

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Bipolaris sorokiniana*
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE TRIGO DE ISOLADOS
DE *Streptomyces* sp.**

PRISCILA MONTEIRO PEREIRA

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre

Março/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Bipolaris sorokiniana* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE TRIGO DE ISOLADOS DE *Streptomyces* sp.

Priscila Monteiro Pereira
Bacharel em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia - UERGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Março/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Priscila Monteiro

Avaliação da atividade antifúngica sobre *Bipolaris sorokiniana* e promoção de crescimento em plantas de trigo de isolados de *Streptomyces* sp. / Priscila Monteiro Pereira. -- 2017.

59 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Actinobactéria. 2. *Bipolaris sorokiniana*. 3. Biocontrole. 4. Promoção de crescimento. 5. Trigo. I. Van Der Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Deus que me dá forças para enfrentar as dificuldades e superar os desafios.

À minha família por sempre apoiar meus estudos, reconhecer todo o esforço e por ser de fato a minha grande riqueza.

Ao meu esposo Tiago pelo amor, compreensão e companheirismo. Por sempre me animar nos momentos em que nem tudo saía como previsto.

À minha orientadora Sueli Van Der Sand pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança e amizade nestes dois anos de trabalho e aprendizado.

Ao professor Marcelo Gravina de Moraes do Departamento de Fitossanidade – Agronomia/UFRGS por disponibilizar o espaço de seu laboratório e casa de vegetação para realização dos ensaios. Juntamente a ele, agradeço muito as técnicas Priscila e Helana por toda ajuda prestada sempre com muita disposição.

Ao grande grupo do laboratório – Luciana, Graci, Jussara, Themis, Mari, Marcela, João, Ana Elisa, Juliane, por todas as horas de alegria e descontração, pelo apoio e torcida para que todos os trabalhos tivessem sucesso em suas realizações. Enfim, foi muito prazeroso ter a companhia de vocês nas muitas horas dedicadas dentro do laboratório.

A todos os professores e técnicos do Programa de Pós-Graduação os quais contribuíram para o nosso aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

A todos, os meus sinceros agradecimentos!

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Bipolaris sorokiniana* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE TRIGO DE ISOLADOS DE *Streptomyces* sp.¹

Autor: Priscila Monteiro Pereira

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

Os isolados *Streptomyces* sp. R18(6) e 6(4) foram avaliados quanto à sua capacidade de controlar a mancha marrom e podridão comum de raiz, causados por *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo. A atividade antifúngica desses isolados foi testada usando os ensaios de dupla camada e pareamento de cultura à 28°C. A atividade fisiológica e enzimática foi avaliada através de ensaios de sideróforo, ácido indol-3-acético, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. O controle biológico da doença e a eficiência de crescimento das plantas de trigo foram avaliados utilizando ensaios *in vivo* em casa de vegetação. Nos ensaios de pareamento de cultura, ambos os isolados inibiram o crescimento micelial de *B. sorokiniana*, enquanto na dupla camada apenas o isolado R18(6) inibiu. *Streptomyces* sp. 6(4) produziu auxina, sideróforos, fixou nitrogênio e solubilizou fosfato, enquanto R18(6) não produziu sideróforos. Nos ensaios em casa de vegetação, o isolado R18(6) mostrou diferenças estatísticas na massa seca da parte aérea e na massa seca de raiz em comparação com a do isolado 6(4) na presença do fitopatógeno ($P \leq 0,05$). Estes resultados foram mais evidentes quando a temperatura foi maior. Na ausência do fitopatógeno, o isolado 6(4) aumentou a massa seca de raiz em comparação com a do controle durante o mesmo período. Portanto, esses isolados apresentaram potencial em controlar a podridão das raízes e mancha marrom e podem promover o crescimento das plantas de trigo.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (59 p.) Março, 2017.

**EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Streptomyces* sp. ON
Bipolaris sorokiniana AND EVALUATION OF GROWTH PROMOTION IN
WHEAT PLANTS¹**

Author: Priscila Monteiro Pereira

Advisor: Prof.^a. Dr.^a. Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

Streptomyces sp. R18(6) and 6(4) strains were evaluated for their ability to control brown spot and common root rot caused by *Bipolaris sorokiniana* in wheat crops. The antifungal activity of these isolates was tested using a double-layer assay and culture pairing at 28 °C. Physiological and enzymatic activity were evaluated through siderophore, indole-3-acetic acid, nitrogen fixation and phosphate solubilization assays. The biocontrol of the disease and growth-promoting efficiency of wheat seedlings were assessed using *in vivo* assays in greenhouse. In the culture pairing assays, both strains inhibited *B. sorokiniana* mycelial growth, while in the double-layer only R18(6). *Streptomyces* sp. 6(4) produced auxin, siderophores, fixed nitrogen and solubilized phosphate, whereas R18(6) did not produce siderophores. In the greenhouse assays, strain R18 (6) showed statistical differences in shoot dry mass and root dry mass compared with those of strain 6(4) in the presence of the phytopathogen ($P \leq 0.05$). These results were more evident when the temperature was higher. In the absence of the phytopathogen, strain 6(4) increased the root dry mass compared with that of the control during the same period. Therefore, these isolates can potentially control root rot and brown spotting and may promote the growth of wheat plants.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (59 p.) March, 2017.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral.....	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	Cultivo do Trigo	3
3.2	Doenças e sintomas	3
3.2.1	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	5
3.2.2	Formas de controle da doença	7
3.3	Controle Biológico	7
3.4	Controle Biológico e Actinobactérias	8
3.5	Promoção de Crescimento Vegetal e Actinobactérias.....	10
4.	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Origem dos microrganismos.....	12
4.2	Produção do inóculo fúngico	12
4.3	Avaliação do potencial antifúngico dos isolados de actinobactéria frente aos isolados de <i>B. sorokiniana</i>	13
4.4	Teste de sanidade e germinação das sementes de trigo	14
4.5	Teste de patogenicidade de <i>B. sorokiniana</i> em sementes de trigo ...	14
4.6	Caracterização fenotípica dos isolados R18(6) e 6(4).....	15
4.6.1	Solubilização de Fosfato.....	15
4.6.2	Produção de Sideróforos.....	15
4.6.3	Produção de Auxinas	15
4.6.4	Fixação de Nitrogênio.....	16
4.7	Avaliação da atividade antifúngica e promotora de crescimento, <i>in vivo</i> , dos microrganismos endofíticos.....	16
4.7.1	Infestação das sementes.....	16
4.7.2	Colonização <i>in vitro</i> de raízes de plântulas de trigo pelos isolados <i>Streptomyces</i>	17
4.7.3	Ensaio em casa de vegetação.....	17
4.7.4	Análise estatística.....	19

4.7.5	Avaliação da severidade da mancha marrom nas folhas de trigo	19
4.7.6	Observação da colonização das raízes de trigo tratadas com os isolados de <i>Streptomyces</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura	20
5.	RESULTADOS	21
5.1	Avaliação do potencial antifúngico dos isolados de actinobactéria frente aos isolados de <i>B. sorokiniana</i>	21
5.2	Teste de sanidade e germinação de sementes de trigo	22
5.3	Teste de patogenicidade de <i>B.sorokiniana</i> em sementes de trigo	23
5.4	Caracterização fenotípica dos isolados de actinobactéria	24
5.5	Colonização <i>in vitro</i> de raízes de plântulas de trigo pelos isolados de <i>Streptomyces</i> R18(6) e 6(4)	26
5.6	Ensaio em casa de vegetação.....	26
5.6.1	Avaliação da promoção de crescimento	26
5.6.2	Avaliação da severidade da mancha marrom e podridão da raiz nas plantas de trigo	29
5.6.3	Visualização de amostras de raiz de trigo em MEV	31
6.	DISCUSSÃO	32
7.	CONCLUSÃO	36
8.	REFERÊNCIAS	37
9.	ANEXOS	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de antibiose do isolado <i>Streptomyces</i> R18(6) contra três isolados de <i>B. sorokiniana</i> usando o ensaio de dupla camada.	22
Tabela 2: Incidência dos sintomas causados por <i>B. sorokiniana</i> em sementes e plântulas de trigo.	23
Tabela 3: Solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de sideróforo dos isolados de actinobactéria.	24
Tabela 4: Média da massa seca da parte aérea e altura para cada tratamento nos períodos de abril-junho e junho-agosto.	27
Tabela 5: Média da massa seca e comprimento de raiz para cada tratamento nos períodos de abril-junho e junho-agosto.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala de classificação de Helmintosporiose de acordo com Fetch e Steffenson (1999).....	5
Figura 2: Escala de classificação da severidade da mancha marrom baseada na escala modelo de Fetch Steffenson (1999).....	20
Figura 3: Ensaio da dupla camada ilustrando os halos de inibição formados pelo isolado R18(6) frente a três isolados de <i>B. sorokiniana</i> após sete dias de incubação a 28°C.....	21
Figura 4: Inibição do crescimento radial de <i>B. sorokiniana</i> frente aos isolados 6(4) e R18(6) em meio BDA, após dez dias de incubação a 28°C.....	22
Figura 5: Produção de sideróforos pelos isolados de <i>Streptomyces</i> sp.	24
Figura 6: Concentrações de auxina em µg/mL produzido pelos isolados de <i>Streptomyces</i> R18(6) e 6(4) durante 264 horas de incubação em 28°C.	25
Figura 7: Colonização das raízes de trigo por isolados de <i>Streptomyces</i> sp. ...	26
Figura 8: Respostas das plantas de trigo à infestação com os isolados de <i>Streptomyces</i> R18(6) e 6(4) e aspersão de <i>B. sorokiniana</i> 98004.....	29
Figura 9: Efeito da infestação dos isolados <i>Streptomyces</i> R18(6) e 6(4) na proteção de raízes de plantas de trigo.	30
Figura 10: Microscopia Eletrônica de Varredura.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Ágar Caseína Amido
AIA	Ácido Indol-Acético
BDA	Batata Dextrose Ágar
BDMEP	Banco de Dados Metrológicos para Ensino e Pesquisa
BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
°C	Graus Celsius
CAS	Chromazurool S
c.v	Cultivar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fepagro	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
IA	Índice de Antibiose
IR	Resposta da Infecção
kV	Quilovolts
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
mm	Milímetros
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µg	Micrograma
µL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo com significativo peso na economia agrícola global (MAPA, 2016). No Brasil, o sul do país é o principal produtor deste cereal, entretanto a demanda é maior do que a produção forçando o país a importar grande quantidade deste produto. Além disto, fungos fitopatogênicos, como *Bipolaris sorokiniana*, podem causar elevados danos à cultura. Este fungo é o agente causal da podridão da semente, podridão comum de raiz e ainda afeta a parte aérea da planta resultando na mancha marrom. Estas doenças podem ser um desafio aos agricultores para manter a produção deste cereal.

O uso de agrotóxicos ainda tem sido uma das alternativas mais empregadas para controle de *Bipolaris sorokiniana* na cultura do trigo. Porém, cada vez mais se discute que o uso desses produtos causa efeitos negativos aos organismos não alvos, desequilíbrio ecológico, além do aumento do custo de produção da cultura. Estudos sobre formas de biocontrole revelam que esta técnica é uma alternativa efetiva ao uso dos produtos químicos além de ser menos agressivo ao meio ambiente e economicamente viável para o produtor.

As actinobactérias são microrganismos conhecidos pela sua capacidade de produzir diferentes compostos bioativos. Estes compostos têm sido empregados em vários campos como: indústria farmacêutica, veterinária e agricultura. Algumas actinobactérias tem a capacidade de crescer na rizosfera mostrando potencial para o seu uso como agentes de controle biológico. As actinobactérias podem ainda influenciar diretamente no crescimento vegetal produzindo fitormônios. O número de novos metabólitos secundários continua a aumentar em pesquisas científicas, indicando que espécies do gênero *Streptomyces* produzem grande parte destes compostos. Portanto, diferentes trabalhos sugerem que há uma grande vantagem na utilização de actinobactérias, em especial espécies de *Streptomyces*, no biocontrole de fitopatógenos em diversas culturas.

Os isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4), isolados endofíticos de tomateiro, foram testados em trabalhos anteriores (Oliveira et al., 2010; Minotto

et al., 2016) mostrando ação antifúngica contra *B. sorokiniana*. O presente trabalho buscou verificar esta capacidade em experimentos *in vivo* em plantas de trigo e também se avaliou a influência destes isolados no crescimento destas plantas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de dois isolados de actinobactéria em controlar a mancha marrom e podridão comum da raiz, bem como promover o crescimento das plantas de trigo em condições de casa de vegetação.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Verificar a atividade antifúngica dos isolados de actinobactérias frente ao patógeno pelo ensaio de dupla camada e cultura pareada;

2.2.2 Caracterização fenotípica dos isolados de actinobactéria;

2.2.3 Avaliar a colonização das raízes de plântula de trigo *in vitro* e *in vivo* dos isolados de actinobactéria;

2.2.4 Avaliar o potencial dos isolados de actinobactéria como agente do biocontrole da mancha marrom e podridão da raiz em ensaios *in vivo* em casa de vegetação;

2.2.5 Avaliar a capacidade destes isolados em promover o crescimento da planta de trigo em casa de vegetação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cultivo do Trigo

O cultivo e a utilização do trigo (*Triticum aestivum* L.) como alimento humano datam de mais de seis mil anos. Durante esse longo período, novas cultivares foram desenvolvidas, assim como novos produtos derivados foram sendo introduzidos na alimentação. O trigo é importante na dieta alimentar da maioria das nações (BNDES, 2016) ocupando o segundo lugar do cereal mais produzido no mundo. O trigo tem uma importância significativa na economia agrícola global (MAPA, 2016).

O trigo é uma gramínea de ciclo anual cultivada durante o inverno, consumida em forma de farinha ou ração animal. No Brasil, a produção anual oscila próxima a seis milhões de toneladas, com o cultivo do trigo nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A demanda brasileira se mantém em 10 milhões de toneladas sendo que o Sul do país o que concentra 90% da produção (Embrapa Trigo, 2016).

O cultivo do trigo no Brasil está sujeito a limitações de ordem biótica e abiótica como: condições climáticas adversas (ex.: excesso de chuva e acúmulo de dias encobertos), condições de solo, pragas e doenças (Mehta, 1993; Reis et al., 2001).

3.2 Doenças e sintomas

As doenças são fatores importantes na redução de produtividade e aumento dos custos de produção pelo uso de insumos (Casa et al., 2002). Várias doenças fúngicas incidem sobre a parte aérea da planta de trigo diminuindo o rendimento da cultura pela redução ou destruição da área foliar sadia tais como o oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), a ferrugem da folha (*Puccinia triticina* Eriks), a mancha amarela (*Drechslera tritici-repentis* (Died) Drechs.) a mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.) e a septoriose (*Septoria nodorum* (Berk.) Berk.), são as principais doenças foliares na Região Sul do Brasil (Reis e Casa, 2005). Na fase do espigamento, a planta

pode sofrer com a giberela causada pelo fungo *Gibberella zeae* (Schw) Petch. (anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe) que é uma doença de infecção floral cujos sítios de infecção são as anteras das espigas do trigo (Strange e Smith, 1971; Sutton, 1982).

Dentre as doenças foliares destaca-se a helmintosporiose, principalmente onde as temperaturas médias durante o inverno e as condições de umidade são mais elevadas durante o cultivo (Duveiller et al., 2005). Esta doença também é conhecida como mancha marrom considerada um problema na cultura do trigo e cevada, em várias regiões do mundo (Duveiller et al., 2005). As perdas na produção causadas por esta doença podem chegar a 80% (Reis e Casa, 2005). Os sintomas iniciais são observados como lesões necróticas pardas, com 1 a 2 mm de comprimento, sobre o limbo das primeiras folhas, em consequência da transmissão da doença a partir das sementes. Nas demais folhas podem aparecer, dependendo do clima, dois tipos de sintomas: em regiões frias, as lesões são retangulares e escuras; e nas regiões quentes as lesões são elípticas e cinzas. Sob clima úmido é abundante a frutificação do patógeno nas lesões velhas. Sintomas podem também aparecer na parte central das glumas, na forma de lesões elípticas com o centro claro quase branco e com bordos pardo-escuros (Kimati et al., 1997; Duveiller et al., 2005).

As respostas da infecção são geralmente classificadas numa escala de 1 a 9, de baixa a alta susceptibilidade (Figura 1), de acordo com o método de Fetch e Steffenson (1999). Uma classificação de 1 é dada a plantas com lesões necróticas muito pequenas (menos de 2 mm de comprimento) sem clorose visível. A classificação de 9 é atribuído a indivíduos com lesões grandes (maiores que 6 mm de comprimento) com expansão da clorose.

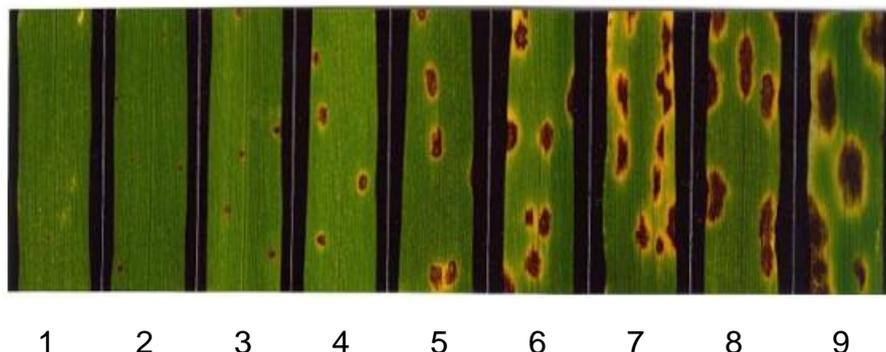


Figura 1: Escala de classificação de Helminthosporiose de acordo com Fetch e Steffenson (1999).

Quando o *B. sorokiniana* infecta as raízes ocorre a podridão comum de raiz presente em todas as regiões tritícolas do Brasil (Reis, 1988) também no Canadá, Austrália, Europa, Ásia e África (Diehl et al., 1982; Tinline et al., 1988; Stubbs et al., 1986; Zillinsky, 1984; Agrios, 1997). Os sintomas mais comuns caracterizam-se pela descoloração dos tecidos radiculares e esta descoloração parda prossegue até alcançar a coroa da planta debilitando-a. Ao atingir a base da planta ocorre também a morte prematura das folhas basais (Reis, 1988).

A infecção de sementes resulta em pontos pretos e enrugamento, reduzindo o valor de mercado (Rashid et al., 2004). Segundo Malik et al. (2014) a temperatura ambiental desempenha um papel importante na determinação do aumento desta doença. Pois a sua propagação é favorecida à temperatura de 28°C, com chuvas e alta umidade relativa. O fungo sobrevive na forma vegetativa em sementes infestadas, plantas voluntárias e saprofiticamente nos restos culturais de seus hospedeiros por vários anos (Mehta, 1978). Os principais agentes de disseminação são: sementes, ventos e respingos de chuva, sendo os restos culturais as fontes de inóculo mais abundantes (Mehta, 1978; Sjöberg et al., 2007).

3.2.1 *Bipolaris sorokiniana*

O fungo *B. sorokiniana* (Sacc.) *Cochliobolus sativus* (Ito e Kurib.) Drechsler ex Dastur, Shoemaker = *Helminthosporium sativum* Pamm., King e

Bakke, é um fungo fitopatogênico encontrado em todo o mundo, que causa doenças no trigo e outros cereais de inverno (Reis, 1982).

Na fase anamórfica *B. sorokiniana*, o micélio é septado e geralmente de cor marrom-oliva-escura. Apresenta conidióforos septados, solitários ou em pequenos grupos, retos a flexuosos, algumas vezes geniculados, pálidos a medianamente marrom-escuros, com dimensões de 110-220 x 6-10 µm. Os conídios normalmente apresentam-se em grupos de três desenvolvidos lateralmente a partir de um poro em cada septo do conidióforo (inserção acropleurógena) (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987). O tubo germinativo é do tipo semi-axial e origina-se a partir de uma ou de ambas as células polares do conídio (Barnett e Hunter, 1998).

A fase teleomórfica, *Cochliobolus sativus*, raramente ocorre na natureza existindo somente dois relatos na literatura sobre a presença de pseudotécios em tecido vegetais de trigo na Zâmbia (Javaid e Ashraf, 1977; Raemaekers, apud Maraite, 1998), onde a cultura se desenvolve sob condições de estações chuvosas e úmidas.

O fungo *B. sorokiniana* (fase assexuada, imperfeita ou anamórfica) pertence à divisão Deuteromycota, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, e à família Dematiacea descrito pelo micologista Robert A. Shoemaker em 1959. A fase sexuada, perfeita ou teleomórfica, *C. sativus*, pertence à divisão Ascomycota, classe Loculoascomycetes, ordem Pleosporales, e à família Pleosporaceae. *Cochliobolus sativus* (Ito e Kurib.) Drechsl. ex Dastur é um ascomiceto heterotático cujos isolados normalmente são bissexuais, autoestéril e pertencem a um dos dois grupos de compatibilidade sexuais ou tipos de acasalamento (Noyd, 2000).

O antigo gênero *Helminthosporium* foi dividido em três outros gêneros que foram, assim, definidos: *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum*. A partir dessa divisão, *Helminthosporium sativum* passou a ser denominado de *Bipolaris sorokiniana* (Alcorn, 1982).

3.2.2 Formas de controle da doença

Os principais métodos de controle recomendado para doenças causadas por *B. sorokiniana* são a rotação de cultura, eliminação de restos culturais, uso de cultivares resistente e aplicação de fungicidas (Mehta, 1978; Reis e Casa, 2005). Inicialmente, o uso de cultivares resistente apresentou-se como o método mais barato, mais fácil e mais seguro de controle de doenças, apresentando inclusive aumento de produtividade. No entanto, com o passar dos anos, novas raças e variedades do fungo surgiram induzindo a resistência e reduzindo a produtividade (Cunha, 1999).

Há tempos, os agrotóxicos têm sido usados na agricultura, entretanto seus efeitos colaterais tem estimulado a redução de seu uso e a adoção de métodos menos agressivos (Gricoletti Júnior et al., 2000). Dentre as alternativas mais discutidas para a redução dos produtos químicos na agricultura está o controle biológico.

3.3 Controle Biológico

A utilização de microrganismos benéficos com o objetivo de aumentar a produtividade e controlar doenças de plantas é registrada desde o início do século XX. A partir desta data até o período atual, inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de controlar doenças causadas por fitobactérias, fungos patogênicos, nematóides e vírus em diferentes culturas (Khan et al., 1971; Paulitz, 1990; Zago 2000; Vieira Júnior, 2005; Romeiro, 2007; Harthmann, 2009; Palazzini et al., 2016).

O controle biológico é uma efetiva e sustentável alternativa para controle de doenças em plantas. Diferentes espécies microbianas tais como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., *Streptomyces* sp. e *Fusarium* sp. não patogênicos tem sido efetivamente usados para controle de fitopatógenos com origem no solo (Paulitz e Belanger, 2001; Haas e Keel, 2003; Jacobsen et al., 2004; Raza et al., 2013). Entre os microrganismos com potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos destacam-se as bactérias, e em especial, o grupo das actinobactérias.

3.4 Controle Biológico e Actinobactérias

As actinobactérias são procariotos Gram-positivos com elevada proporção de guanina e citosina em seu DNA. Sua distribuição ocorre principalmente no solo podendo também ser encontradas na água e em outros ambientes. Podem ser aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias apresentando colônias pulverulentas, micélio aéreo de diferentes tonalidades (Goodfellow e Cross, 1984; Araújo, 1998). Geralmente são isoladas de humanos, animais, plantas, águas residuais, produtos alimentícios, pedras e construções, porém seu habitat principal é o solo (Groth et al., 1999). Elas são ativas na decomposição de materiais orgânicos no solo incluindo lignina e outros polímeros recalcitrantes e podem degradar resíduos agrícolas e urbanos (Heuer et al., 1997). As actinobactérias são reconhecidas como os principais produtores de inúmeros metabólitos secundários, principalmente, os antibióticos, com atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais (Araújo, 1998).

As actinobactérias filamentosas produzem cerca de 45% de todos os metabólitos secundários bioativos microbianos, sendo que aproximadamente 80% dos 7600 compostos são produzidos por estreptomicetos (Bérdy, 2005). Essas bactérias possuem grande potencial como agente de controle biológico de fitopatógenos, pois ao se associarem à planta hospedeira produzem antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana (Hoster et al., 2005) além de favorecerem o crescimento da planta devido a produção de fitormônios conhecidas como PGPR (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) (Merzaeva e Shirokikh, 2006).

O controle de fungos fitopatogênicos por actinobactérias dá-se por diversos mecanismos, tais como hiperparasitismo, antibiose, enzimas degradantes da parede celular (El-Tarabilya e Sivasithamparam, 2005; Hassanin et al., 2007). Segundo Kumar et al. (2002) uma das estratégias para controle de doenças é a resistência induzida, que significa o controle de parasitas e pragas por ativação prévia do próprio sistema de defesa da planta.

Streptomyces é o maior gênero da família Actinobactéria (Hong et al., 2009), com mais de 3.000 espécies descritas (Barka et al., 2016). As colônias

são de crescimento lento (Jüttner and Watson, 2007) e possuem uma característica de superfície lisa de início, mas tornam-se granulares, em pó ou aveludado, devido a uma trama de micélio aéreo (Ambarwati et al., 2012). Esta diferenciação morfológica de *Streptomyces* envolve a formação de uma camada de hifas que podem diferenciar-se em uma cadeia de esporos. Este processo é único entre as Gram-positivas que requer um metabolismo especializado e coordenado (Procópio et al., 2012). O gênero *Streptomyces* é capaz de formar associações com algumas plantas e colonizar o córtex, raízes ou folhas, isso se deve principalmente à sua capacidade de metabolizar diversas fontes de carbono orgânico (Suzuki et al., 2000; Sahli e Abdulkhair, 2012; Gopalakrishnan et al., 2014). Outras características importantes deste gênero inclui em excretar metabólitos antifúngicos na rizosfera, promover o crescimento da planta além de possuir a capacidade de produzir sideróforos e fixar nitrogênio (Tokala et al., 2002; Chater et al., 2010). Também podem excretar a enzima extracelular quitinase capaz de lisar a parede celular de fungos (Gupta et al., 1995; Mahadevan e Crawford, 1997; Joo, 2005).

Estudos *in vitro* realizados por Sahli and Abdulkhair (2012) mostraram que *Streptomyces spororaveus* inibiu significativamente a germinação de esporos de *Fusarium udum* no trigo. Shrivastava et al. (2015) verificaram o biocontrole de um isolado de *Streptomyces* contra *Macrophomina phaseolina* em ensaio da dupla camada e observaram que o isolado *Streptomyces* inibiu de forma eficaz o crescimento do patógeno. Shen et al. (2016) isolaram da rizosfera de uma planta de morango saudável uma estirpe identificada como *Streptomyces hygrosopicus* que foi capaz de inibir o crescimento de fungos patogênicos na cultura de morango. Sangdee et al. (2016) avaliaram o potencial de isolados de *Streptomyces* com atividade antagonista para inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bipolaris maydis*, eles concluíram que os isolados encontrados tem capacidade para atividade antagônica contra esses fitopatógenos. Toumatia et al. (2016) testaram uma estirpe de *Streptomyces mutabilis* contra *Fusarium culmorum* que causa uma doença em plântulas de trigo e observaram que houve redução da ocorrência da doença (64,7%) e diminuição da gravidade da doença (79,6%) além de

promover o crescimento da planta.

Na China, *Streptomyces* sp. tem sido usado por mais de 30 anos para proteger as lavouras de algodão contra patógenos (Yin et al., 1965). Nos Estados Unidos um inoculante a base de *Streptomyces lydicus* WYEC 108 é comercializado para controle de podridão radicular em plantas ornamentais, hortaliças e espécies florestais (Embrapa, 2012). Outro produto comercializado nos EUA, Finlândia, Alemanha e Canadá também contendo *Streptomyces* é recomendado para evitar podridões, tombamentos e murchas em culturas agrícolas e ornamentais (Embrapa, 2012). No Brasil ainda não é comercializado inoculante à base de *Streptomyces* incentivando assim pesquisadores a buscarem microrganismos com efetivas atividades benéficas (biocontrole de fitopatógenos e/ou incremento do crescimento) em culturas de interesse.

3.5 Promoção de Crescimento Vegetal e Actinobactérias

Actinobactérias representam uma alta proporção da biomassa microbiana do solo e tem a capacidade de produzir ampla variedade de antibióticos e enzimas extracelulares (Doubou et al., 2001). Interações diretas e indiretas entre actinobactérias e outros microrganismos não patogênicos no solo também influenciam o crescimento da planta, por exemplo, Abdel-Fattah e Mohamedin (2000) reportaram que actinobactérias estimularam a intensidade de formação de micorrizas e que resultou no aumento do crescimento vegetal.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem afetar o crescimento das plantas de duas maneiras diferentes, indiretamente ou diretamente (Glick, 1995). A promoção indireta do crescimento das plantas ocorre quando PGPR diminui ou evita os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos (Glick, 1995). A promoção direta do crescimento das plantas, na maioria das vezes, ocorre pela produção de reguladores de crescimento de plantas (Patten and Glick, 2002), como a disponibilidade de ferro pela produção de sideróforos (Carrillo-Castañeda et al., 2002), a fixação de nitrogênio (Madhaiyan et al., 2009), produção de hormônios (Patten and Glick, 2002) e solubilização de fosfatos (Hamdali et al., 2008 b).

A produção de sideróforos confere vantagens competitivas para as PGPR que podem colonizar raízes e excluir outros microrganismos daquele nicho ecológico (Haas and Défago, 2005). PGPR também são capazes de produzir reguladores do crescimento vegetal como auxinas, giberelinas e etileno (Harikrishnan et al., 2014). O Ácido indol-3-acético é o principal membro das auxinas, os microrganismos que colonizam a rizosfera e utilizam os exsudatos das raízes sintetizam e liberam auxinas como metabólitos secundários (Strzelczyk and Pokojska-Burdziej, 1984). O AIA é produzido naturalmente nas plantas e controla vários processos fisiológicos como alargamento e diferenciação de tecidos, resposta à luz e gravidade, similarmente estimula a germinação de esporos e alongação do micélio em *Streptomyces* sp. (Matsukawa et al., 2007).

A deficiência de fosfato é um dos fatores limitantes na produção agrícola. Microrganismos que são capazes de solubilizar fosfatos insolúveis transformam em complexos metálicos ou em hidroxiapatita e liberam fosfatos livres (Rodríguez and Fraga, 1999). Actinobactérias como *Streptomyces*, *Micrococcus* e *Micromonospora* foram reportados como solubilizadores de fosfato (Hamdali et al, 2008 a).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos microrganismos

Todo material biológico utilizado no presente trabalho encontra-se depositado na coleção de isolados do Laboratório de Microbiologia Ambiental/DMPI/ICBS/UFRGS.

Os isolados fúngicos 98004 (Cruz Alta - RS), 98012 (Lagoa Vermelha – RS), 98032 (Engenheiro Beltrão – PR) foram selecionados baseados em resultados obtidos em testes de patogenicidade em trabalho anterior em nosso laboratório (Minotto et al., 2014b). Os três apresentaram sintomas da doença na germinação, nas folhas e colmos. Estes isolados foram recuperados, a partir de tubos com meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) inclinado cobertos com um filme de óleo mineral. Os isolados fúngicos foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em 28°C durante dez dias.

Os isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4) utilizados no presente trabalho foram isolados de raízes de plantas sadias de tomateiro por Oliveira et al. (2010). Estes isolados encontravam-se armazenados em glicerol 20% a -20°C. Os mesmos foram repicados para placas de ágar amido caseína – ACA (10g amido, 0,3g caseína, 2,0g KNO₃, 2,0g NaCl, 2g K₂HPO₄, 0,05g, MgSO₄·7H₂O, 0,02g, CaCO₃, 0,01g, FeSO₄·7H₂O, 15g ágar, 1000 mL de água destilada) incubados a temperatura de 28°C durante sete dias.

4.2 Produção do inóculo fúngico

Os isolados de *B. sorokiniana* foram multiplicados em meio de cultura SNA (1g KH₂PO₄, 1g KNO₃, 0,5g MgSO₄·7H₂O, 0,2g KCl, 0,2g glicose, 0,2g sacarose, 20g agar, 1000mL de água destilada) ou agar cenoura (200 g cenoura cozida, triturada e coada, 200 mL de água destilada, 4g agar), específicos para a esporulação de fungo e incubados em estufa, tipo B.O.D por 10-15 dias a 28°C com fotoperíodo de 12h (12h luz/12h escuro). Para a padronização do inóculo fúngico adicionou-se sobre as colônias 5 mL de solução salina estéril (0,9%) contendo surfactante Tween 20 (monoleato de polioxietileno sorbitan) e friccionou-se levemente a superfície da colônia com

uma alça de Drigalski. Os esporos foram removidos e a suspensão transferida para tubos cônicos estéreis. A concentração final de esporos foi ajustada para 10^4 esporos/mL, por meio da contagem de conídios em câmara de Neubauer.

4.3 Avaliação do potencial antifúngico dos isolados de actinobactéria frente aos isolados de *B. sorokiniana*

A atividade antifúngica dos isolados de actinobactéria R18(6) e 6(4) foi determinada pelo ensaio de dupla camada e pareamento de culturas. No ensaio da dupla camada foram empregados os dois isolados de actinobactérias e os três isolados de *B. sorokiniana* (98004, 98012 e 98032). Sob condições assépticas os isolados de actinobactéria R18(6) e 6(4) foram inoculados, pelo método de picada, em placas de Petri contendo meio de cultura ACA e incubados por sete dias a 28°C na ausência de luz. Decorrido esse período verteu-se sobre as colônias dos isolados uma camada de meio de cultura BDA inoculado com a suspensão fúngica, previamente preparada na proporção 1:9, utilizando-se a técnica “pour plate”. As placas foram incubadas por quatro dias a uma temperatura de 28°C na ausência de luz.

A avaliação da atividade antifúngica dos isolados de actinobactéria foi realizada por meio da mensuração dos halos de inibição e colônias, utilizando um paquímetro, em duas direções para cada uma das três repetições. Os dados obtidos foram expressos em centímetros (cm). O índice de antibiose (IA) foi determinado pela relação halo/colônia, obtida pela relação da média do diâmetro do halo pela média do diâmetro da colônia (Rosato et al., 1981).

$$IA = \text{média diâmetro do halo (cm)} / \text{média do diâmetro da colônia (cm)}$$

Cada isolado de actinobactéria foi testado frente ao isolado 98004 de *B. sorokiniana* no ensaio de pareamento de cultura. Discos de 5 mm de diâmetro da cultura do fungo, cultivada previamente em meio BDA a 28°C durante 10 dias, foi transferido para uma nova placa contendo meio BDA à uma distância de 1 cm da borda da placa. Do lado oposto ao fungo foi inoculado por estrias a cultura de actinobactéria com distância de 1 cm da borda da placa. As placas foram incubadas a 28°C. A inibição do crescimento fúngico (%) foi calculada

utilizando a fórmula $(R1-R2/R1) \times 100$, onde R1 é o crescimento radial do fungo inoculado sem exposição à actinobactéria, e R2 é o crescimento radial do fungo inoculado com a actinobactéria. O controle do ensaio consistiu em uma placa de BDA inoculada apenas com o fungo na distância de 1 cm da borda da placa e observado o crescimento do fungo até que o mesmo atingisse toda a superfície da placa. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4 Teste de sanidade e germinação das sementes de trigo

Sementes de trigo das cultivares Tbio Mestre e Marfim (consideradas moderadamente suscetíveis à mancha marrom de acordo com as indicações técnicas de Trigo e Triticale, ambas indicadas para o cultivo na região sul do país) (Embrapa Trigo, 2016), foram gentilmente cedidas pela Fepagro Nordeste – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Vacaria/RS, Brasil. Estas sementes foram submetidas aos testes de germinação e sanidade conforme Brasil (2009). Para o ensaio de sanidade da semente, 200 sementes de cada cultivar (Tbio Mestre e Marfim) foram dispostas em quatro repetições de 50 sementes sobre um papel de filtro umedecido, enrolados e colocados dentro de sacos plásticos. Foram incubados em estufa tipo B.O.D, com fotoperíodo de 12 horas por sete dias a 25°C para germinação das mesmas. Após esse período, as sementes foram examinadas individualmente quanto à porcentagem de germinação e com auxílio de um estereomicroscópio avaliou-se a ocorrência de frutificações típicas do crescimento fúngico.

4.5 Teste de patogenicidade de *B. sorokiniana* em sementes de trigo

Amostras de 100 sementes de trigo das cultivares Tbio Mestre e Marfim foram submetidas à desinfestação superficial em álcool 70% (2 min.), hipoclorito 2,5% (2 min.) e três lavagens com água destilada estéril. As mesmas foram acondicionadas em frascos Erlenmeyers contendo uma suspensão de esporos do isolado 98004, previamente ajustada para concentração de 10^4 - 10^5 esporos/mL. As sementes de trigo nesta suspensão foram mantidas à temperatura ambiente por 24 horas após esse período, as sementes foram distribuídas em quatro repetições de 25 sementes, sobre papel

filtro previamente umedecidos com água destilada estéril. Os mesmos foram enrolados, colocados em sacos plásticos individualmente e incubados em estufa tipo B.O.D a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas para germinação. Ao sétimo dia após a infestação avaliou-se o número de sementes germinadas, presença de lesões nas folhas e no colmo e podridão da semente. O controle consistiu de sementes sem infestação do fungo.

4.6 Caracterização fenotípica dos isolados R18(6) e 6(4)

4.6.1 Solubilização de Fosfato

Os isolados foram crescidos em meio NBRIP (10g de glicose, 5g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0,1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g KCl, 15g ágar e 1000mL de água destilada, pH 6,0) segundo método de Nautiyal (1999). As placas foram infestadas por picada e incubadas a 25, 28 e 30°C por 21 dias. O ensaio foi realizado em triplicata e a avaliação foi determinada pela presença ou ausência de halos sob o crescimento da colônia.

4.6.2 Produção de Sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada segundo o método proposto por Schwyn e Neilands (1987) modificado por Silva-Stenico et al. (2005). Os isolados foram inoculados em meio King B adaptado por Glickmann e Dessaux (1995) (1 g peptona, 0,0575 g K_2HPO_4 , 0,075 g MgSO_4 , 0,75 g glicerol, 250 mL de água destilada, pH 6,8). Aliquotas de 1 mL foram retiradas a cada 48 h e colocados em microtubos, centrifugados a 13000 rpm por 5 min e após 500 μL foram transferidos para novos tubos para reagir com 500 μL do corante Cromoazurol-S (CAS) (Anexo I). A reação positiva foi indicada pela mudança de cor do azul para alaranjado ou amarelo no período de 15-30 min.

4.6.3 Produção de Auxinas

Esta avaliação foi realizada segundo método de Gordon e Weber (1951). Os isolados foram crescidos previamente em meio TSB (caldo de soja triptico) 10% ($3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) suplementado com 5 mM de triptofano e incubadas em 28°C sob agitação de 115 rpm. A cada 48 h pelo período de 264 h, 2 mL do inóculo

foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 13000 rpm por 5 min. A produção de auxina foi determinada transferindo-se 500 µL do sobrenadante para tubos contendo 500 µL do reagente Salkowski (2,4 g FeCl₃, 84,2 mL H₂SO₄). Os tubos foram armazenados no escuro por 30 min. à temperatura ambiente. A intensidade de cor foi determinada por espectrofotometria a 520 nm.

Para a determinação da concentração de auxinas foi preparada uma curva de calibração com diferentes concentrações do composto Ácido 3-indolilacético da marca Dinâmica (0,2; 5,625; 11,25; 22,55 e 45 µg/mL).

4.6.4 Fixação de Nitrogênio

Os dois isolados de actinobactérias foram cultivadas em tubos de penicilina com tampa de algodão contendo 10 mL de meio NFb (5 g ácido málico, 5 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 0,1 g NaCl, 0,01 g CaCl₂.2H₂O, 4 mL Fe.EDTA (solução 1,64%), 2 mL azul de bromotimol (0,5%), 1,75 g/L ágar, 1 L de água destilada, pH 6,8 e 2 mL de uma solução de micronutrientes (Anexo II), incubadas a 25, 28 e 30°C e avaliadas após 14 dias. A capacidade em crescer neste meio de cultura livre de nitrogênio associada a alcalinização deste, verificada pela mudança da cor do meio de verde para azul, e em alguns casos também formar película, é considerado positivo (Boddey et al, 1995; Kuklinsky-Sobral, 2004).

4.7 Avaliação da atividade antifúngica e promotora de crescimento, *in vivo*, dos microrganismos endofíticos

4.7.1 Infestação das sementes

Os isolados R18(6) e 6(4) com espectro de atividade nos ensaios *in vitro* foram selecionados para os ensaios de *in vivo*. As sementes foram submetidas à desinfestação como descrito anteriormente. As mesmas foram secas em papel de filtro estéril e imersas em uma suspensão contendo propágulos dos isolados de actinobactéria. Para a suspensão de propágulos estes microrganismos foram multiplicados em caldo amido caseína em temperatura de 28°C, sob agitação de 115 rpm por 72 h. Após este período, transferiu-se 5

mL desta suspensão para novos fracos contendo 50 mL do mesmo meio de cultura incubados nas mesmas condições anteriores por 72 h. Após esse período a concentração de propágulos encontrava-se em 10^8 UFC/mL. A infestação das sementes foi realizada depositando-as nesta suspensão e mantida sob agitação por 4 horas a 25°C.

4.7.2 Colonização *in vitro* de raízes de plântulas de trigo pelos isolados *Streptomyces*

Para avaliar a capacidade dos isolados em colonizar o sistema radicular de plântulas de trigo foi utilizado o protocolo descrito por Queiroz et al. (2006) com modificações. As sementes de trigo cv. Tbio Mestre e Marfim foram desinfestadas, secas em papel filtro estéril e infestadas como descrito no item 4.7.1. Após, cada semente foi transferida, com auxílio de uma pinça estéril, para tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-água (0,6%). Os tubos foram incubados em estufa tipo B.O.D sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C por sete dias para germinação. A avaliação foi realizada por meio de observação dos tubos a olho nu, contra luz, verificando-se a turvação ou não do meio em torno do sistema radicular, indicativo da presença da suspensão bacteriana. Para confirmar a presença destes microrganismos colonizando a superfície e/ou tecidos internos as raízes foram cortadas em pequenos fragmentos (2 – 3 cm) e depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura ACA. A testemunha constituiu de sementes desinfestadas e imersas em solução salina.

4.7.3 Ensaio em casa de vegetação

O ensaio em área experimental foi realizado com a finalidade de avaliar a capacidade dos isolados R18(6) e 6(4) em controlar a mancha marrom, podridão da raiz e promover o crescimento das plantas de trigo. A área experimental está localizada no Departamento de Fitossanidade - Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. Este espaço é destinado à implementação de ensaios *in vivo* e é caracterizada por ser uma área coberta com plástico transparente, com mesas que recebem a luz do dia, e a entrada e saída de ar é feita por aberturas nas laterais. O experimento foi repetido duas

vezes, de abril-junho e de junho-agosto de 2016. O ensaio foi realizado em copos de plástico descartável (500 mL) com substrato Green Plus® a base de turfa e vermiculita expandida (1:1). Em cada vaso foram depositadas cinco sementes de trigo da cultivar TBio Mestre de acordo com cada tratamento. Cada tratamento era composto por cinco vasos (furados em baixo) os quais foram mantidos em bandejas separadas (uma bandeja para cada tratamento) com água na altura de dois dedos que era repostada sempre que necessário. Após a germinação das sementes, realizou-se o desbaste deixando-se duas plântulas por vaso. O experimento foi mantido por nove semanas.

A suspensão de *B. sorokiniana* (isolado 98004) foi aplicada de duas maneiras:

- 1) inoculação no substrato utilizando uma suspensão fúngica de 10^4 esporos/mL do isolado;
- 2) aspersão da parte aérea com atomizador (compressor de ar modelo AS 176 40psi, pistola Steula BC64), a 40 cm distância das folhas, visando homogeneidade de dispersão da suspensão de esporos.

Para a realização deste ensaio foram determinados sete tratamentos para cada isolado de actinobactéria como descritos abaixo:

- Tratamento 1 (promotor de crescimento): Sementes infestadas com isolado de actinobactéria;
- Tratamento 2: Sementes infestadas com actinobactéria mais substrato infestado com *B.sorokiniana*;
- Tratamento 3: Sementes infestadas com actinobactéria mais *B.sorokiniana* inoculado por aspersão na parte aérea;
- Tratamento 4: Sementes infestadas com 5 mL de suspensão de actinobactéria no momento do plantio e *B.sorokiniana* inoculado por aspersão na parte aérea;
- Tratamento 5 (Controle): Sementes sem infestação;
- Tratamento 6 (Controle): Sementes infestadas com *B.sorokiniana* no momento do plantio;
- Tratamento 7 (Controle): Sementes sem infestação de actinobactéria mais *B.sorokiniana* inoculado por aspersão na parte aérea.

No tratamento 2 o substrato foi inoculado com uma suspensão de 10^4 esporos/mL de *B. sorokiniana* no estágio GS 15, 35 (Zadoks et al., 1974). No tratamento 4 uma suspensão de 10^8 UFC/mL da actinobactéria foi adicionado às sementes no sulco de semeadura. Nos tratamentos 3, 4 e 7 as plantas de trigo no estágio GS 15, 35 foram aspergidas com uma suspensão de *B. sorokiniana* previamente ajustada em 10^4 esporos/mL. As plantas foram submetidas à câmara úmida por 24 h antes e 48 h depois da aspersão. Ao final do experimento foram determinadas altura da parte aérea, tamanho da raiz, o peso fresco e peso seco das plantas de trigo.

4.7.4 Análise estatística

Este ensaio foi conduzido em cinco replicatas. A análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Bonferroni, ambos com $P \leq 0,05$ com o programa SPSS versão 18.

4.7.5 Avaliação da severidade da mancha marrom nas folhas de trigo

Após as 48 horas da aspersão, as plantas foram mantidas em casa de vegetação sem controle de temperatura e com luminosidade natural. Foi escolhido aleatoriamente um vaso de cada tratamento que recebeu aspersão da suspensão de *B. sorokiniana*. Destas plantas localizou-se a 4ª ou 5ª folha que foram fixadas com fita adesiva em uma superfície plana e fotografadas com câmera digital (Sony alfa 35) com distância de 20 cm de altura. O período de observação foi a cada dois dias a partir da manifestação da doença até completar dez dias. Posteriormente fez-se avaliação da severidade da mancha foliar com auxílio de uma escala (Figura 2) criada segundo a escala de Fetch e Steffenson (1999). Onde a severidade da mancha marrom foi classificada: (+) representa baixa severidade com manchas necróticas pequenas e sem bordas cloróticas; (++) representa intermediária severidade com manchas necróticas com bordas cloróticas definidas e (+++) representa alta severidade, onde as manchas necróticas são maiores e a clorose não tem bordas definidas

tomando boa parte da área foliar, debilitando a planta.

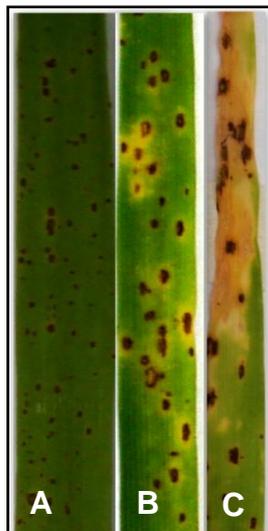


Figura 2: Escala de classificação da severidade da mancha marrom baseada na escala modelo de Fetch Steffenson (1999). A: (+) baixa severidade; B: (++) intermediária severidade; C: (+++) alta severidade.

4.7.6 Observação da colonização das raízes de trigo tratadas com os isolados de *Streptomyces* por Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de raízes das plantas de trigo, das quais as sementes tinham sido infestadas com os isolados de *Streptomyces* R18(6) ou 6(4), foram coletadas no final do experimento e tratadas segundo protocolo do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, conforme Anexo III.

As raízes foram fixadas, lavadas e desidratadas. Após estas etapas foram dessecadas no equipamento de Ponto Crítico (Critical Point Dryer/ Balzers CPD030). Em seguida foram coladas em “stubs” com fitas adesivas de carbono. Na sequência foi realizada a metalização das amostras com o equipamento Sputter Coater/ Balzers SCD050. Por fim, foram visualizados em MEV JSM 6060 em voltagem de 10 kV.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do potencial antifúngico dos isolados de actinobactéria frente aos isolados de *B. sorokiniana*

Foi utilizado o método da dupla camada para verificar a ação antifúngica *in vitro* destes isolados contra o *B. sorokiniana*. Os resultados mostraram que somente o isolado R18(6) foi capaz de inibir o crescimento dos três isolados de *B. sorokiniana* (98004, 98012 e 98032) testados como mostra a Figura 3. Foi possível observar que utilizando esta técnica o isolado 6(4) foi capaz de crescer no meio de cultura, porém não inibiu o crescimento dos isolados de *B. sorokiniana*.

Os halos formados pelo isolado R18(6) foram mensurados e o cálculo do Índice de Antibiose (IA) foi determinado, o isolado de *B. sorokiniana* 98032 sofreu a maior inibição (Tabela 1).

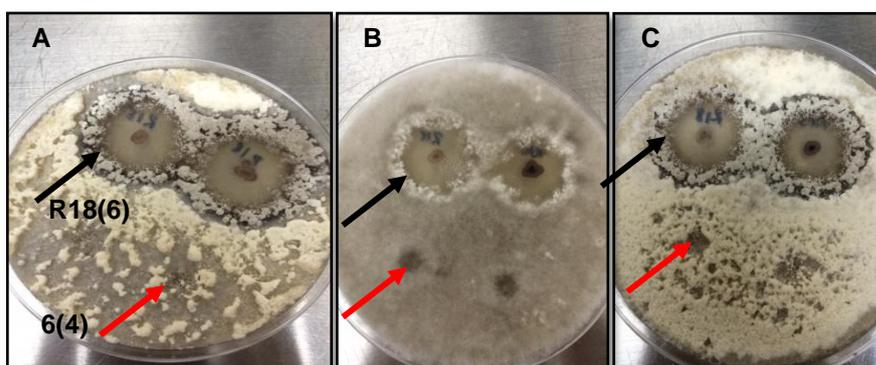


Figura 3: Ensaio da dupla camada ilustrando os halos de inibição formados pelo isolado R18(6) frente a três isolados de *B. sorokiniana* após sete dias de incubação a 28°C. Setas pretas indicam os halos produzidos pelo isolado R18(6), setas vermelhas indicam o crescimento do isolado 6(4). (A) *B. sorokiniana* 98004; (B) *B. sorokiniana* 98012; (C) *B. sorokiniana* 98032.

Tabela 1: Índice de antibiose do isolado *Streptomyces* R18(6) contra três isolados de *B. sorokiniana* usando o ensaio de dupla camada.

Isolado de <i>B. sorokiniana</i>	Média do diâmetro da colônia (cm)	Média do diâmetro do halo (cm)	Índice de Antibiose
98004 (Cruz Alta-RS)	0,62	2,1	3,36
98012 (Lagoa Vermelha-RS)	0,57	1,58	2,75
98032 (Engenheiro Beltrão-PR)	0,67	2,58	3,82

No ensaio da cultura pareada somente o isolado 98004 de *B. sorokiniana* foi utilizado frente aos dois isolados de actinobactéria, R18(6) e 6(4). A figura 3 ilustra a inibição do crescimento fúngico utilizando esta técnica. A porcentagem de inibição do crescimento radial do fungo foi calculada e observou-se que o isolado R18(6) inibiu 33,7% do crescimento do *B. sorokiniana* e o isolado 6(4), com esta técnica foi capaz de inibir 44,6 % do crescimento radial do *B. sorokiniana*.

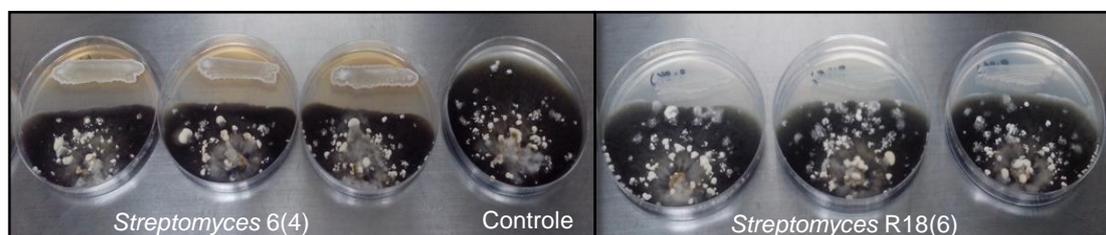


Figura 4: Inibição do crescimento radial de *B. sorokiniana* frente aos isolados 6(4) e R18(6) em meio BDA, após dez dias de incubação a 28°C.

5.2 Teste de sanidade e germinação de sementes de trigo

Foi avaliada a porcentagem de sementes germinadas das cultivares Tbio Mestre e Marfim. A cultivar Tbio Mestre teve 96% de germinação e a cultivar Marfim 80% de germinação. Também foram identificados por análise microscópica o crescimento de fungos do gênero *Alternaria* sp. e *Aspergillus* sp.

5.3 Teste de patogenicidade de *B.sorokiniana* em sementes de trigo

O isolado *B. sorokiniana* 98004 por ser proveniente de uma cidade do Rio Grande do Sul (Cruz Alta) e no ensaio da dupla camada apresentar o maior índice de antibiose quando comparado com o isolado 98012 (Tabela 1) foi avaliado quanto à sua capacidade de produzir sintomas das moléstias causadas em sementes das duas cultivares de trigo conforme descreve o item 4.5.

As sementes foram germinadas por sete dias em B.O.D até a germinação. Observou-se que 98% das sementes da cultivar Marfim que foram infestadas com o patógeno não germinaram (Tabela 2). As lesões em folhas (necrose e clorose) manifestaram-se nas duas cultivares, porém foram poucas manchas desenvolvidas durante este período. A podridão das sementes afetou 30% da cultivar Tbio Mestre e 25% da cultivar Marfim, interferindo também na germinação das mesmas (Tabela 2).

Na parte aérea (folhas) os sintomas foram caracterizados pela formação de pequenas lesões de coloração marrom-escuro e halo amarelado, ou por clorose em algumas regiões da folha. O sintoma de podridão da semente foi caracterizado por intensa esporulação na ponta da semente, que em casos mais graves se estenderam por toda a semente, levando ao apodrecimento. O tratamento controle consistiu de sementes sem a infestação do patógeno.

Tabela 2: Incidência dos sintomas causados por *B. sorokiniana* em sementes e plântulas de trigo.

Cultivar	Germinação (%)	Podridão da semente (%)	Lesão na folha (%)
Tbio Mestre	32	30	2
Controle	100	0	0
Marfim	2	25	1
Controle	98	0	0

5.4 Caracterização fenotípica dos isolados de actinobactéria

Os isolados 6(4) e R18(6) foram capazes de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e o isolado 6(4) produziu sideróforos em 28°C (Tabela 3).

Tabela 3: Solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de sideróforo dos isolados de actinobactéria.

Isolado	Solubilização de	Fixação de	Produção de
	Fosfato*	Nitrogênio	Sideróforo
	(21 dias)	(14 dias)	(48 h)
	28°C	28°C	28°C
6(4)	++	+	+
R18(6)	+	+	-

(-) ausência de produção; (+) produção positiva; * (+) Isolado com atividade positiva com relação $H/C \leq 1$; (++) Isolado com atividade positiva com relação $H/C \geq 1 \leq 3$.

A produção de sideróforos foi verificada pelo método colorimétrico conforme descrito no item 4.6.2. Foi possível observar qualitativamente que a produção de sideróforos ocorreu somente com o isolado 6(4) revelando a cor alaranjada em reação com o corante CAS (Figura 5).

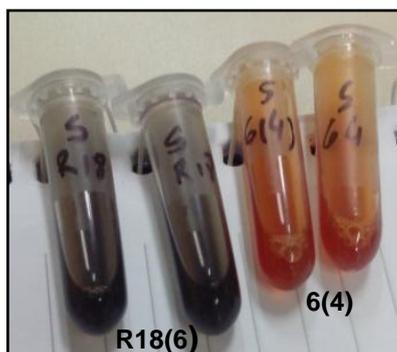


Figura 5: Produção de sideróforos pelos isolados de *Streptomyces* sp. Cor alaranjada indica reação positiva, cor escura indica reação negativa.

A produção de auxina foi avaliada durante 264 horas, sendo que as alíquotas para mensuração colorimétrica foram coletadas a cada 48 h. A partir de uma curva padrão com concentrações de auxina conhecidas, gerou-se a equação $y = 0,0159x + 0,088$, onde y é a absorbância adquirida pelos isolados e x é a concentração de auxina em $\mu\text{g/mL}$ produzida por eles.

A figura 6 mostra a equivalência da concentração de auxina produzida pelos isolados R18(6) e 6(4). O isolado R18(6) apresentou a maior produção de auxina na última verificação (264 h) com $6,95 \mu\text{g/mL}$, porém iniciou a produção deste composto antes do isolado 6(4) em 96 h de crescimento, o isolado 6(4) alcançou sua máxima produção em 192 h de incubação com $10,75 \mu\text{g/mL}$.

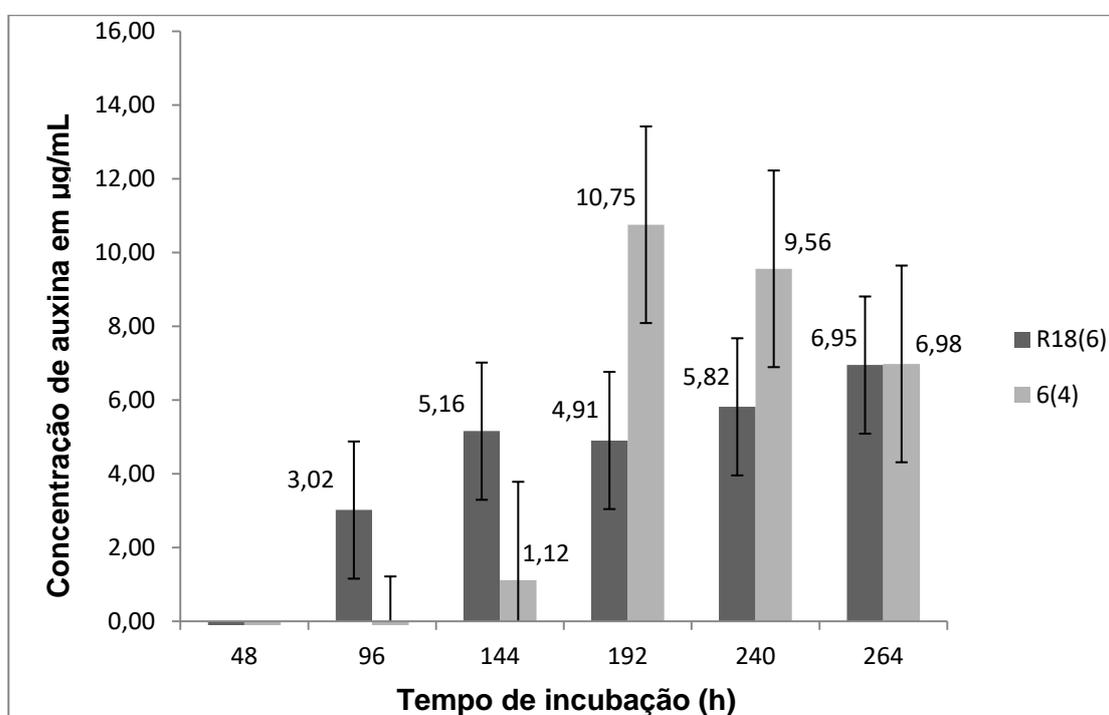


Figura 6: Concentrações de auxina em $\mu\text{g/mL}$ produzido pelos isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4) durante 264 horas de incubação em 28°C .

5.5 Colonização *in vitro* de raízes de plântulas de trigo pelos isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4)

Sementes infestadas com os isolados R18(6) e 6(4) separadamente foram germinadas em tubos contendo ágar-água 0,6%. Retirando-se a raiz dos tubos e depositando-a em meio ACA foi possível verificar o crescimento das actinobactérias ao redor das mesmas depois de três dias (Figura 7).

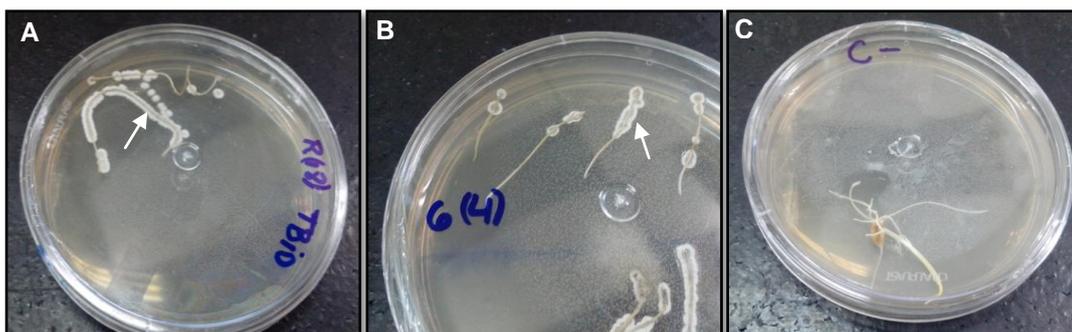


Figura 7: Colonização das raízes de trigo por isolados de *Streptomyces* sp. (A) colonização com o isolado R18(6). (B) colonização com o isolado 6(4). (C) controle - sementes sem infestação.

5.6 Ensaio em casa de vegetação

5.6.1 Avaliação da promoção de crescimento

No final do experimento foram realizadas medidas de altura e massa seca da parte aérea (Tabela 4), comprimento e massa seca de raiz (Tabela 5). Observou-se que no período de abril-junho houve diferença significativa entre as bactérias no Tratamento 2 tanto para massa seca da parte aérea quanto para massa seca de raiz. O isolado R18(6) apresentou os maiores valores para estes parâmetros. Já no segundo período de junho-agosto não foi observado diferença estatística entre as bactérias.

Tabela 4: Média da massa seca da parte aérea e altura para cada tratamento nos períodos de abril-junho e junho-agosto.

Tratamento	Abril-junho				Junho-agosto			
	Altura (cm)		Massa seca parte aérea (mg)		Altura (cm)		Massa seca parte aérea (mg)	
	6(4)	R18(6)	6(4)	R18(6)	6(4)	R18(6)	6(4)	R18(6)
1	49,1 ^a	45,2 ^{ab}	540 ^a	480 ^a	49,4 ^a	50,9 ^a	740 ^a	670 ^a
2	44,5 ^{ab}	48,6 ^a	330 ^b	*560 ^a	48,3 ^a	49,2 ^a	670 ^a	550 ^a
3	42,8 ^{bc}	43,0 ^{bc}	260 ^b	260 ^b	40,3 ^c	36,9 ^c	330 ^b	440 ^b
4	42,8 ^{bc}	43,7 ^{bc}	350 ^b	310 ^b	39,5 ^c	40,4 ^c	410 ^b	390 ^b
5	46,5 ^{ab}		470 ^a		48,9 ^a		710 ^a	
6	41,3 ^c		220 ^b		44,0 ^b		390 ^b	
7	37,5 ^d		250 ^b		37,7 ^c		330 ^b	

(1) Sementes infestadas com R18(6) ou 6(4); (2) Sementes infestadas com antagonista/*B.sorokiniana* no substrato; (3) Sementes infestadas com antagonista/aspersão de *B.sorokiniana*; (4) Semente inoculada com suspensão de antagonista/aspersão de *B.sorokiniana*; (5) Sementes sem infestação (controle); (6) Sementes inoculadas com *B.sorokiniana* (controle); (7) Sementes sem inoculação/aspersão de *B.sorokiniana* nas folhas (controle). *Diferença estatística significativa entre as bactérias pelo Teste Bonferroni ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Tabela 5: Média da massa seca e comprimento de raiz para cada tratamento nos períodos de abril-junho e junho-agosto.

Tratamento	Abril-junho				Junho-agosto			
	Massa seca de raiz (mg)		Comprimento de raiz (cm)		Massa seca de raiz (mg)		Comprimento de raiz (cm)	
	6(4)	R18(6)	6(4)	R18(6)	6(4)	R18(6)	6(4)	R18(6)
1	370 ^a	320 ^a	21,9 ^{bc}	22,4 ^{ab}	120 ^a	160 ^a	27 ^a	35,2 ^a
2	100 ^c	*250 ^b	19,2 ^{bc}	20,9 ^{bc}	90 ^b	*120 ^a	30,8 ^a	28,1 ^a
3	90 ^c	80 ^c	19,9 ^{bc}	18,3 ^{bc}	60 ^c	60 ^c	27,7 ^a	25,2 ^a
4	90 ^c	100 ^c	27,9 ^a	20,4 ^{bc}	60 ^c	70 ^c	28,6 ^a	30,1 ^a
5	250 ^b		25,5 ^a		140 ^a		25,9 ^a	
6	110 ^c		16,17 ^c		90 ^b		29,2 ^a	
7	90 ^c		21,1 ^{bc}		50 ^c		27,6 ^a	

(1) Sementes infestadas com R18(6) ou 6(4); (2) Sementes infestadas com antagonista/*B.sorokiniana* no substrato; (3) Sementes infestadas com antagonista/aspersão de *B.sorokiniana*; (4) Semente inoculada com suspensão de antagonista/aspersão de *B.sorokiniana*; (5) Sementes sem infestação (controle); (6) Sementes inoculadas com *B.sorokiniana* (controle); (7) Sementes sem inoculação/aspersão de *B.sorokiniana* nas folhas (controle). *Diferença estatística significativa entre as bactérias pelo Teste Bonferroni ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Bonferroni ($p \leq 0,05$).

5.6.2 Avaliação da severidade da mancha marrom e podridão da raiz nas plantas de trigo

A avaliação da severidade da mancha marrom nas plantas de trigo foi realizada por análise de imagens capturadas com câmera digital no período de junho-agosto (Figura 8).

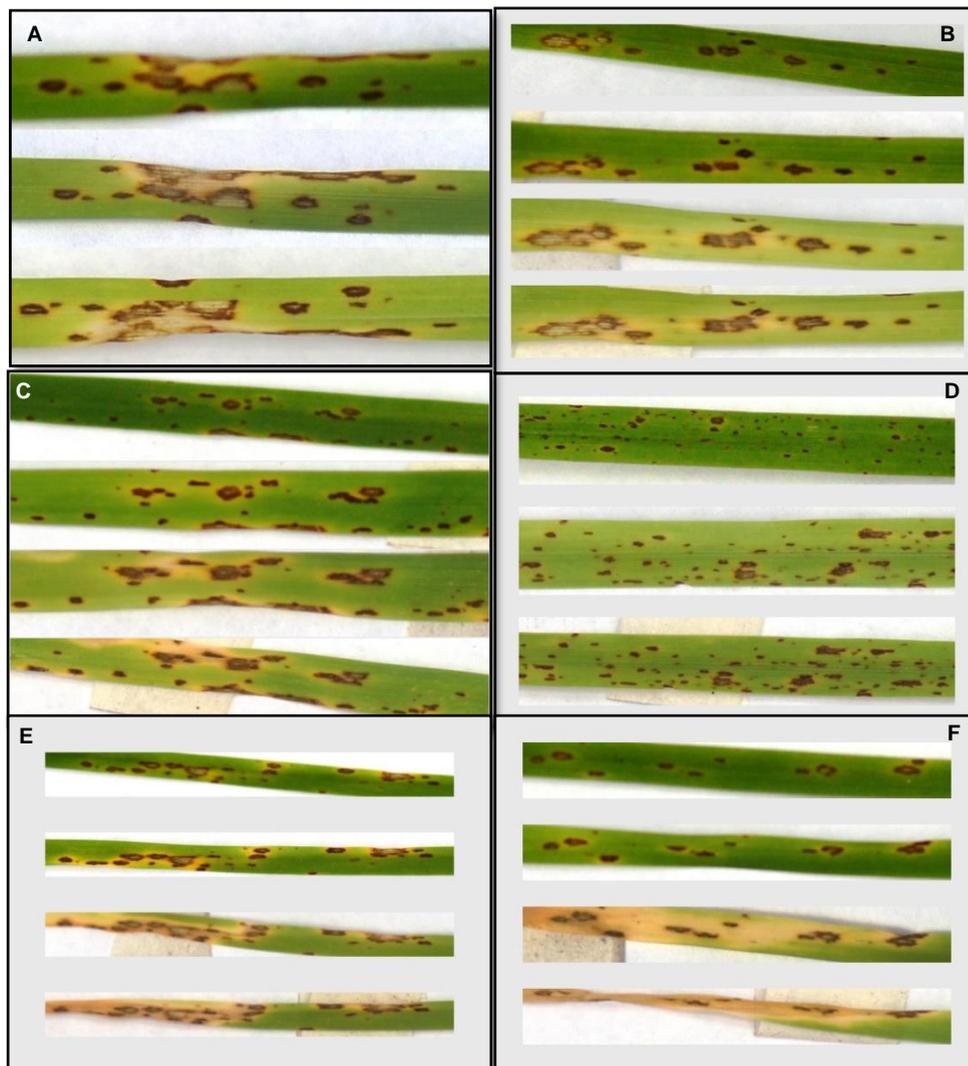


Figura 8: Respostas das plantas de trigo à infestação com os isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4) e aspersão de *B. sorokiniana* 98004. A) (++) semente infestada com o isolado R18(6); B) (++) semente infestada com o isolado 6(4); C) (++) inoculação no sulco da semeadura com o isolado R18(6); D) (+) inoculação no sulco da semeadura com o isolado 6(4); E) e F) (+++) sementes sem infestação com os isolados de *Streptomyces*.

A semente que recebeu a infestação pela inoculação do *Streptomyces* 6(4) no sulco da semeadura foi capaz de resistir por mais tempo a severidade da doença, pois até o último dia analisado as manchas cloróticas não aumentaram.

Na figura 9-A o isolado R18(6) se mostrou mais eficiente em proteger a raiz do apodrecimento em relação ao isolado 6(4) (Figura 9-B). Percebe-se isto pelo volume de raiz das plantas de trigo de acordo com os tratamentos.

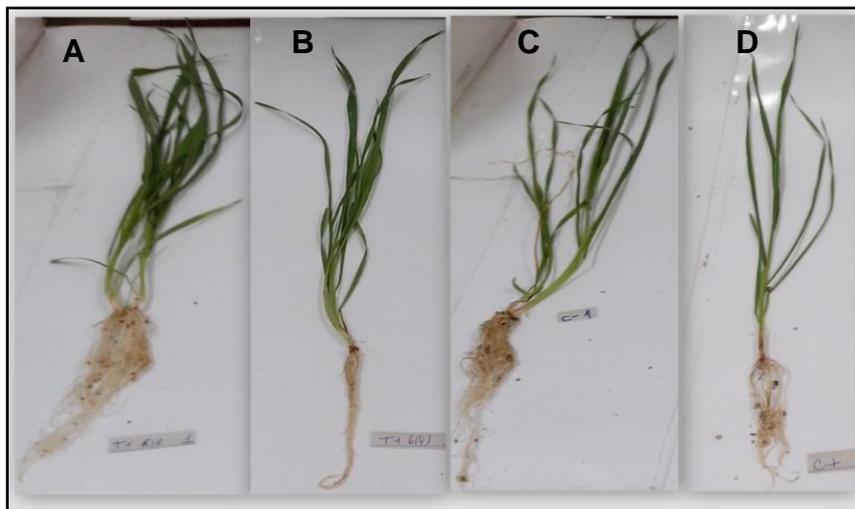


Figura 9: Efeito da infestação dos isolados *Streptomyces* R18(6) e 6(4) na proteção de raízes de plantas de trigo. A) Semente infestada com o isolado R18(6); B) Semente infestada com o isolado 6(4); C) Controle negativo; D) Controle positivo com doença. Período de abril-junho.

5.6.3 Visualização de amostras de raiz de trigo em MEV

Para verificarmos a colonização dos isolados R18(6) e 6(4) nas raízes de trigo, as amostras foram visualizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 10).

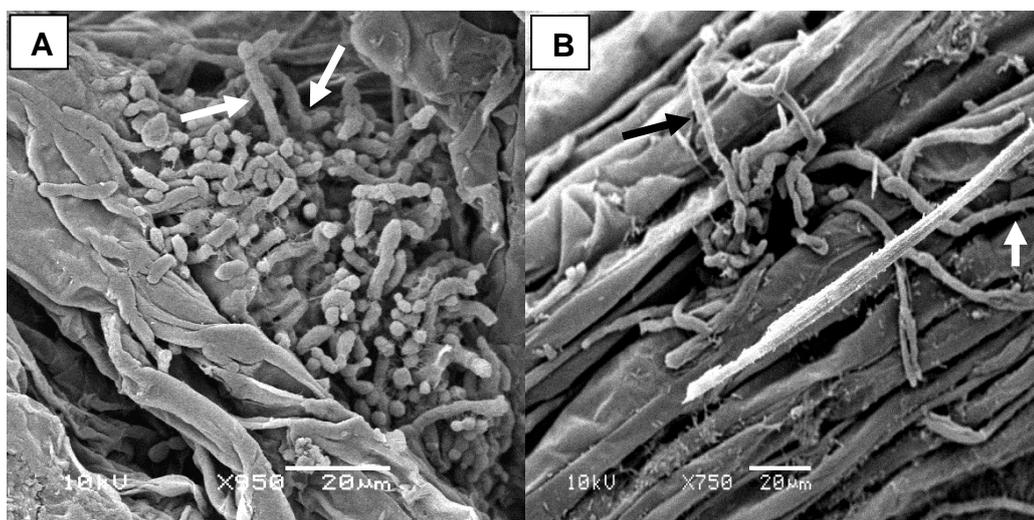


Figura 10: Microscopia Eletrônica de Varredura: (A) células do isolado de *Streptomyces* R18(6) em formação de cadeia de esporos, aderidas à raiz de trigo (950, 10 kv, 20 µm); (B) células do isolado de *Streptomyces* 6(4) em formação de cadeia de esporos, aderidas à raiz de trigo (750, 10 kV, 20 µm).

As amostras visualizadas foram de (a) tratamento 4 onde as sementes receberam a suspensão de *Streptomyces* R18(6) no sulco da semeadura. Em (b) tratamento 3 onde as sementes foram infestadas com *Streptomyces* 6(4) sob agitação. Observou-se o início da formação de cadeia de esporos simples em formato *retinaculum-apertum* (setas) característico de *Streptomyces* sp.

6. DISCUSSÃO

Evidências indicam que as actinobactérias são quantitativa e qualitativamente importantes na rizosfera, onde podem influenciar o crescimento das plantas e proteger as raízes destas contra a invasão por fungos patogênicos radiculares (Sardi et al., 1992; Crawford et al., 1993; Atalan et al., 2000; Basil et al., 2004; Palaniyandi et al., 2013; Sangdee et al., 2016). Nos ensaios *in vitro* verificou-se que os isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4) produzem componentes para estimular o crescimento vegetal. Estas características são importantes para o aumento da nutrição e crescimento das plantas e também garantem maior competitividade destes microrganismos, conferindo pontos positivos para a ação do biocontrole de doenças (Palaniyandi et al., 2013).

Em nosso experimento foi possível observar a atividade antifúngica *in vitro* dos isolados R18(6) e 6(4) utilizando a técnica da dupla camada e pareamento de culturas. Apesar do isolado 6(4) apresentar esta atividade somente no pareamento de culturas ele foi capaz de inibir em 44% o crescimento fúngico. Esta atividade pode ser decorrente da necessidade de excretar substâncias (enzimas e/ou metabólitos) resultantes do estresse e da competição e por estarem em um meio de cultura (BDA) que não favorece completamente seu desenvolvimento. Lu et al. (2016) verificaram em experimento que 24% dos isolados de actinobactéria inibiram o crescimento micelial de *F.oxusporum f. sp. cucumerium* em meio BDA e 84% destes isolados pertenciam ao gênero *Streptomyces*. Taechowisan et al. (2003) realizaram o pareamento de cultura para isolar actinomicetos endofíticos com atividade antifúngica e também verificaram que a maioria dos isolados com esta capacidade eram do gênero *Streptomyces* sp. A produção de enzimas excretadas sozinhas ou em associação a outros compostos, como antibióticos, podem ser utilizados pelo microrganismo produtor para a competição com outras espécies microbianas (Helistö et al., 2001).

O isolado 98004 de *B. sorokiniana* foi selecionado para ser testado quanto a sua capacidade de manifestar a doença nas cultivares de trigo, Tbio

Mestre e Marfim. Neste ensaio observou-se que este isolado foi capaz de manifestar sintomas da doença em sementes e plântulas de trigo. A podridão da semente que impede a germinação das mesmas foi o sintoma com maior incidência dentro do período analisado nas condições do ensaio. Este resultado está de acordo com Minotto et al. (2014 a) no qual obteve alto índice de podridão da semente em ensaio de patogenicidade com cultivares de trigo infestadas com isolados de *B. sorokiniana*.

Os isolados R18(6) e 6(4) também foram avaliados segundo sua capacidade em colonizar as raízes de plântulas de trigo. A região rizosférica fornece um ambiente atrativo para comunidades de microrganismos, pois liberam uma vasta gama de compostos de carbono de baixo peso molecular, resultando em grande diversidade microbiana (Whipps e Lynch, 1986). A capacidade em colonizar as raízes é uma característica importante para uso de agentes de biocontrole, além de ser um indicativo da capacidade destes microrganismos em competir por este espaço no solo (Shneider, 1982; Bais et al., 2004). A metodologia utilizada com meio ágar-água 0,6% nos possibilitou verificar a colonização das actinobactérias nas raízes de trigo, ao se desprezar a parte de cima do meio de cultura e com pinça estéril transferir as raízes para meio específico de crescimento de actinobactérias como ACA verificou-se o crescimento das mesmas ao redor das raízes em poucos dias. Provavelmente, o que as mantinha nesta interação eram os exsudatos ricos em nutrientes liberados pela raiz, pois o meio ágar-água não possui nutrientes suficientes para manter a sobrevivência destas bactérias. Tokala et al. (2002) observaram esta característica para o gênero *Streptomyces*. Ao final do experimento em casa de vegetação, coletaram-se amostras de raízes das sementes que haviam sido infestadas com os isolados R18(6) e 6(4), e observou-se por microscopia eletrônica de varredura a presença destes na superfície das raízes em formação de cadeia de esporos, confirmando que estas bactérias tiveram a capacidade de colonizar e sobreviver nas raízes destas plantas de trigo.

A colonização da raiz e produção de auxina pelos isolados R18(6) e 6(4) pode ter influenciado no aumento da massa seca da raiz das sementes infestadas com actinobactéria em relação ao controle, observado no período de

abril-junho (Tabela 3). Vários *Streptomyces* sp. como *S. olivaceoviridi*, *S. rimosus* e *S. rochei* isolados da rizosfera de tomateiro tem a habilidade de produzir AIA e melhorar o crescimento da planta pelo aumento da germinação, alongação da raiz e peso seco de raiz (El-Tarabily, 2008). Franco-Correa et al. (2010) também relataram que isolados de actinobactérias como *Micromonospora* sp., *Streptomyces* spp., *Streptosporangium* sp., e *Thermobifida* sp., são melhores para colonizar a rizosfera da planta, mostrando potencialidade como agente de biocontrole contra uma gama de fungos patogênicos radiculares.

No período de abril-junho o isolado R18(6) influenciou no aumento da massa seca da parte aérea das plantas de trigo mesmo na presença do fitopatógeno (Tabela 3). De acordo com trabalhos de Jog et al., (2014), Gopalakrishnan et al., (2013 and 2014) e Palaniyandi et al., (2014) a inoculação com isolados de *Streptomyces* em culturas como arroz, trigo, sorgo e tomate aumentaram a biomassa dessas plantas. Outros estudos usando *Streptomyces* spp. para controle de doenças também relatam o aumento da biomassa da planta e aumento da produção (Franco-Correa et al., 2010; Sadeghi et al., 2012; Tamreihao et al., 2016).

Os isolados de actinobactéria também exibiram outras propriedades associadas a agentes de controle biológico e crescimento vegetal, como a capacidade de solubilizar fosfatos e produzir sideróforo (no caso do isolado 6(4)). A deficiência de fósforo é um fator limitante na produção agrícola, assim a solubilização e mineralização do fósforo por bactérias solubilizadoras de fósforo é uma característica importante para bactérias promotoras de crescimento vegetal (Richardson, 2001; Hamdali et al, 2008 b). Actinobactérias como *Streptomyces*, *Micrococcus* e *Micromonospora* foram reportados como solubilizadores de fósforo (Hamdali et al, 2008 b). A produção de sideróforos por bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) pode limitar a captação de ferro pelo patógeno diminuindo sua capacidade de proliferação (Kloepper et al., 1980; Dowling et al., 1996). Schippers et al. (1987) sugeriram que este mecanismo é eficaz porque PGPB produzem sideróforos que tem afinidade muito maior pelo ferro disponível do

que patógenos fúngicos.

Bactérias promotoras do crescimento de plantas podem desencadear um fenômeno conhecido como resistência sistêmica induzida (ISR) que é similar à resistência sistêmica adquirida e que ocorre quando as plantas ativam seus mecanismos de defesa em resposta à infecção por um agente patogênico (Pieterse et al., 2009). A inoculação do antagonista em um período anterior a inoculação do fungo no solo pode ter induzido a resistência sistêmica da planta, resultando em uma maior tolerância ao fitopatógeno, como foi observado no Tratamento 2 no primeiro ensaio. Moura et al. (1998) verificaram em seu experimento que ao inocular actinobactérias em sementes de tomateiro antes do fitopatógeno, melhorou a defesa da planta contra *Ralstonia solanacearum*. Van Loon (2007) afirmou que as rizobactérias podem reduzir a atividade de microrganismos patogênicos não apenas através do antagonismo, mas também ativando a planta para melhor se defender.

A infestação do fungo na parte aérea das plantas e o teste de patogenicidade mostrou a alta virulência deste isolado de *B. sorokiniana*. Este resultado está de acordo com dados obtidos por Minotto et al. (2014 a). As plantas que foram infestadas com os isolados R18(6) e 6(4) e infestadas com altas concentrações do fungo na parte aérea resultou em plantas que, apesar de não deixarem de ser afetadas pela mancha marrom, conteve o avanço da clorose nas folhas por mais tempo. Sugere-se que este comportamento tenha sido resultado da resistência sistêmica causada pelo antagonista. Pois no tratamento controle (Fig. 8-E e F) a clorose já havia tomado boa parte da área foliar no sétimo dia.

Os isolados de actinobactérias utilizados nesse trabalho mostraram ação antagônica contra *B. sorokiniana*, impedindo a podridão radicular em experimento em casa de vegetação e promoveram o crescimento das plantas de trigo. Portanto, pode-se sugerir que estes isolados de *Streptomyces* tem potencial para serem usados como agentes de biocontrole das doenças causadas por *B. sorokiniana*. Ensaio utilizando uma mistura dos dois isolados de actinobactéria e testes a campo para confirmação dos resultados obtidos são sugeridos para trabalhos futuros.

7. CONCLUSÃO

1. O isolado de *Streptomyces* R18(6) mostrou atividade antifúngica contra *B. sorokiniana* pelo método da dupla-camada e cultura pareada.
2. O isolado de *Streptomyces* 6(4) mostrou atividade antifúngica contra *B. sorokiniana* pelo método da cultura pareada.
3. O isolado 6(4) foi capaz de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio, produzir ácido indol-acético e sideróforos. O isolado R18(6) não produziu sideróforos.
4. Os dois isolados de actinobactéria foram capazes de colonizar as raízes de trigo observadas tanto no ensaio em placa quanto no ensaio em casa de vegetação, visualizado por microscopia eletrônica de varredura.
5. Estes isolados de actinobactéria mostraram potencial na ação do biocontrole da mancha marrom e podridão da raiz causada por *B.sorokiniana* em plantas de trigo.
6. Os isolados 6(4) e R18(6) foram capazes de promover o crescimento vegetal nas condições estudadas.

8. REFERÊNCIAS

- Abdel-Fattah GM, Mohamedin AH. 2000. Interaction between a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brown scales. *Biol. Fertil. Soils* 32 : 401-09.
- Agrios GN. 1997. **Plant pathology**. 4 ed. New York. Academic Press. 635p.
- Alcorn, JL. 1982. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Mycotaxon*. 17:186-92.
- Ambarwati A, Sembiring L, Soegihardjo C. 2012. Antibiotic produced by streptomycetes associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(1): 52-57.
- Araújo JM. 1998. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo IS e Azevedo JL (Org). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, Embrapa CNPMA. 367p.
- Atalan E, Manfio GP, Ward AC, Kroppenstedt RM, Goodfellow M (2000) Biosystematic studies on novel *Streptomyces* from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77(4): 337–53.
- Bais HPSW, Park TL, Weir RM, Callaway JM, Vivanco. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9:26–32.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, Wezel GPV. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(1):1-43.
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: APS Press.
- Basil AJ, Janice L, Heather S, Smith MK, Crawford DL (2004). Studies on the microbial populations of the rizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*). *Journal of Industrial Microbiology and Botecnology*. 31:278-88.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiotics*. 58(1):1-26.
- BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social. JÚNIOR C. de J, SIDONIO L, MORAES VEG. **Panorama das importações de trigo no Brasil**. BNDES. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/1602/1/A%20BS%2034%20Panorama%20das%20importa%C3%A7%C3%B5es%20de%20trigo%20no%20Brasil_P.pdf> Acesso em: 1 fev. 2016.
- Boddey RM, Oliveira OC, Alves BJR. 1995. Field application of the ¹⁵N isotope

- dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. *Fert. Res.* 42(1):77-87.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise Sanitária de Sementes.** Secretaria de Defesa Agropecuária. 1ed.Brasília: Mapa/ACS. 200p.
- Carrillo-Castañeda G, Juárez Muños J, Peralta-Videa JR, Gomez E, Tiemannb KJ, Duarte-Gardea M, Gardea-Torresdey JL .2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Adv Environ Res.* 6:391-99.
- Casa RT, Hoffmann LL, Panisson E, Mendes CC e Reis EM. 2002. Sensibilidade de *Blumeria graminis* f.sp. tritici a alguns fungicidas. *Fitopatol. Bras.* 27:626-30.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34:171-98.
- Crawford DL, Lynch J, Whipps J, Ousley M. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3889–3905.
- Cunha GR. 1999. El Niño – Oscilação do Sul e perspectivas climáticas aplicadas no manejo de culturas no sul do Brasil. *Revis. Bras. Agromet.* 7(2): 277-84.
- Diehl JA, Tinline RD, Kochhann RA, Shipton PJ, Rovira AD. 1982. The effect of fallow periods on common root rot of wheat in Rio Grande do Sul, Brazil. *Phytopathology.* 72:1297–301.
- Doumbou CL, Salove Hamby MK, Crawford DL, Beaulieu C.2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* 82(3): 85-102.
- Dowling DN, Sexton R, Fenton A, Delany I, Fedi S, McHugh B, Callanan M, Mognne-Loccoz Y, O'Gara F. 1996. **Iron regulation in plant-associated *Pseudomonas fluorescens* M114 : implications for biological control.** In: Nakazawa T, Furukawa K, Haas D, Silver S (Eds.) *Molecular Biology of Pseudomonads* Washington. DC: American Society for Microbiology. 502-11.
- Duveiller E, Kaudel YR, Sharma RC, Shrestha SM. 2005. Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. *Phytopathology.* 95: 248-56.
- Ellis MB. 1971. **Dematiaceous Hyphomycetes.** Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute (CAB).
- El-Tarabilya KA, Sivasithamparam K. 2005. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil. Biol. Biochem.* 38:1505–20.
- Embrapa. Embrapa Meio Ambiente. **Produtos Comerciais à Base de Agentes**

- de Biocontrole de Doenças de Plantas.** 2012. Jaguariúna, SP. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66628/1/Doc-88-1.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- Embrapa Trigo. **Trigo.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/trigo/cultivos>> Acesso em: 12 fev. 2016.
- Fetch TGJR, Steffenson BJ. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. Plant. Dis. 83(3):213-17.
- Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodríguez MX, Barea JM. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Appl. Soil. Ecol. 45:209-17.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41:109-17.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specific of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61:793-96.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Vidya M.S, Rathore A (2013) Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. Springer Plus.2: 574.
- Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Kudapa H, Katta K, Varshney RK. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. Microbiology Research.169: 40-8.
- Goodfellow M, Cross T. 1984. **The Biology of the Actinomycetes: Classification.** In: Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST. (Eds.). London: Academic Press. 91p.
- Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. 26:192.
- Grigoletti Júnior A, dos Santos AF, Auer CG. 2000. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta. 30(12):155-65.
- Groth I, Vettermann R, Schuetze B, Schumann P, SAIZ-JIMENEZ C. 1999. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). J. Microbiol. Met. 36(1-2): 115-22.
- Gupta R, Saxena RK, Chaturvedi P, Viridi JS. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potencial in fungal cell wall lysis. J. Appl. Microbiol. 79(4):378-83.
- Haas D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing

- Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annu.Rev. Phytopathol. 41:117-53.
- Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, VirolleMJ, Ouhdouch Y. 2008 a. Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. Appl. Soil. Ecol. 38:12–19
- Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y. 2008 b. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. Appl. Soil. Ecol. 40:510–17.
- Harikrishnan H, Shanmugaiah V and Balasubramanian N. 2014. Optimization for production of Indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting *Streptomyces* sp VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere. Int. J. Curr Microbiol.App. Sci. 3(8): 158-71.
- Harthmann OEL. 2009. **Microbiolização de sementes com rizobactérias na produção de cebola**. Universidade Federal do Paraná. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Hassanin SM, El-Mehalawy AA, Hassanin NM, Zaki SA. 2007. Induction of resistance and biocontrol of rhizoctonia in cotton damping-off disease by rhizosphere bacteria and actinomycetes. Internet J Microbiol. 3(2).
- Helistö P, Aktuganov G, Galimzianova N, Melentjev A, Kopela T. 2001. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: isolation and purification of components. J. Chromatography B. 758:197-205.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. 1997. Analysis of actinomicete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol. 63(8):3233-41.
- Hong K., Gao A, Xie Q, Gao H, Zhuang L, Yu H, Mand Ruan J. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolation from Mangrove soils and plants in china microbiological research. Mar Drugs., 7(1): 24-44.
- Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of schitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. Appl.Microbiol. Biotech. 66: 434-42.
- Jacobsen BJ, Zidack NK, Larson BJ. 2004. The Role of *Bacillus*-Based Biological Control Agents in Integrated Pest Management Systems: Plant Diseases. Phytopathology 94(11):1272-75.
- Javaid I, Ashraf M. 1977. Wheat diseases in Zambia, 1973-1976. Plant Dis Rep. 61:953-54.
- Joo GJ. 2005. Purification and characterization of na extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. Biotechnol

- Lett. 25:1483-86.
- Jüttner F, Watson S. 2007. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(14): 4395-4406
- Khan AM, Saxena SK, Siddiqi ZA. 1971 Efficacy of *Tagetes erecta* in reducing root infesting nematodes of tomato and okra. *Indian Phytopathology.* 24:166-69.
- Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A. (Eds.). 1997. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** Agronômica Ceres. 2: 631-38.
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* 286: 885–86.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6:1244-51.
- Kumar J, Schäfer P, Hückelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Kogel KH. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Mol. Plant.Pathol.* 3(4):185-95.
- Lu D, Ma Z, Xu X, Yu X. 2016. Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *J. Basic Microbiol.* 56:1-5.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Sundaram S, Sa T . 2009. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. *Microbiol Res.* 164(1):114–20
- Mahadevan B, Crawford DL. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb Tech.* 20:489-93.
- Malik VK, Chauhan, RS, Dalal V, Singal I. 2014. Effect of Different Environmental Conditions on Development of Leaf Blight Caused by *Bipolaris sorokiniana* on a Range of Varieties under Field Condition. *Ann Agri-Bio Res.* 3(19):508-10.
- MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>> Acesso em: 16 agosto 2016.
- Maraite H. 1998. Evolution of the nomenclature used for *Helminthosporium* spp. causing leaf blight of wheat. In: Duveiller, E.; Dubin, H.J.; Reeves, J. & McNab (Ed.). ***Helminthosporium* blights of wheat: spot blotch and tanspot.** Proceeding of an International Workshop Held at CIMMYT. 6-9p.

- Matsukawa, E. Nakagawa, Y. and Limura, Y. 2007. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetol.* 21:32- 39.
- Mehta YR. 1978. **Doenças do trigo e seu controle.** São Paulo: Agronômica Ceres, 190p.
- Mehta YR. 1993. **Manejo integrado de enfermidades del trigo.** Santa Cruz de la Sierra. 314p.
- Merzaeva OV, Shirokikh IG. 2006. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. *Microbiology.* 75: 226–30.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. Trigo. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>. Acesso em: 29 abr. 2016.
- Minotto E, Mann MB, Vélez-Martin E, Feltrin T, Milagre LP, Spadari C, Van Der Sand ST. 2014a. Patogenicity of monosporic and polysporic *Bipolaris sorokiniana* isolates to wheat seed and seedling under controlled conditions. *A. J. Microbiol. Res.* 8(28): 2697-704.
- Minotto E, Milagre LP, Spadari C, Feltrin T, Van Der Sand, ST. 2014b. **Caracterização parcial de compostos bioativos produzidos por actinomicetos com potencial para utilização no biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Moura AB, Romeiro RS, Neves MCP. 1998. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Raltonia solanacearum*, em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 3(12):2065-72.
- Nautiyal CS. 1999. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 70:265-70.
- Noyd RK. (Ed). 2000. **Mycology reference cards.** Minnesota: APS Press.
- Oliveira MF, Germano M, Van Der Sand ST. 2010. Anti-phytopathogen potential 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 Microbiol.* 161:365.
- Palaniyandi AS, Yang SH, Zhang L, Suh JW. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol.* Mini-review. 1-16.
- Palaniyandi SA, Damodharan K, Yang SH, Suh JW. 2014. *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *J. Appl. Microbiol.* 117: 766-773.
- Palazzini JM, Alberione E, Torres A, Donat C, Köhl J, Chulze S. 2016.

- Biological control of *Fusarium* head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. *Biol Control*. 94: 56-61.
- Patten CL, Glick BR. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68(8):3795–3801.
- Paulitz TC. 1990 Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: Baker, R. R. (Ed.) **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Liss. 724p.
- Paulitz TC, Belanger RR. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:103–33
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5(5):308–16.
- Procópio REL, Silva da IR, Martins MK, Azevedo de JL, Araújo de JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16(5): 466-71.
- Queiroz BPVD, Aguilar-Vildoso CI, Melo IS. 2006. Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias. *Summa Phytopathologica*. 32(1): 95-7.
- Rashid AQMB, Dhar RC, Khalequzzaman KM. 2004. Association of *Bipolaris sorokiniana* in wheat seed and its effect on subsequent plant infection at different growth stages. *J Agri Rural Deve*. 2(1): 67-72.
- Raza W, Faheem M, Yousaf S, Faheem UR, Yamin M. 2013. Volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Sci. Lett.* (1): 21-24.
- Reis EM. (Ed). 1988. **Doenças do trigo. I – Podridão comum de raízes. Helminthosporiose**. CNDA. 20p.
- Reis EM. 1982. Sementes de trigo infectadas por *Helminthosporium sativum*: fonte de inóculo para a podridão comum de raízes e seu controle pelo tratamento com fungicidas. *Summa Phytopathol*, 8:29-38.
- Reis EM, Casa RT, Medeiros CA. (Eds). 2001. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. ES Comunicação. 94p.
- Reis EM, Casa RT. 2005. Doenças do trigo. In: Kimati H, et al. (Eds). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. 638p.
- Richardson AE. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*. 28(9): 897–906.

- Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17:319–39.
- Romeiro RS. (Ed). 2007. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV. 269p.
- Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL. 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 38:1-3.
- Sadeghi A, Karimi E, Dahaji PA, Javid MG, Dalvand Y, Askari H. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *W. J. Microbiol Biotechnol.* 28: 503-1509.
- Sahli AAA., Abdulkhair MW. 2012. Biocontrol of *Fusarium udum* diseases for some wheat cultivars by *Streptomyces spororaveus*. *Afr. J. Micro. Res.* 6(1): 190-196.
- Sangdee A, Kornphachara S, SRISAWAT N. 2016. *In vitro* screening of antagonistic activity of soil *Streptomyces* against plant pathogenic fungi and assessment of its characters. *J. Agr. Tech.* 12(1):173-85.
- Sardi P, Saracchi M, Quaroni B, Petrolini B, Borgonovi, Nesli S (1992) Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilised roots. *Applied an Environmental Microbiology.* 58:2691-98.
- Schippers B, Bakker AW, Bakker AHM. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practice. *A. Rev. Phytopathol.* 25: 339–58.
- Schneider RW. (Ed). 1982. **Suppressive Soils and plant Disease**. São Paulo: American Phytopathological Society. 88p.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47-56.
- Shen T, Wang C, Yang H, Deng Z, Wang S, Shen B, Shen Q. 2016. Identification, solid-state fermentation and biocontrol effects of *Streptomyces hygroscopicus* B04 on strawberry root rot. *Appl. Soil. Ecol.* 103: 36-46.
- Shrivastava P, Kumar R, Yandigeri MS. 2015. *In vitro* biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi. J Biol Sci.* Disponível em:< http://ac.els-cdn.com/S1319562X1500296X/1-s2.0-S1319562X1500296X-main.pdf?_tid=ea7e897c-f13a-11e5-b82b-00000aab0f6b&acdnat=1458767284_051d8efc29268f528c0d8b8ed34444c4> Acesso em 23 Mar. 2016.
- Shoemaker RA. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminosporium*. *Can. J. Bot.* 37(5): 879–87.
- Silva-Stenico ME, Pacheco FTH, Rodrigues JLM, Carrilho E, Tsai SM. 2005.

- Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol. Research*. 160:429-36.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*. 158:1-261.
- Sjöberg J, Martensson A, Persson P. 2007. Are field populations of arbuscular mycorrhizal fungi able to suppress the transmission of seed-borne *Bipolaris sorokiniana* to aerial plant parts. *Eur. J. Plant. Pathol.* 117(1):45-55.
- Strzelczyk, E. and Pokojska-Burdziej, A. 1984. Production of auxin and gibberellins- like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant. and Soil*. 81: 185-94.
- Strange RN., Smith H. 1971. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiol Plant Pathol.* 1:141-50.
- Stubbs RW; Prescott JM, Saari EE, Dubin HJ. 1986. **Manual de metodología sobre las enfermedades de los cereales**. México. CIMMYT. 46p.
- Sutton JC. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. of Plant. Pathol.* 4:195-209.
- Suzuki S, Yamamoto K, Okuda T, Nishio M, Nakanishi N, Komatsubara S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinomyces rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetology*. 14:27–33.
- Taechowisan T, Peberdy JF, Lumyong S. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *W. J. Microbiol. Biotech.* 19:381-85.
- Tamreihao K, Ningthoujam DS, Nimaichand S, Singh ES, Reena P, Singh SH, Nogthomba U. 2016. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiol. Res.* 192:260-70.
- Tinline RD, Wildermuth GB, Spurr DT. 1988. Inoculum density of *Cochliobolus sativus* in soil and common root rot of wheat cultivars in Queensland. *Aust. J. Agr. Res.* 39:569–77.
- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2161-71.
- Toumatia O, Compant S, Yekkour A, Goudjal Y, Sabaou N, Mathieu F, Sessitsch A, Zitouni A. 2016. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *S Afr J Bot.* 105: 234-39.
- Van Loon LC. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria.

- Eur J plant Pathol. 119:243:54.
- Vieira Júnior JR. 2005. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Whipps JM, Lynch JM. 1986. The influence of the rhizosphere on crop productivity. *Adv. Microbiol. Ecol.* 6:187-244.
- Yin SY, Chang JK, Xun PC. 1965. Studies in the mechanisms of antagonistic fertilizer “5406.” IV. The distribution of the antagonist in soil and its influence on the rhizosphere. *Acta Microbiol. Sin.* 11:259–88.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res*, 14:415-21.
- Zago VCP, De-Polli H, Rumjanek NG. 2000. **Pseudomonas spp. fluorescentes-bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa-CNPAB. Documento, 127).
- Zillinsky FJ. 1984. **Guía para la identificación de enfermidades em cereales de grano pequeño**. CIMMYT. México. 141p.

9. ANEXOS

I – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DO CORANTE COMPLEXO CROMO AZUROL (CAS):

60,5 mg de CAS [CAS/ iron (III)/ hexadeciltrimetil amônio brometo] em 50 mL de água destilada, adicionar a 10 mL de solução FeCl_3 , colocar a solução em agitação e adicionar vagarosamente uma solução de 72,9 mg de Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) previamente dissolvido em 40 mL de água, autoclavado por 15 min.

II – SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES:

0,2 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,235 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,28 g H_3BO_3 , 0,008 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 L de água destilada.

III – PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA MEV:

Fixação:

Glutaraldeído 25% ----- 1,2 mL

Tampão Fosfato 0,2 M ----- 5,0 mL

H_2O destilada ----- 2,8 mL

- A fixação do material, por imersão, deve ser feita imediatamente após a coleta. O período de fixação varia conforme a amostra. Sugere-se de no mínimo uma semana.

Lavagem:

Tampão Fosfato 0,2 M + H_2O destilada proporção de 1:1

- O material deve passar por 3 lavagens (30 min/cada).

Desidratação:

Acetona 30% ----- 10 min.

Acetona 50% ----- 10 min.

Acetona 70% ----- 10 min.
Acetona 90% ----- 10 min.
Acetona 90% ----- 20 min.
Acetona 100% ----- 10 min.
Acetona 100% ----- 20 min.

Dessecação:

- No aparelho de Ponto Crítico, seguir exatamente o que diz o manual. Para se obter principalmente uma boa imagem ao Microscópio, esta etapa é de suma importância. Caso não tenha experiência com o equipamento peça auxílio ao técnico responsável. No CME utilizamos um CRITICAL POINT DRYER da BALZERS CPD030. Após o Ponto Crítico as peças deverão ser colocadas no Stub, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização do ponto ou área de interesse, peça ajuda ao técnico para orientação na escolha do Stub.

Metalização:

- Esta etapa é feita na Metalizadora, tornamos o material condutivo por meio de deposição de um metal sobre a amostra. No CME temos alvo de ouro e de platina. Para uma boa cobertura deve-se seguir exatamente o que diz o manual, caso não tenha experiência com o equipamento peça auxílio ao técnico responsável.

No CME utilizamos um SPUTTER COATER da BALZERS SCD050.