptomyces* 1S quando cultivados em cultura submersa nos meios de cultura AC, ISP2, TSB e Czapek-Dox, foram testados através do método de difusão em poço. Os extratos produzidos a partir do cultivo nos quatro meios de cultura não apresentaram atividade inibitória com nenhum dos isolados de *B. sorokiniana* como foi observado no método de dupla-camada. Este resultado foi observado para todos os extratos produzidos.

### **Ensaio de antagonismo direto**

Quando realizado o ensaio de antagonismo entre o *Streptomyces* 1S e os dez isolados de *B. sorokiniana*, os resultados foram promissores. Os ensaios realizados no meio ISP2 demonstraram um efeito fungistático, onde o isolado 1S conseguiu inibir os isolados fúngicos por um curto período de tempo, e nas placas contendo meio ACA foi observada a atividade fungicida do *Streptomyces* 1S (Fig. 2).

## **DISCUSSÃO**

A preservação de fungos fitopatogênicos por longos períodos pode levar os isolados a perderem as suas características originais, como esporulação e patogenicidade (Bueno *et al.* 2006). Com o ensaio de avaliação da patogenicidade dos isolados de *B. sorokiniana* foi possível validar as amostras analisadas neste estudo, pois todas se mostraram patogênicas mesmo estando armazenadas em meios de cultura no laboratório, já por um longo período. Os resultados observados permitem inferir que os isolados utilizados no estudo mantêm as características de patogenicidade observadas em fungos recém isolados e/ou encontrados no ambiente.

Os *Streptomyces* são microrganismos conhecidos por produzirem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Diferentes trabalhos descrevem espécies de *Streptomyces* com capacidade de inibir fungos fitopatogênicos (Harindran *et al.* 1999, Lee & Hwang 2002, Taechowisan *et al.* 2005, Shi *et al.* 2010). Desta forma, o *Streptomyces* 1S é um microrganismo com potencial para ser usado no controle biológico do fitopatógeno em questão, pois se mostrou eficiente no ensaio de antagonismo *in vitro*, produzindo halos de inibição. Além disso, já estão disponíveis comercialmente produtos para biocontrole (Mycostop, Actinovate e ActinoIron) de fitopatógenos como *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Botrytis* sp e *Phytophthora* sp., que são constituídos por esporos de *Streptomyces*, indicando a aceitação deste gênero para o controle biológico (Hamdali *et al.* 2008, Oliveira *et al.* 2010).

O estudo de Nascimento & Van Der Sand (2008) analisou o polimorfismo das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de 57 isolados de *B. sorokiniana*. Os dez isolados utilizados no presente estudo estão entre os avaliados por eles. Conforme resultados obtidos no trabalho de polimorfismo, foi possível observar que o isolado BS18M2 mostrou baixa similaridade com os demais isolados utilizados no estudo. Sendo esta uma possível explicação para que o *Streptomyces* 6S tenha conseguido inibir apenas o isolado BS18M2.

Após a seleção do isolado com potencial antifúngico, foram produzidos diferentes extratos com o isolado *Streptomyces* 1S e estes foram testados através do método de difusão em poço. Porém, nestes ensaios, não foi detectada a atividade antifúngica observada no ensaio de dupla-camada. Muitos estudos mostram que a produção de antibióticos ocorre melhor em meios sólidos do que nas culturas líquidas, podendo a atividade diminuir ou deixar de ser exibida. Thakur *et al.* (2007) em seu estudo viu que dos seus 65 isolados com atividade em meio sólido 15 não exibiram atividade em meio líquido. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores. (Salamoni *et al.* 2010, Oliveira *et al.* 2010, Badji *et al.* 2005, Anibou *et al.* 2008).

Existem algumas alternativas para explicar o resultado observado: o composto pode estar se degradando rapidamente em meio líquido; o isolado 1S parou de produzir o possível composto antifúngico; os extratos estão muito diluídos e não se consegue obter a atividade desejada. Primeiramente, foi realizado o ensaio de difusão em poço utilizando os extratos produzidos em intervalos a cada 24h, os quais tiveram resultados negativos. Em seguida, foram feitos os extratos coletados a cada 12h de amostragem, com a intenção de obter o composto antifúngico antes da possível degradação deste. Mas, como os resultados também se mostraram negativos, não se pode afirmar esta alternativa como uma explicação para os dados obtidos neste estudo.

Diferente da maioria das bactérias, os *Streptomyces* possuem DNA linear. Eles, assim como outros actinomicetos, apresentam uma forma característica de instabilidade genética. Várias características, como a produção de antibióticos, são irreversivelmente perdidas em uma frequência de 0,1 a 1% na progênie de colônias em meio de cultura. A perda de função é resultado de deleções de grandes regiões do DNA (Lancini & Lorenzetti 1993, Inoue 2006). Desta forma, o isolado 1S poderia ter perdido a região de seu cromossomo responsável pela atividade antifúngica. Esta alternativa foi refutada pelo ensaio de antagonismo direto, o qual

mostrou que o *Streptomyces* 1S ainda tem atividade antifúngica frente aos isolados de *B. sorokiniana*.

A ocorrência dos halos de inibição nos ensaios *in vitro* depende do nível de difusão do composto, o que ocorre melhor em meio sólido. No crescimento em meio líquido, essa difusão é mais difícil e a detecção dos compostos requer uma concentração muito maior. Este fato fortalece a última hipótese para explicar os resultados obtidos com o isolado 1S, sugerindo que o composto pode estar muito diluído na cultura líquida e por isso não estaria demonstrando a atividade antifúngica.

Mais estudos devem ser realizados para encontrar o meio de cultura, a temperatura e o pH ideais para a produção do composto antifúngico do isolado 1S antes de descartar a possibilidade de que este isolado *Streptomyces* possa realmente ser eficiente contra o fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Dra. Sueli T. Van Der Sand, a todos os colegas dos laboratórios 209 e 164, aos meus pais e ao Luis por todo apoio que me deram. Muito obrigada a todos.

## **REFERÊNCIAS**

ANIBOU, M., CHAIT, A., ZYAD, A., TAOIRIRT, M., OUHDOUCH, Y. & BENHERREF, A. 2008. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2019-2025.

- ASAD, S., IFTIKHAR, S., MUNIR, A. & AHMAD, I. 2009. Characterization of *Bipolaris sorokiniana* isolated from different agro-ecological zones of wheat production in Pakistan. *Pak. J. Bot.* 41(1): 301-308.
- BACHIEGA, G. L., VILEGAS, W. & UJIKAWA, K. 2005. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. *Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 26(1): 29-37.
- BADJI, B., RIBA, A., MATHIEU, F., LEBRIHI, A. & SABAOU, N. 2005. Antifungal activity of a saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *Journal de Mycologie Médicale* 15: 211-219.
- BAKONYI, J., APONYI, I. & FISCHL, G. 1997. Diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici repentis* in Hungary. In: *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot* (Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. and McNab A., eds). Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, 80-85.
- BRESSAN, W. & FIGUEIREDO, J. E. 2008. Efficacy and dose-response relationship in biocontrol of *Fusarium* disease in maize by *Streptomyces* spp. *Eur J Plant Pathol* 120: 311–316.
- BUENO, C. J., AMBRÓSIO, M. M. Q. & SOUZA, N. L. 2006. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. *Summa Phytopathologica*.32(1): 42-50.
- CARISSIMI, M., GIRAUDO, M. S., GERMANI, J. C., VAN DER SAND, S. T. 2009. Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris sorokiniana*. *Biociências Porto Alegre* 17(1): 48-58.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT, C. & BARCA, E. A. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 4951-4959.

- DUVEILLER, E. & GILCHRIST, L. 1994. Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: current situation and future prospects. In: Saunders DA, Hettel GP (eds) Wheat in heatstressed environments: irrigated, dry areas and rice-wheat farming systems, Mexico, D.F., Mexico: CIMMYT, 343–352.
- GERHARDSON, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20: 338–343.
- HAMDALI, H., HAFIDI, M., VIROLLE, M. J. & OUHDOUCH, Y. 2008. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Applied soil ecology* 40: 510-517.
- HARINDRAN, J., GUPTA, T. E. & NAIK, S. R. 1999. HA-1-92, A new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* CDRIL-312: Fermentation, isolation, purification and biological activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 425-430.
- INOUE, O. O. 2006. *Influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de retramicina por Streptomyces olindensis ICB20*. Tese (doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- KHAMNA, S., YOKOTA, A., PEBERDY, J. F. & LUMYONG, S. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology* 6(3): 143-147.
- KUMAR, D., CHAND, R., PRASAD, L. C. & JOSHI, A. K. 2007. A new technique for monoconidial culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris sorokiniana*, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1647-1651.
- KUMAR, J., SCHAFER, P., HUCKELHOVEN, R., LANGEN, G., BALTRUSCHAT, H., STEIN, E., NAGARAJAN, S. & KOGEL, K. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal

- pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3(4): 185-195.
- LANCINI, G. & LORENZETTI, R. 1993. *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites*. New York, Plenum Press. p. 19-131.
- LEE, J. Y. & HWANG, B. K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48: 407-417.
- MATUSINSKY, P., FREI, P., MIKOLASOVA, R., SVACINOVA, I. TVARUZEK, L. & SPITZER, T. 2010. Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. *Crop Protection* <DOI:10.1016/j.cropro.2010.07.013>
- MÜLLER, M. V.G., GERMANI, J. C., VAN DER SAND, S. T. 2005. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Genetics and Molecular Research* 4(4): 642–652.
- NASCIMENTO, E. J. & VAN DER SAND, S. T. 2008. Restriction analysis of amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *World Microbiol Biotechnol* 24: 647-652.
- OLIVEIRA, M F. de., SILVA, M. S. & VAN DER SAND, S. T. 2010. Anti-phytopathogen potencial of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology* xx: 1-8.
- POLONI, A., PESSI, I. S., FRAZZON, A. P. G. & VAN DER SAND, S. T. 2009. Vegetative Incompatibility Among Monoconidial Isolates of *Bipolaris sorokiniana*. *Curr Microbiol* 58: 153-158.
- SALAMONI, S. P., MANN, M. B., CAMPOS, F. S., FRANCO, A., GERMANI, J. C. & VAN DER SAND, S. T. 2010. Preliminary characterization of some *Streptomyces*

- species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World J. Microbiol Biotechnol* <DOI 10.1007/s11274-010-0366-y>
- SALEHPOUR, M., ETEBARIAN, H. R., ROUSTAEI, A. & AMINIAN, H. 2005. Biological Control of Common Root Rot of Wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* Isolates. *Plant Pathology Journal* 4(1): 85-90.
- SHI, P., YAO, G., YAHG, P., LI, N., LUO, H., BAI, Y., WANG, Y. & YAO, B. 2010. Cloning, characterization, and antifungal activity of an endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Streptomyces* sp. S27. *Microbiol Biotechnol* 85: 1483-1490.
- SOARES, A. F., SOUSA, C. S. & GARRIDO, M. S. 2009. Streptomyces antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporium* f.sp. lycopersici. *Ciência Rural* 39(6): 1897-1900
- TAECHOWISAN, T., LU, C., SHEN, Y. & LUMYONG, S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151: 1691-1695.
- THAKUR, D., YADAV, A., GOGOI, B. K. & BORA, T. C. 2007. Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale* 17: 242-249.
- WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B., RESENDE, M. A., VALÉRIO, H. M., CALIGIORNE, R. B. & PAIVA, E. 2002. Genetic variation among pathogens causing "Helminthosporium" diseases of rice, maize and wheat. *Fitopatologia Brasileira* 27: 639-643.
- ZHANG, Z. & YUEN, G. Y. 1999. Biological Control of *Bipolaris sorokiniana* on tall Fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3. *Phytopathology* 90(4): 384-389.



## LEGENDAS

Figura 1 – Presença de halos de inibição produzidos pelo *Streptomyces* 1S no ensaio da dupla camada. (A) isolado 98007, (B) isolado 1965.

Figura 2 – Atividade fungicida observada no ensaio de antagonismo direto em meio ACA. (A) isolado 98010, (B) isolado CF02-01.

Tabela 1. Origem dos isolados de *B. sorokiniana* utilizados no estudo.

Tabela 2. Resultados obtidos no ensaio de avaliação da patogenicidade dos isolados de *B. sorokiniana*.

Tabela 3. Resultados da avaliação da atividade antifúngica através do método de dupla-camada.

## FIGURAS E TABELAS

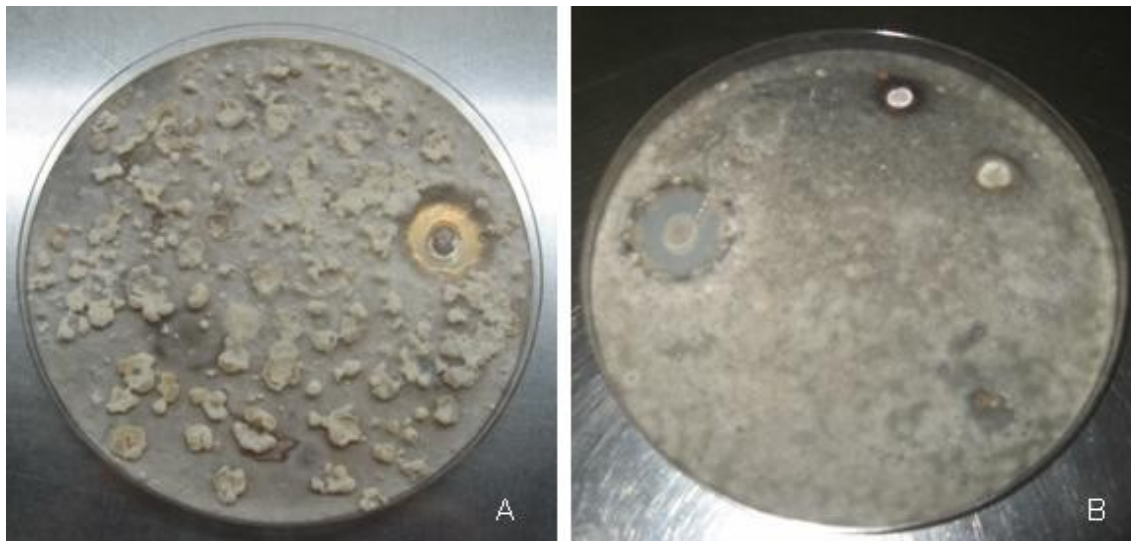


Figura 1 – Presença de halos de inibição produzidos pelo *Streptomyces* 1S no ensaio da dupla camada. (A) isolado 98007, (B) isolado 1965.

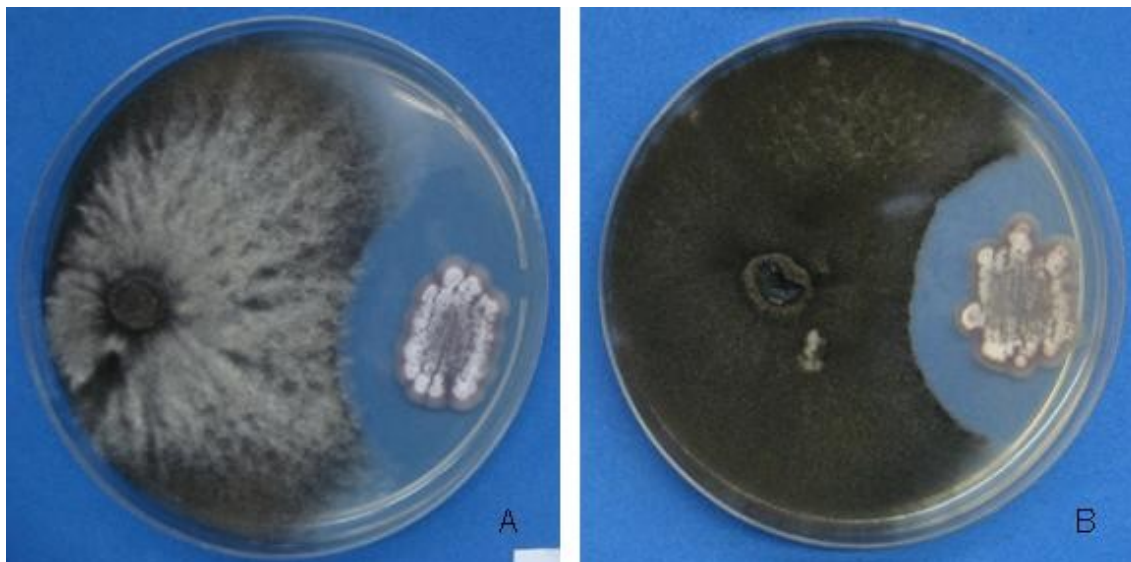


Figura 2 – Atividade fungicida observada no ensaio de antagonismo direto em meio ACA. (A) isolado 98010, (B) isolado CF02-01.

Tabela 1. Origem dos isolados de *B. sorokiniana* utilizados no estudo.

Isolado	Origem
98003	Pelotas-RS
98007	Cruz Alta-RS
98010	Santa Rosa-RS
98011	Lagoa Vermelha-RS
98012	Lagoa Vermelha-RS
98025	Piratini-RS
98028	Pelotas-RS
BS18M2	Veracruz - México
CF02-01	África do Sul
1965	Copenhague-Dinamarca

Tabela 2. Resultados obtidos no ensaio de avaliação da patogenicidade dos isolados de *B. sorokiniana*.

Isolados	Sementes não germinadas	Sementes germinadas	Lesão na folha	Lesão no colmo	Podridão da semente
Controle	30 %	70 %	0,75 %	3,25 %	11,50 %
98003	78 %	22 %	77 %	73 %	100 %
98007	72 %	28 %	100 %	100 %	100 %
98010	65 %	35 %	63 %	80 %	99 %
98011	44 %	56 %	38 %	64 %	65 %
98012	56 %	44 %	54 %	86 %	100 %
98025	48 %	52 %	58 %	56 %	94 %
98028	82 %	18 %	72 %	100 %	100 %
BS18M2	72 %	28 %	75 %	100 %	100 %
CF02-01	64 %	36 %	44 %	89 %	100 %
1965	57 %	43 %	79 %	98 %	91 %

Tabela 3. Resultados da avaliação da atividade antifúngica através do método de dupla-camada.

	9800 3	9800 7	9801 0	9801 1	9801 2	9802 5	9802 8	BS18M 2	CF020 1	1965
AP	-		-	-	-	-	-	-	-	-
1S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ presença de halo de inibição, - ausência de halo de inibição.