

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas  
de rizosfera de *Araucaria angustifolia***

**Marina Yumi Horta Miyauchi**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2012**

Marina Yumi Horta Miyauchi  
Bióloga

**Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera  
de *Araucaria angustifolia***

Orientador:  
Profa. Dra **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada para obtenção do título  
Doutor em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia agrícola

**Piracicaba  
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Miyauchi , Marina Yumi Horta Miyauchi

Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia*/ Marina Yumi Horta Miyauchi Miyauchi - - Piracicaba, 2012.  
105 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Actinomycetales 2. Agentes antimicrobianos 3. Antagonistas 4. Coníferas  
5. Controle biológico 6. Fungos fitopatogênicos 7. Fungos micorrízicos 8. Pinheiro  
9. Rizosfera 10. Tombamento (Doença de planta) I. Título

CDD 589.92  
M685b

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha orientadora pela oportunidade de realizar este trabalho que muito me acrescentou, tanto na vida profissional quanto pessoal, e também por dar o apoio que um orientado realmente necessita para realizar o trabalho, sendo firme sem ser controladora, e deixando-me livre sem, no entanto, me abandonar. Assim pude crescer e aprender. A senhora é uma excelente educadora.

Também gostaria de agradecer minha família por todo o apoio que me deram durante minha formação acadêmica e toda a minha vida, por mais eradas que fossem minhas escolhas, sempre souberam ajudar, seja apenas ouvindo ou mesmo bronqueando. Ainda dentro da minha família, gostaria de agradecer em especial meu marido, que deixou sua família, sua cidade, seu emprego, para vir comigo para Piracicaba, para estar ao meu lado e me apoiar nesta “loucura” que é um doutorado.

Por fim gostaria de agradecer todos os amigos que direta ou indiretamente me auxiliaram neste trabalho (desculpem-me se deixei algum nome para trás... minha memória é um caos, vocês sabem): Rafael Vasconcellos, Carlos Ribeiro, Cristiane Alcantara, Daniel Bini, Daniel Lammel, Denise Mescoloti, Fernando Baldez, Joice Bonfim, Jamil Pereira, Gustavo Lanza, Gabi Garrafa, Ana Sorveteira, Julia Segat, André Nakatani, Dani, Thiago Gumiere, Elisa Matos, Maryeimy Varon, Mylenne Pinheiro, Rafael Valadares, Alexandre Martines, Paulo Roger, Marco Nogueira, Fernando Andreote.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE SIGLAS .....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO .....	21
2.1 Revisão bibliográfica .....	21
2.1.1 Coníferas.....	21
2.1.2 Interação raiz-micro-organismos .....	24
2.1.3 Doenças em coníferas.....	26
2.1.4 Biocontrole .....	28
2.2 Material e Métodos.....	31
2.2.1 Coleta e isolamento de actinobactérias.....	31
2.2.2 Teste de antagonismo e seleção de isolados.....	32
2.2.3 Produção de substâncias antimicrobianas .....	35
2.2.4 Interações entre actinobactérias e outros organismos: microrganismos benéficos e coníferas. ....	36
2.2.4.1 Interação com RPCP e fungos micorrízicos .....	36
2.2.4.2 Coníferas.....	40
2.2.5 Antagonismo <i>in vivo</i> .....	41
2.2.6 Veículos de multiplicação e manutenção para preparo de inoculante de actinobactérias. ....	42
2.2.7 Identificação molecular dos isolados .....	43
2.2.7.1 Extração do DNA genômico .....	43

2.2.7.2 Amplificação do 16S rRNA .....	44
2.2.7.3 Purificação dos fragmentos de DNA e quantificação em gel de agarose .....	44
2.2.7.4 Processamento das sequências e anotação .....	44
2.2.8 Análise dos dados.....	45
2.3 Resultados e discussão .....	45
2.3.1 Isolamento, antagonismo e seleção.....	45
2.3.2 Produção de substâncias antimicrobianas.....	56
2.3.3 Interações entre actinobactérias e outros organismos: microrganismos benéficos e coníferas.....	59
2.3.3.1 Interação com RPCP e fungos micorrízicos .....	59
2.3.3.2 Interação com coníferas .....	66
2.3.4 Antagonismo <i>in vivo</i> .....	73
2.3.5 Veículos de multiplicação e manutenção para preparo de inoculante de actinobactérias.....	76
2.3.6 Identificação molecular dos isolados .....	84
3 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS .....	93

## RESUMO

### Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia*

Algumas actinobactérias habitantes da rizosfera são produtoras de substâncias capazes de combater micro-organismos patogênicos às plantas, o que as torna potenciais agentes de controle biológico, passíveis de serem utilizadas como princípio ativo de inoculantes de sementes e mudas. O presente trabalho teve como objetivo isolar e avaliar o potencial de isolados de actinobactérias no controle de doenças causadas por fungos nas espécies arbóreas *Araucaria angustifolia* (Araucária) e *Pinus elliottii* (Pinus). Além disso, foi iniciado o estudo do processo de elaboração de inoculante a base de actinobactérias antagônicas. Foram isoladas 215 estirpes de actinobactérias do rizoplano da Araucária, das quais 13 apresentaram, em testes *in vitro*, potencial como antagonistas contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladium candelabrum*, *C. pteridis* e *Armillaria* sp., e apenas os isolados Ac136 e Ac202 apresentaram os maiores valores de inibição nos testes com os quatro patógenos. Na avaliação de produção de algumas substâncias antimicrobianas, apenas celulases, quitinases e sideróforos foram produzidas pelos isolados, sendo este último o mais frequente. Nos testes de interação com organismos foi verificado que, embora os isolados de actinobactéria tenham inibido a germinação de esporos do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Gigaspora rosea* em teste *in vitro*, no experimento *in vivo*, em que foi utilizado o milho como planta hospedeira para inoculação com o FMA e os isolados A43, Ac136 e Ac202, os isolados Ac136 e Ac202 estimularam a colonização das raízes pelo FMA. Estes mesmos isolados também estimularam a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de Pinus, porém prejudicaram a germinação e desenvolvimento inicial de Araucária. Estes mesmos isolados foram capazes de reduzir a mortalidade de plântulas de Pinus em cerca de 25%, e esta diminuição foi atribuída à inibição de *Fusarium* sp.. No teste de viabilidade dos isolados em diferentes veículos o isolado que mostrou maior sobrevivência foi o Ac202, mantendo um número de propágulos viáveis correspondente a  $5,48 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ , enquanto que o veículo mais apropriado para a elaboração de inoculante com actinobactérias foi a glicerina. A análise molecular mostrou que os isolados mais promissores apresentaram maior similaridade com *S. kasugaensis*. Dentre todos isolados Ac202 (*S. kasugaensis*) foi o mais promissor obtido neste trabalho para o uso como agente de biocontrole de doenças causadas por fungos, apresentando forte antagonismo contra os quatro patógenos testados, promovendo a germinação e desenvolvimento inicial de Pinus e aumentando a sobrevivência de plântulas contaminadas com fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: Coníferas; Antagonismo; Damping-off; Inoculante; Substâncias antimicrobianas; Interação; Fungo micorrízico arbuscular



## ABSTRACT

### **Biocontrol of phytopathogenic fungi by actinobacteria isolated from rhizosphere of *Araucaria angustifolia***

Some actinobacteria that inhabits the rhizosphere are producers of substances that are capable of combating plant-pathogenic microorganisms, what makes them potential biological control agents, which can be used as the active ingredient of seeds and seedlings inoculants. This study aimed to isolate and evaluate the potential of actinobacteria isolates in controlling diseases caused by fungi in *Araucaria angustifolia* and *Pinus elliotii*. In addition, the study initiated the process of elaboration of an actinobacteria-based inoculant. 215 actinobacterial strains were isolated from the Araucaria's rhizoplane, and 13 of them showed potential as antagonists against the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladium candelabrum*, *C. pteridis* and *Armillaria* sp. in *in vitro* tests, and only the Ac136 and Ac202 strains showed the highest inhibition in the tests against the four pathogens. Among the antimicrobial substances tested, only cellulases, chitinases and siderophores were produced, with the latter being the most frequent. In the interaction tests with other organisms it was found that although the actinobacterial strains have inhibited the germination of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Gigaspora rosea* spores on the *in vitro* test, the *in vivo* experiment, with maize as host plant, inoculated with the AMF and A43, Ac136 and Ac202 actinobacterial strains, Ac136 and Ac202 stimulated root colonization by AMF. These strains also stimulated Pinus seed germination and seedling early development, but hindered the germination and early development of Araucaria. In addition, the same strains were able to reduce the mortality of pine seedlings by about 25%, and this decrease was attributed to the inhibition of *Fusarium* sp.. In the viability test of the strains in different vehicles the strain that showed the greatest shelf-life was Ac202, with 5.48 log CFU mL<sup>-1</sup>, and the most appropriate vehicle for the actinobacteria-based inoculant development was glycerin. Molecular analysis showed that the most promising isolates showed the greatest similarity with *S. kasugaensis*. Among all strains Ac202 (*S. kasugaensis*) was the most promising one for the use as biocontrol agent of fungal diseases, exhibiting a strong antagonism against the four pathogens tested, promoting germination and early development of Pinus and increasing survival of seedlings infected with pathogenic fungi.

Keywords: Conifers; Antagonism; Damping-off; Inoculum; Antimicrobial substances; Interaction; Arbuscular mycorrhizal fungi



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição de coníferas no mundo (adaptado de Farjon, 1999).....	21
Figura 2 -	Distribuição natural e atual das florestas de araucária no Brasil (Fonte: CN-RBMA - Projeto Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica).....	23
Figura 3 -	Estados onde há plantio de Pinus no Brasil em cinza escuro (Adaptado de: BRACELPA – 2011).....	24
Figura 4 -	Sintomas das doenças causadas por fungos fitopatogênicos dos gêneros <i>Fusarium</i> (A), <i>Cylindrocladium</i> (B) e <i>Armillaria</i> (C), em Pinus.....	28
Figura 5 -	Local de coleta. Imagens de satélite: <a href="http://www.google.com">www.google.com</a> . Fotos: Carlos Marcelo Ribeiro.....	31
Figura 6 -	Patógenos utilizados nos testes de antagonismo: <i>F. oxysporum</i> (A), <i>Cylindrocladium candelabrum</i> (B), <i>C. pteridis</i> (C) e <i>Armillaria</i> sp. (D).....	33
Figura 7 -	Teste qualitativo (A) e quantitativo (B) para avaliação de atividade antagônica de actinobactérias contra fungos fitopatogênicos.....	35
Figura 8 -	Esquema explicativo do teste de camada dupla. Inoculação de três estrias de actinobactérias (A), disposição da segunda camada após a fumigação (B), estriamento das RPCP sobre a segunda camada (C).....	37
Figura 9 -	Esquema explicativo do teste <i>in vitro</i> de germinação de esporos. Inoculação de isolado de actinobactéria em poço contendo meio YCED (A), esporos dispostos em linhas a 7 mm (B) e 14 mm (C) do inóculo bacteriano.....	38
Figura 10 -	Placa com meio YCED após o plaqueamento da diluição do solo e incubação (A) e placa com meio ISP2 estriada com isolado actinobacteriano após a purificação (B). É possível ver, na placa A, uma colônia característica de actinobactérias indicada pela seta vermelha.....	46
Figura 11 -	Teste qualitativo de antagonismo por pareamento em placa de	

- isolados de actinobactérias contra *F. oxysporum* (A) e *C. candelabrum* (B). É possível ver na placa com *F. oxysporum* dois isolados que não apresentam inibição (1 e 2) e dois que apresentam (3 e 4), assim como na placa com *C. candelabrum*, com dois isolados que não inibem (5 e 8) e dois que inibem (6 e 7).....48
- Figura 12 - Imagens em aumento de 8X das colônias das 13 actinobactérias com melhor desempenho no antagonismo aos dois fungos fitopatogênicos testados.....49
- Figura 13 - Inibição percentual do crescimento micelial de *F. oxysporum* (A) e *C. candelabrum* (B) por isolados de actinobactérias. As barras representam o desvio padrão das médias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente.....51
- Figura 14 - Teste quantitativo de antagonismo por pareamento em placa de isolados de actinobactéria (isolado Ac202) contra *F. oxysporum* (A) e *C. candelabrum* (B).....52
- Figura 15 - Inibição percentual do crescimento micelial de *C. pteridis* (A) e *Armillaria* sp. (B) por isolados de actinobactérias em meio líquido. As barras representam o desvio padrão das médias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente.....53
- Figura 16 - Interação entre isolados de actinobactéria e RPCP. Isolados B4 e RISP2 estriados em placa sem inoculação de actinobactéria (A), isolado de actinobactéria sem atividade inibidora sobre os isolados de RPCP (B) e isolado de actinobactéria com atividade inibidora sobre RPCP (C).....59
- Figura 17 - inibição de crescimento do fungo ectomicorrízico *Suillus brevipes* por actinobactérias. Controle (A), A43 (B) e Ac 8 (C).....60
- Figura 18 - Resultado do teste de Duncan para germinação de esporos de *Gigaspora rosea* em placas de petri inoculadas com isolados de actinobactéria na distância de 7 mm. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si

	(P<0.05).....	62
Figura 19 -	Porcentagem de colonização das raízes de <i>Pinus elliottii</i> por <i>S. brevipes</i> na presença e ausência de actinobactérias.....	63
Figura 20 -	Porcentagem de colonização das raízes de <i>Zea mays</i> por <i>G. rosea</i> na presença e ausência de actinobactérias.....	64
Figura 21 -	Número de esporos por grama de solo seco produzido por <i>G. rosea</i> sem inoculação de bactérias (FMA) e com inoculação dos isolados A43, Ac136, Ac202.....	65
Figura 22 -	Porcentagem de germinação de sementes de Pinus aos 10, 15, 20 e 25 dias (A) e de germinação de sementes de Araucária aos 7 e aos 30 dias (B), na presença ou não de actinobactérias antagonistas a fungos fitopatogênicos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, P<0.05).....	68
Figura 23 -	Desenvolvimento inicial de mudas de Pinus aos 25 dias (A) e Araucária aos 30 dias (B), avaliado através da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plantas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, P<0.05).....	70
Figura 24 -	Mortalidade de mudas de Pinus e Araucária tratadas com isolados de actinobactéria, avaliada aos 25 e 30 dias da semeadura, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, P<0.05).....	72
Figura 25 -	Muda de Pinus do tratamento controle apresentando sintomas de <i>Damping-off</i> : apodrecimento da raiz e base do caule, levando a planta ao tombamento e morte.....	74
Figura 26 -	<i>Damping-off</i> causado pelo fungo isolado das plantas tombadas em experimento de germinação e desenvolvimento inicial. À esquerda planta inoculada com o fungo e à direita planta não inoculada.....	75
Figura 27 -	Curva de crescimento dos isolados A43, Ac136 e Ac202, determinada por contagem de	

	UFC.....	78
Figura 28 -	Número viável de bactérias nos inoculantes em função do tempo de estocagem, onde T0 é o número de células viáveis no momento da confecção dos inoculantes, T1 = 24h após a confecção, T2 = 1 mês, T3 = 2 meses, T4 = 3 meses, T5 = 4 meses, T6 = 5 meses e T7 = 6 meses.....	80
Figura 29 -	Sobrevivência das bactérias em estocagem à temperatura ambiente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, P<0.05) .....	81
Figura 30 -	Desempenho geral dos diferentes veículos para elaboração de inoculante considerando os diferentes isolados em conjunto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, P<0.05).....	82
Figura 31 -	Sobrevivência dos isolados durante o período de estocagem à temperatura ambiente.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fungos fitopatogênicos utilizados neste trabalho, gentilmente cedidos por colaboradores.....	33
Tabela 2 -	Micro-organismos benéficos utilizados nos testes de interação com isolados de actinobactérias.....	35
Tabela 3 -	Composição do Tampão de Extração A para cada 10 amostras.....	42
Tabela 4 -	Medida do halo de inibição dos 56 isolados actinobacterianos capazes de inibir o crescimento de <i>F. oxysporum</i> (F.o.) e <i>C. candelabrum</i> (C.c.).....	46
Tabela 5 -	Comparação entre desempenho de dois meios na seleção de actinobactérias antagonistas a fungos fitopatogênicos. % F.o. = porcentagem do total de actinobactérias isoladas em cada um dos meios de cultura capazes de controlar <i>F. oxysporum</i> ; %C.c. = porcentagem de actinobactérias capazes de controlar <i>F. oxysporum</i> capazes de controlar <i>C. candelabrum</i> ; H F.o. = média dos halos de inibição de <i>F. oxysporum</i> aos 5 dias; H C.c. = média dos halos de inibição de <i>C. candelabrum</i> aos 5 dias.....	48
Tabela 6 -	Isolados mais eficientes na inibição de crescimento de cada um dos patógenos. Em negrito encontram-se os isolados que apresentaram os melhores resultados nos testes de inibição para todos os 4 fungos.....	53
Tabela 7 -	Tempo de incubação necessário para a obtenção de número de células viáveis correspondente a $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> .....	77
Tabela 8 -	Número de células viáveis de cada isolado individualmente nos diferentes veículos.....	81
Tabela 9 -	resultado da análise das sequências pelo aplicativo “Classifier” do RDPII.....	83
Tabela 10 -	Análise das sequências pelo aplicativo Blast do GeneBank.....	85



## LISTA DE SIGLAS

- AIA - Ácido Indol Acético  
ARDRA - Amplified rDNA Restriction Analysis  
BD - Batata Dextrose  
BDA - Agar Batata Dextrose  
C.c. - *Cylindrocladium candelabrum*  
CAS- Chromo Azurol S  
CIA - Chloroform Isoamyl Alcohol  
CMC - Carboximetilcelulose  
Col - Colágeno  
Dest - Água Destilada  
DNA - Ácido Desoxirribonucléico  
EDTA – Ethylene Diamine Tetraacetic Acid  
EM - Fungos Ectomicorrízicos  
ES - Extrato de Solo  
F.o - *Fusarium oxysporum*  
Filt - Água Filtrada  
FMA - Fungo Micorrízico Arbuscular  
Gli - Glicerina  
H.C.c. - Halo *Cylindrocladium candelabrum*  
H.F.o. - Halo *Fusarium oxysporum*  
HCN - Ácido Cianídrico  
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
IPEF- Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais  
ISP2 - International *Streptomyces* Project - 2  
KB - King's medium B  
MHB - Mycorrhiza Helper Bacteria  
MNM - Merlin Norkrans Media  
pb - pares de base  
RDPII - Ribossomal Database Project  
RPCP- Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas  
RPM - Rotações Por Minuto

rRNA - Ribosomal Ribonucleic Acid

TE - Tris-EDTA

TSA - Tryptone Soy Agar

UFC - Unidade Formadora de Colônias

YCED - Yeast Casaminoacids Extract and Dextrose

## 1 INTRODUÇÃO

O controle biológico de fitopatógenos vem sendo estudado amplamente devido à preocupação crescente com as consequências do uso de pesticidas. Porém, os estudos se concentram em plantas de interesse agrícola, como hortaliças e grãos, deixando uma carência de trabalhos envolvendo espécies arbóreas, principalmente do grupo das coníferas.

As coníferas possuem grande interesse econômico e ambiental, estando distribuídas em todo mundo, com exceção do continente antártico. Espécies do gênero *Pinus* são amplamente utilizadas na indústria de celulose de fibra longa, construção civil e indústria moveleira. *Pinus elliottii*, natural da América do Norte, é uma das principais espécies de pinheiro plantadas em reflorestamentos no Brasil, tendo sido introduzida nos estados do Sul e Sudeste do Brasil e Mato Grosso do Sul. Já outras espécies, como *Araucaria angustifolia*, uma conífera tipicamente brasileira, de ocorrência apenas na América do Sul, encontra-se ameaçada de extinção devido à exploração indiscriminada de sua madeira e de suas sementes. O reflorestamento com esta espécie é recomendado, pois, além de ser uma espécie ameaçada de extinção, suas árvores geram grande quantidade de resíduos, ajudando na recuperação de áreas degradadas.

Estas duas espécies arbóreas são comumente atacadas por fungos causadores de doenças, tanto em viveiro quanto em campo, o que torna necessário o tratamento de sementes e mudas com fungicidas. Porém, este tipo de tratamento pode eliminar, além dos patógenos, fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos que são de vital importância para o desenvolvimento destas espécies, além de muitas bactérias importantes para o desenvolvimento saudável das plantas, como as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Estes fungos fitopatogênicos causam em coníferas apodrecimento de raízes ou base do caule, queima de acículas, além da diminuição do valor comercial de sua madeira. Dentre os fungos causadores de doenças em pinheiros destacam-se *Fusarium* spp., *Armillaria* spp. e *Cylindrocladium* spp.

Fungos do gênero *Fusarium* estão entre os principais responsáveis pelo tombamento de mudas, que é a doença de maior ocorrência em viveiros de pinheiros no Brasil (GRIGOLETTI JÚNIOR; PARIS; AUER, 2006). A armilariose,

encontrada no Brasil nos estados da região Sul e também no estado de São Paulo, ataca diversas espécies vegetais, dentre as quais *P. elliotii* e *A. angustifolia*. É uma das doenças mais conhecidas no mundo, causando podridão de raízes (AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS, 2004). *Cylindrocladium* é um gênero de fungos que atacam pinheiros desde a fase de muda até a adulta, causando destruição das raízes da planta. O controle destas doenças é feito geralmente através do uso de agroquímicos, porém estes são prejudiciais tanto às pessoas que com eles entram em contato quanto ao meio ambiente. Com isso, o controle biológico, ainda pouco estudado para espécies arbóreas, se mostra como uma alternativa valiosa no combate de doenças causadas por fungos.

Entre os micro-organismos mais citados na literatura como controladores de doenças causadas por fungos estão a bactéria *Bacillus* spp. e o fungo *Trichoderma* spp., já existindo inclusive produtos no mercado utilizando-os como princípio ativo. No entanto, há outro grupo de microrganismos que apresentam potencial como agentes de biocontrole. São estes as actinobactérias, grupo que se destaca em função da vasta produção de antibióticos. Este potencial apresentado pelas actinobactérias, no entanto, não tem sido suficientemente explorado na elaboração de inoculantes voltados à produção de mudas de árvores ou à prevenção da proliferação destas doenças nos solos onde crescem coníferas.

O presente trabalho teve como objetivos:

- ✓ Isolar e selecionar actinobactérias da rizosfera de Araucária com potencial para o biocontrole de fungos fitopatogênicos;
- ✓ Avaliar a produção de substâncias antimicrobianas;
- ✓ Avaliar a interação dos isolados promissores com micro-organismos benéficos e plantas para verificar se os isolados actinobacterianos podem ser prejudiciais a eles;
- ✓ Identificar os isolados por métodos moleculares;
- ✓ Avaliar o desempenho dos isolados contra patógeno *in vivo*;
- ✓ Testar o desempenho de diferentes veículos para elaboração de inoculantes.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão bibliográfica

#### 2.1.1 Coníferas

As coníferas são plantas pertencentes ao filo Pinophyta, classe Pinopsida e ordem Pinales, abrangendo 9 famílias, 70 gêneros e 630 espécies (EARLE 2009), das quais 200 estão na lista de espécies ameaçadas de extinção, e destas, 20 encontram-se criticamente ameaçadas em função do desmatamento, e da mudança do uso da terra por causa do desenvolvimento humano e produção de papel (FARJON e PAGE 1999).

Este grupo de plantas tem habitado o planeta pelos últimos 320 milhões de anos, tendo sobrevivido à chegada das fanerógamas que agora dominam a Terra. De uma maneira geral não são plantas exigentes, tolerando diversas condições climáticas e ocupando variados tipos de solo em todo o planeta (Figura 1).

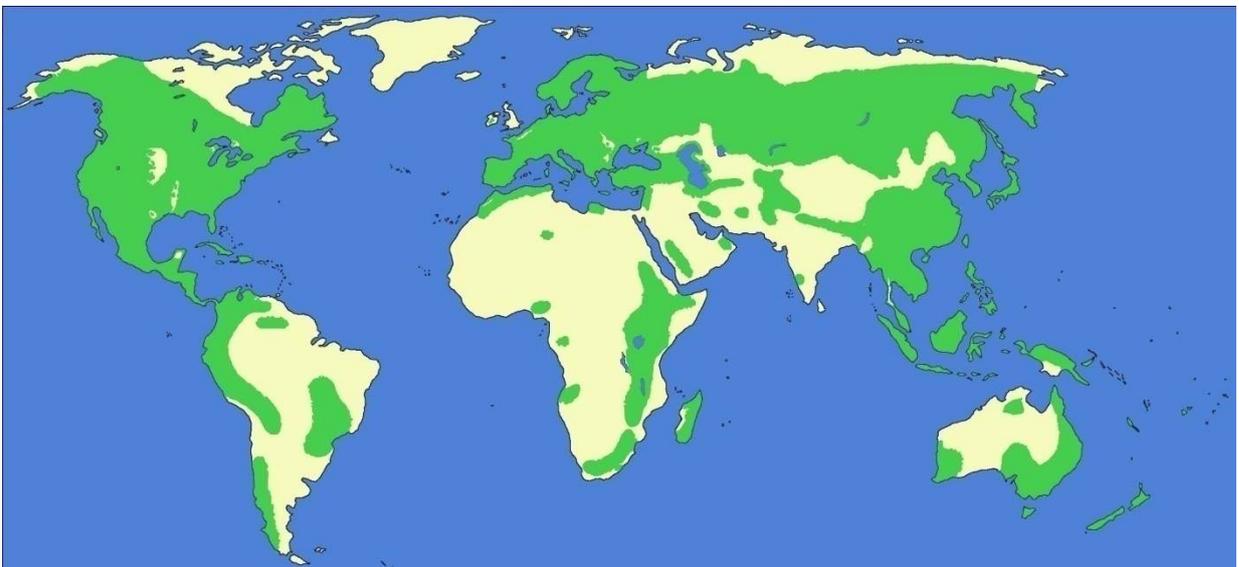


Figura 1 - Distribuição de coníferas no mundo (adaptado de Farjon, 1999)

As coníferas são usadas para diversos propósitos, tendo madeiras variando de macias e de crescimento rápido até madeiras extremamente resistentes. As coníferas do gênero *Pinus* estão entre as espécies arbóreas mais usadas, perdendo apenas para o Eucalipto (EARLE, 2009). Estas plantas também possuem grande

importância ecológica, sendo habitat e fonte de alimento para diversas espécies animais como a Galha-azul, ave que se alimenta das sementes de Araucária, além de manter a cobertura do solo, mantendo vários macro e micro-organismos (CARDOSO et al., 2011).

A Araucária é uma espécie de pinheiro de ocorrência exclusiva na América do Sul, típica do bioma conhecido como Floresta Ombrófila mista. No Brasil ela ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, além de pequenas manchas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Sul de Minas Gerais (BRDE, 2005) (Figura 2). Esta espécie, devido à agressiva exploração de sua madeira e sementes até o final da década de 80, teve suas reservas reduzidas de 21,6% da área do Estado de São Paulo, 36,67% do Estado do Paraná, 60,13% do Estado de Santa Catarina e 17,38% do Estado do Rio Grande do Sul, a apenas 4,3% no Paraná, 3,2% em Santa Catarina e 1,4% no Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2001), restando menos de 3% do total de sua cobertura original (BRDE, 2005), sendo colocada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) na lista de espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992). É indicada nos casos de reflorestamento para recuperação ambiental em função de sua boa deposição de resíduos orgânicos, porém ela não é capaz de se regenerar no interior de florestas já estabelecidas, devido ao baixo índice de luminosidade (BRDE, 2005). Além disso, tentativas de se fazer reflorestamentos com araucária inicialmente obtiveram sucesso limitado, em função da falta de conhecimento a respeito das exigências ambientais desta espécie (BREUNINGER et al 2000). O reflorestamento com sementes não apresenta a eficiência desejada em função do ataque de animais que dela se alimentam (BRDE, 2005), sendo indicado o plantio de mudas, porém um alto número de plantas acaba morrendo após o transplante. Apesar da importância econômica e ecológica da Araucária, poucos trabalhos têm focado a biologia desta espécie em formações naturais (SOLÓRZANO FILHO, 2001). Infelizmente, existem poucos trabalhos publicados cujo foco seja técnicas de plantio (CESAR FILHO, 2005) ou o controle de patógenos desta espécie.

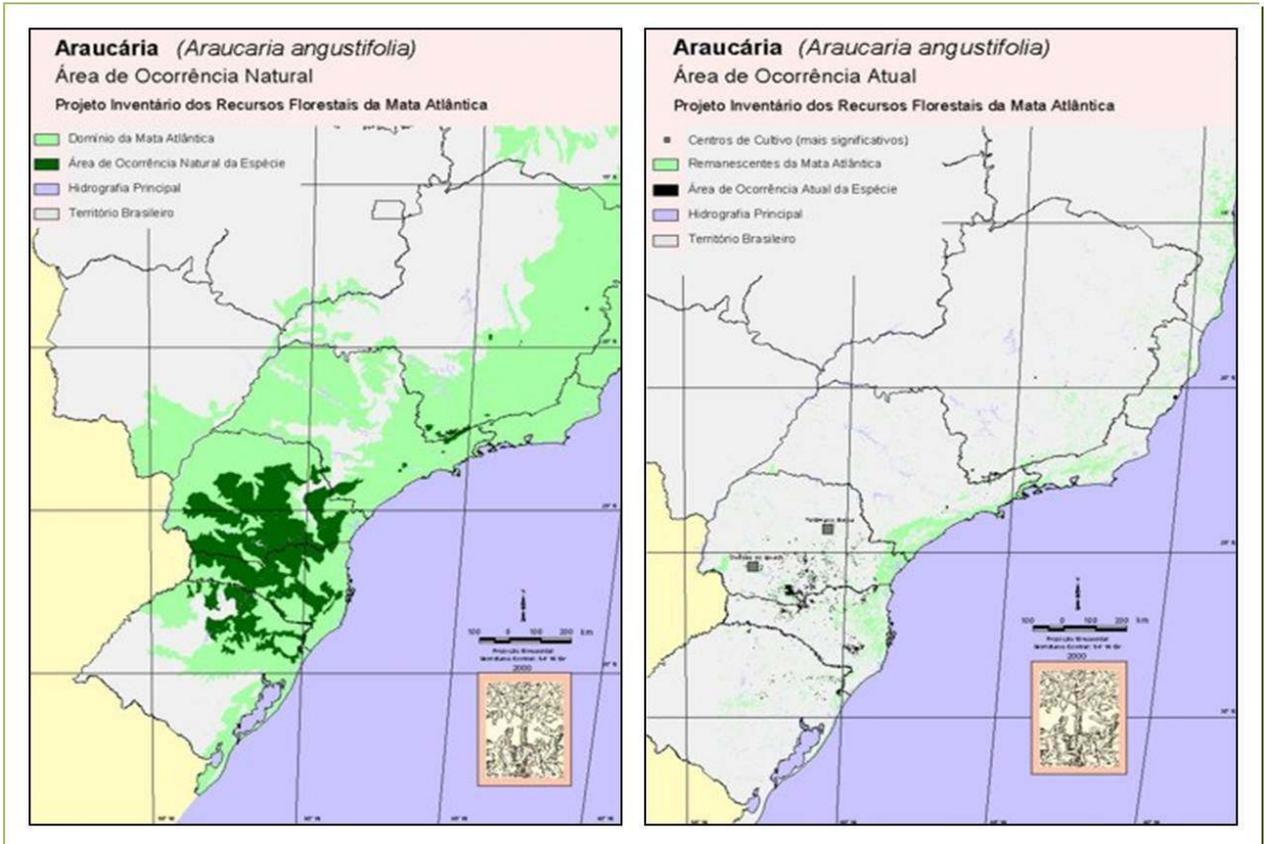


Figura 2 - Distribuição natural e atual das florestas de araucária no Brasil (Fonte: CN-RBMA - Projeto Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica)

Existem, ainda, no Brasil, 12.520 ha de plantio comercial de Araucária, nos estados do Paraná e Santa Catarina, cuja produção é destinada à produção de serrados, lâminas, forros, molduras, ripas, caixotaria, estrutura de móveis, fósforo, lápis e carretéis. No entanto, estes plantios vêm diminuindo, dando espaço às espécies de rápido crescimento como Pinus e Eucalipto (ABRAF 2010).

*Pinus elliottii* e *P. taeda* são espécies nativas da América do Norte, tendo sido introduzidas no Brasil no início do século passado com o intuito de suprir a necessidade de madeira para abastecimento industrial, produção de madeira serrada, madeira laminada e celulose e papel. São duas espécies de fácil manejo, rápido crescimento, fácil reprodução e de grande interesse econômico, sendo responsáveis por 26% das florestas plantadas no Brasil, totalizando 1.794.720 ha. Dentre os estados onde encontramos plantios comerciais de Pinus (Figura 3), os principais são o Paraná (38% das florestas), Santa Catarina (31%), Rio Grande do Sul (10%), São Paulo (9%) e Minas Gerais (8%). Os produtos oriundos destas florestas são atualmente destinados às indústrias de papel e celulose (71%), painéis de madeira (10%), produtos independentes (10%) e siderurgia (9%) (ABRAF 2010).

Só a indústria de celulose, na qual o Pinus tem uma participação de 17%, teve um investimento de 12 bilhões de reais nos últimos 10 anos, e mantém 115 mil empregos diretos e 575 mil indiretos (BRACELPA 2011).



Figura 3 - Estados onde há plantio de Pinus no Brasil em cinza escuro (Adaptado de: BRACELPA – 2011)

### 2.1.2 Interação raiz-micro-organismos

No rizoplano acontecem interações entre as plantas e micro-organismos, sendo as principais constituídas por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e fungos micorrízicos.

As RPCP são bactérias não simbióticas capazes de colonizar as raízes das plantas e promover seu crescimento (KLOEPPER; SCHROT, 1978). Estas bactérias possuem grande importância no desenvolvimento das plantas, promovendo seu crescimento através de diversos mecanismos, que podem ser divididos em

mecanismos diretos e indiretos. Dentre os mecanismos diretos encontram-se a fixação de nitrogênio, produção de fosfatases, solubilização de fosfato, produção de fitormônios como o ácido indol acético, e de sideróforos, dentre outros; e entre os mecanismos indiretos encontram-se a estimulação da micorrização, indução de resistência sistêmica e inibição de patógenos (CARDOSO et al., 2011). Na literatura podem-se encontrar diversos exemplos da importância das RPCP para o desenvolvimento de plantas, tanto de interesse agrônomo quanto ecológico. Em espécies arbóreas de interesse comercial Teixeira et al. (2007), obtiveram um aumento substancial no enraizamento de estacas de eucalipto após a inoculação de estirpes de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Já em *Pinus*, a inoculação da actinobactéria A43 aumentou a produção de massa seca da parte aérea e raízes (VASCONCELLOS, CARDOSO, 2009).

Micorrizas são associações mutualísticas entre fungos e raízes de plantas. Estes fungos se beneficiam da associação, pois, através dela, obtêm açúcares, enquanto que a planta tem a superfície de absorção de nutrientes e água aumentada pelas hifas. Os fungos que realizam este tipo de associação são conhecidos como fungos micorrízicos, e dentre os tipos existentes os mais estudados são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e os fungos ectomicorrízicos (EM).

As micorrizas arbusculares são as mais antigas e difundidas associações micorrízicas existentes. Os fungos que realizam esta associação pertencem ao filo Glomeromycota, abrangendo três ordens e sete famílias. São as associações micorrízicas mais comuns, ocorrendo em quase todas as espécies vegetais, com exceção de alguns grupos como as gimnospermas e crucíferas. A Araucária é um exemplo notório da exceção que confirma a regra, pois se associa com os FMA.

As ectomicorrizas, por outro lado, são associações que ocorrem com um número bem restrito de plantas, geralmente em ecossistemas temperados e boreais. Os fungos que formam estas associações são em sua maioria basidiomicetos, mas também existem alguns pertencentes ao grupo dos ascomicetos (FREY-KLETT; GARBAYE; TARKKA, 2007) e fungos imperfeitos.

Tanto a Araucária quanto o *Pinus* são árvores que estabelecem relações simbióticas com fungos micorrízicos. A Araucária possui pelos radiculares pouco desenvolvidos, sistema radicular grosso e sementes com tamanho grande. Estas características são indícios de grande dependência da colonização do seu sistema

radicular por fungos micorrízicos arbusculares. Esta dependência a torna responsiva à colonização mesmo quando o solo apresenta altos níveis de fósforo disponível (ZANDAVALLI; DILLENBURG; SOUZA, 2004), ao contrário do que normalmente aconteceria com outras espécies vegetais. Já o *Pinus* possui seu sistema radicular colonizado por fungos ectomicorrízicos, fundamentais para o estabelecimento desta espécie exótica, principalmente em solos de baixa fertilidade, e também na produção de mudas da espécie (BELLEI; CARVALHO, 1992).

### 2.1.3 Doenças em coníferas

Outras espécies de fungos, no entanto, são causadores de doenças tanto em *Araucária* quanto em *Pinus*, causando podridão de raiz e base do caule, ressecamento de acículas e galhos e morte. Exemplos de fungos fitopatogênicos são os pertencentes a gêneros como *Armillaria*, *Cylindrocladium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Diplodia* e *Dothistoma*. Dentre as doenças que acometem coníferas em viveiros florestais, temos como principal o tombamento de mudas. Esta doença é causada por fungos de solo de diversos gêneros, dentre os quais *Cylindrocladium* e *Fusarium* (AUER; GOMES; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

Em viveiros de *Pinus* o tombamento de mudas é causado principalmente por fungos do gênero *Fusarium* (Figura 4A), tendo como principais sintomas redução do crescimento, descoloração das acículas seguida de murcha, redução no desenvolvimento e necrose das raízes atacadas (GRIGOLETTI JÚNIOR; PARIS; AUER, 2006). Esporos de *Fusarium oxysporum* podem estar presentes nas sementes de espécies como *Pinus elliottii* que, ao serem plantadas, germinam e acabam sendo colonizadas pelo fungo e sofrendo tombamento das plântulas (AUER; GOMES; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001). Em Ontario, *F. oxysporum* é responsável por cerca de 30% de perdas no campo (FARQUHAR; PETERSON, 1989). Na Espanha também foi considerado como um dos principais patógenos causadores de *damping-off* em viveiros, estando presente tanto em sementes quanto nos substratos utilizados para o plantio e na água para a rega (SOLDEVILLA, 1995). Esta espécie de fungo é conhecida produtora de celulases e pectinases, enzimas que são ativas na penetração do patógeno na planta juntamente à pressão mecânica. O principal sítio de infecção é a região do meristema da raiz, em função da quantidade de exsudatos secretados pelas células da coifa. Uma vez ocorrida a invasão, o fungo

passa a penetrar os elementos imaturos e não lignificados do xilema e, em seguida, os elementos maduros (FARQUHAR; PETERSON, 1989). A prevenção do ataque deste fungo, ou mesmo a redução das perdas por ele causadas, pode ser feita através do tratamento das sementes com fungicidas. Esta medida tem sido a mais adequada para se evitar a entrada de patógenos exóticos e a disseminação dos fungos pelos viveiros florestais (AUER; GOMES; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

As doenças causadas por fungos do gênero *Cylindrocladium* podem ocorrer tanto em viveiro quanto no campo, já tendo sido registrados casos de podridão de raízes em plantios comerciais de *P. Caribaea* var. *hondurensis* e *P. oocarpa*, nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná. Já a queima de acículas causada por *Cylindrocladium pteridis* está limitada às regiões Nordeste e Norte do Brasil. Espécies deste gênero atacam intensamente a Araucária desde a fase de muda até indivíduos adultos, causando destruição das raízes da planta. O patógeno destrói os tecidos das raízes novas e, nas raízes mais velhas, ataca a região da casca. Por fim, a destruição do sistema radicular pode ocasionar a morte da planta (Figura 4B). Não são conhecidas medidas economicamente viáveis de combate à doença quando esta já se encontra estabelecida no campo, sendo então recomendado o combate e/ou prevenção da doença durante a produção de mudas (OLIVEIRA, 1981). Em viveiros, condições como proximidade entre as plantas, umidade e sombreamento acabam favorecendo a doença (AUER; GOMES; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

A armilariose (Figura 4C), causada por basidiomicetos do gênero *Armillaria*, é uma das doenças mais conhecidas em todo mundo (AUER; GOMES; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001), ocorrendo em espécies de interesse agrônomo como videiras (PERTOT et al., 2008), mas é principalmente encontrada em espécies arbóreas como *Pinus radiata*, *Pinus taeda* e *Sophora chrysophylla* (KIM; HANNA; KLOPFENSTEIN, 2010), *Salix* sp., *Picea glauca*, *Betula* sp. e *Tsuga mertensiana* (KLOPFENSTEIN et al., 2009), dentre muitas outras espécies. Esta doença ataca o colo e lenho das plantas, causando apodrecimento na região basal do tronco. A planta passa a apresentar crescimento vagaroso, exsudação de resina na base do tronco e nas raízes, queda de acículas, ressecamento das porções terminais dos galhos, por fim levando a planta à morte (FERREIRA, 1989). Os fungos deste gênero também atacam *P. elliotii* e *A. angustifolia*, espécies que dominam na região sul do país onde as temperaturas são mais amenas, propiciando condições ótimas

para o crescimento do fungo. Árvores de todas as idades são afetadas, podendo, no caso de uma espécie altamente susceptível como *P. elliotii*, ter o número de árvores mortas correspondendo a 50% do plantio (AUER; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS, 2004). Alguns plantios com mais de 20 anos apresentaram uma média de 20% de árvores doentes. O uso do controle químico contra a armilariose, no entanto, é de alto custo e duvidoso quanto à sua eficiência.

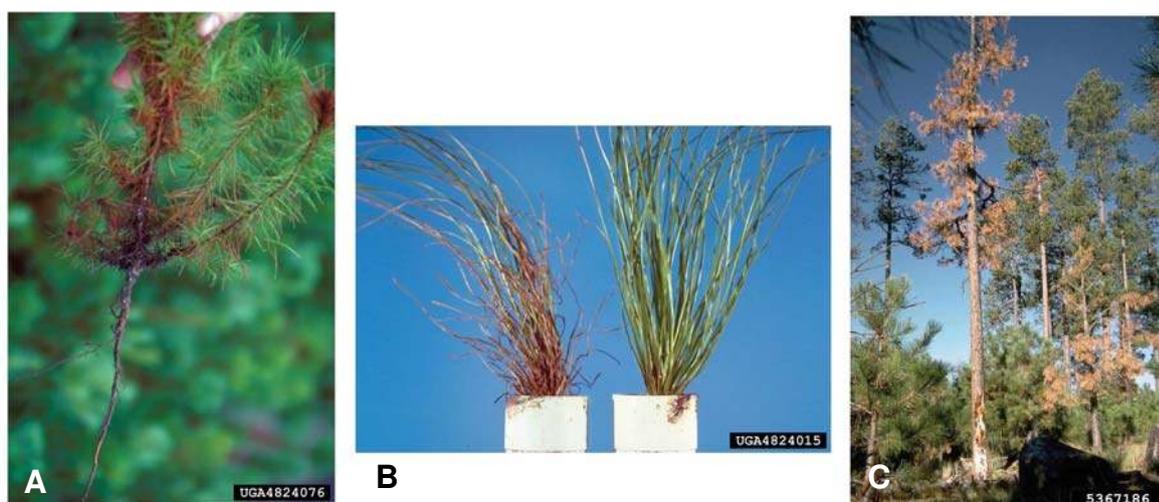


Figura 4 - Sintomas das doenças causadas por fungos fitopatogênicos dos gêneros *Fusarium* (A), *Cylindrocladium* (B) e *Armillaria* (C), em Pinus

#### 2.1.4 Biocontrole

O biocontrole ou controle biológico é uma técnica há muito tempo aplicada, desde que se começou a utilizar gatos para controlar populações de ratos. Porém, nas últimas décadas, esta técnica tem ganhado destaque na área agrária frente ao fato de que os agroquímicos utilizados representam riscos à saúde humana e ambiental, além de constantemente os organismos alvo desenvolverem resistência às substâncias aplicadas (GERHARDSON, 2002).

O controle biológico bacteriano de doenças causadas por fungos tem sido vastamente estudado, principalmente por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (CHEN et al., 2009; TROTEL-AZIZ et al., 2008; WELLER, 2007). Destes estudos, a maioria abrange espécies agrônômicas como tomate (INDERIATI; FRANCO, 2008), alface (CORRÊA; BETTIOL; SUTTON, 2010) e videiras (LOQMAN et al., 2009), dentre outras, havendo um número mais reduzido de estudos com

espécies arbóreas. Em se tratando de coníferas, o número de estudos se reduz drasticamente (CARDOSO et al., 2011).

O antagonismo exercido pelas bactérias sobre os fungos pode ser através de competição por nutrientes, espaço, produção de sideróforos, antibiose, produção de enzimas hidrolíticas ou outras substâncias ativas (GERHARDSON 2002). Vários grupos de bactérias são capazes de controlar o crescimento de fungos, o que é na verdade um mecanismo que garante a sobrevivência em ambientes competitivos como o solo, mas aqui será destacado o grupo das actinobactérias.

As actinobactérias, anteriormente denominadas actinomicetos, são uma classe heterogênea de bactérias gram-positivas que formam hifas multinucleadas que se ramificam formando um micélio. Possuem alto teor de G+C em seu DNA, com valores de 51% para algumas corynebacteria a mais de 70% para *Streptomyces* e *Frankia* (VENTURA et al., 2007). Podem ser divididas em nocardiformes, que possuem micélio rudimentar, e esporaactinomicetos, que são capazes de formar esporos de forma assexuada, chamados de conídios ou conidiósporos (ARAÚJO 1998). A classe actinobactéria pode ser dividida em 4 subclasses, 5 ordens, 14 subordens, 50 famílias, 197 gêneros e 1936 espécies (BORA; WARD 2009). São vastamente conhecidas em função da variedade de metabólitos de interesse biotecnológico que produzem, além de sua diversidade funcional. São produtoras de celulasas (LIMA et al., 2005), lipases (KO; WAMG; ANN, 2005; SZTAJER; MALISZEWSKA; WIECZOREK, 1988), quitinases (GOMES et al., 2000), xilanases (JIANG et al., 2005), pectinases (BEG et al., 2000), amilases (STAMFORD et al., 2001), peroxidases (RAMACHANDRA; CRAWFORD; HERTEL, 1988) vitaminas do complexo B (SAUNDERS; OTTO; SYLVESTER, 1952), fitormônios (SHRIVASTAVA; SOUZA; DESAI, 2008), agentes antitumorais (CRAGG; KINGSTON; NEWMAN, 2005), agentes imunossupressivos (MANN, 2001), substâncias que estimulam crescimento e colonização em ectomicorizas (RIEDLINGER et al., 2006), estimulação de germinação de esporos de fungos micorrízicos (CARPENTER-BOGGS; LOYNACHAN; STAHL, 1995), interação benéfica com outras rizobactérias (GREGOR; KLUBEK; VARSA, 2003), solubilização de fosfato inorgânico (HAMADALI et al., 2008; ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1994) e orgânico (OLIVEIRA et al., 2008); porém, a maior parte das pesquisas e produtos existentes

ligados às actinobactérias são em função da capacidade de produção de substâncias antimicrobianas (SACRAMENTO et al., 2004).

A produção destas substâncias pelas actinobactérias as torna fortes candidatas a agentes de controle de doenças em plantas (CRAWFORD et al. 1993, JIMÉNEZ-ESQUILÍN; ROANE, 2005, LEHR et al., 2007). Estudos como o de El-Tarabily et al. (2009) mostram como as actinobactérias podem apresentar um controle poderoso de fungos fitopatogênicos, podendo chegar a substituir fungicidas químicos quando combinado com tratamentos através de seu estudo com actinobactérias endofíticas. Estas actinobactérias foram capazes de colonizar as raízes de pepino por oito semanas e suprimir a atividade fitopatogênica de *Pythium aphanidermatum*. Já Gerhardson (2002) afirma que as preparações para biocontrole não devem ser vistas como substitutos para os químicos, que são geralmente simples e muito estáveis, enquanto micro-organismos estão sujeitos a frequentes mudanças genéticas. Além disso, eles precisam de certos cuidados especiais na aplicação.

É possível encontrar no mercado produtos registrados confeccionados com isolados de actinobactéria. Um dos exemplos é o Mycostop (Verdera), que é um biofungicida em pó contendo um isolado da espécie *Streptomyces griseoviridis*. Este produto é recomendado no combate a *Fusarium* spp. e outros fungos, podendo ser aplicado em plantas ornamentais, sendo também indicado para o controle de doenças fúngicas em *Pinus* sp.. Outros dois produtos são o Actinovate e Actino-Iron (NATURE INDUSTRIES), que são à base de *Streptomyces lydicus* e atuam como biofungicida voltado a plantas ornamentais e jardinagem.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Coleta e isolamento de actinobactérias

A coleta de material para isolamento de actinobactérias foi feita em novembro de 2008, no Parque Estadual de Campos do Jordão, localizado no município de Campos do Jordão – SP ( $22^{\circ} 44' S$ ;  $45^{\circ} 27' W$ ). A vegetação característica desta região é a Floresta Ombrófila Mista, cuja característica é a presença da espécie *A. angustifolia*. A região apresenta clima tropical de altitude, tendo verões suaves e invernos frios para os padrões brasileiros. Amostras de raízes envolvidas por solo rizosférico foram coletadas em uma profundidade de 0 a 15 cm em 15 árvores, três pontos por árvore, a uma distância de um metro do tronco. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), onde foram mantidas em câmara fria a  $4^{\circ}C$  até o processamento das amostras.

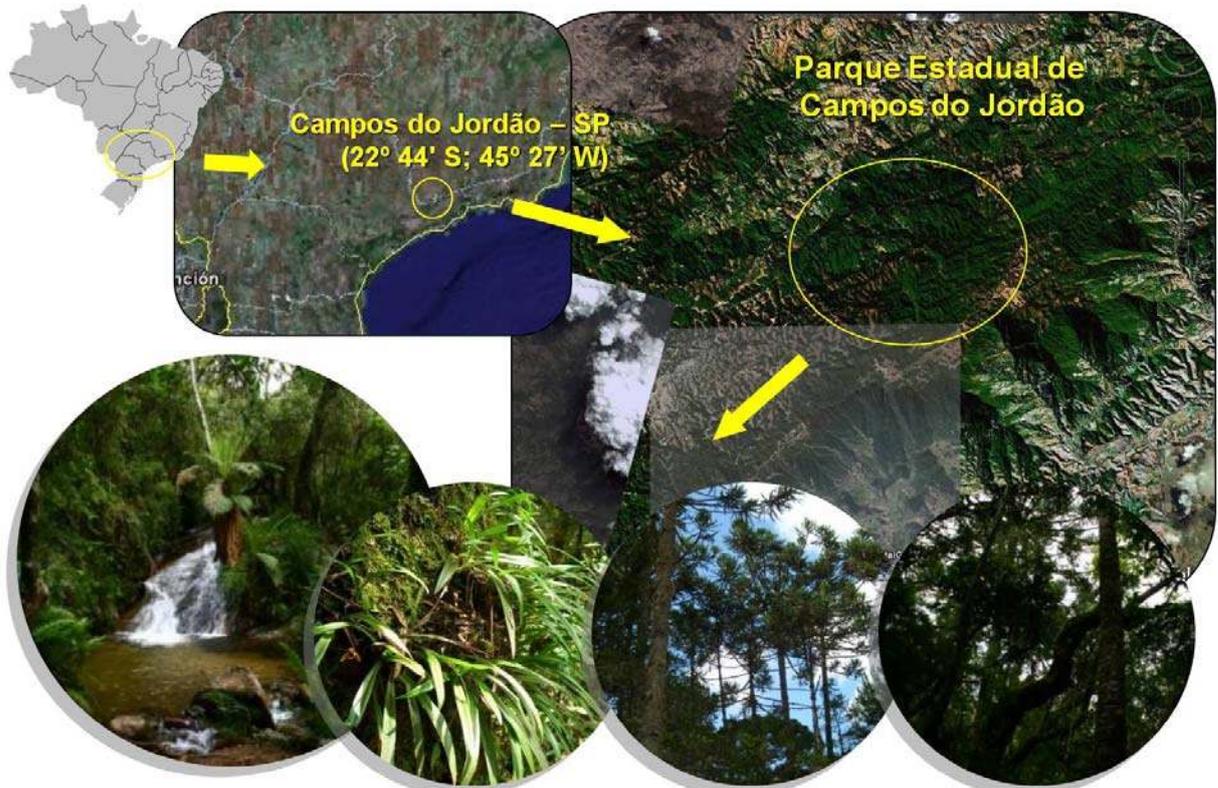


Figura 5 - Local de coleta. Imagens de satélite: [www.google.com](http://www.google.com). Fotos: Carlos Marcelo Ribeiro

Para o isolamento de actinobactérias foi feita uma diluição seriada do solo envolvendo as raízes seguida do plaqueamento em meio seletivo. Para cada amostra foram pesados 10 gramas de raízes com solo aderido que foram colocados em frascos erlenmeyers contendo cada um 90 mL de solução salina 0,85% estéril e uma pérola de vidro. Estes frascos foram mantidos em agitação por 30 minutos para que os micro-organismos aderidos às raízes e ao solo se soltassem. Após a agitação cada amostra foi filtrada com auxílio de gaze estéril para a remoção de fragmentos de raízes e outras partículas maiores, e o filtrado foi então diluído serialmente até  $10^{-4}$ . Uma alíquota de 100 $\mu$ L das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram dispensados em placas de petri com o meio seletivo YECD (CRAWFORD et al. 1993) contendo 100 $\mu$ g ml $^{-1}$  de ciclohexamida. Também foram inoculadas com 100 $\mu$ L das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  placas com meio King B (KB) contendo 100 $\mu$ g ml $^{-1}$  de ciclohexamida, 200 $\mu$ g ml $^{-1}$  de ampicilina e 12,5 $\mu$ g ml $^{-1}$  de cloranfenicol (GEELS; SCHIPPERS, 1983). As placas foram incubadas em sala climatizada a 28°C por 10 dias. Após este período, foram repicadas isoladamente em placas contendo o meio YCED as colônias que apresentaram características que as classificassem como actinobactérias, como colônias secas, coriáceas, com esporos e apresentando formação de hifas extremamente finas. Estes isolados foram então repicados repetidas vezes para placas contendo meio YECD com a finalidade de se obterem colônias livres de contaminação. Após a purificação os isolados foram repicados em meio ISP2 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

### **2.2.2 Teste de antagonismo e seleção de isolados**

Os patógenos escolhidos para os testes de antagonismo foram *F. oxysporum*, *Cylindrocladium candelabrum*, *C. pteridis* e *Armillaria* sp. (Figura 6).

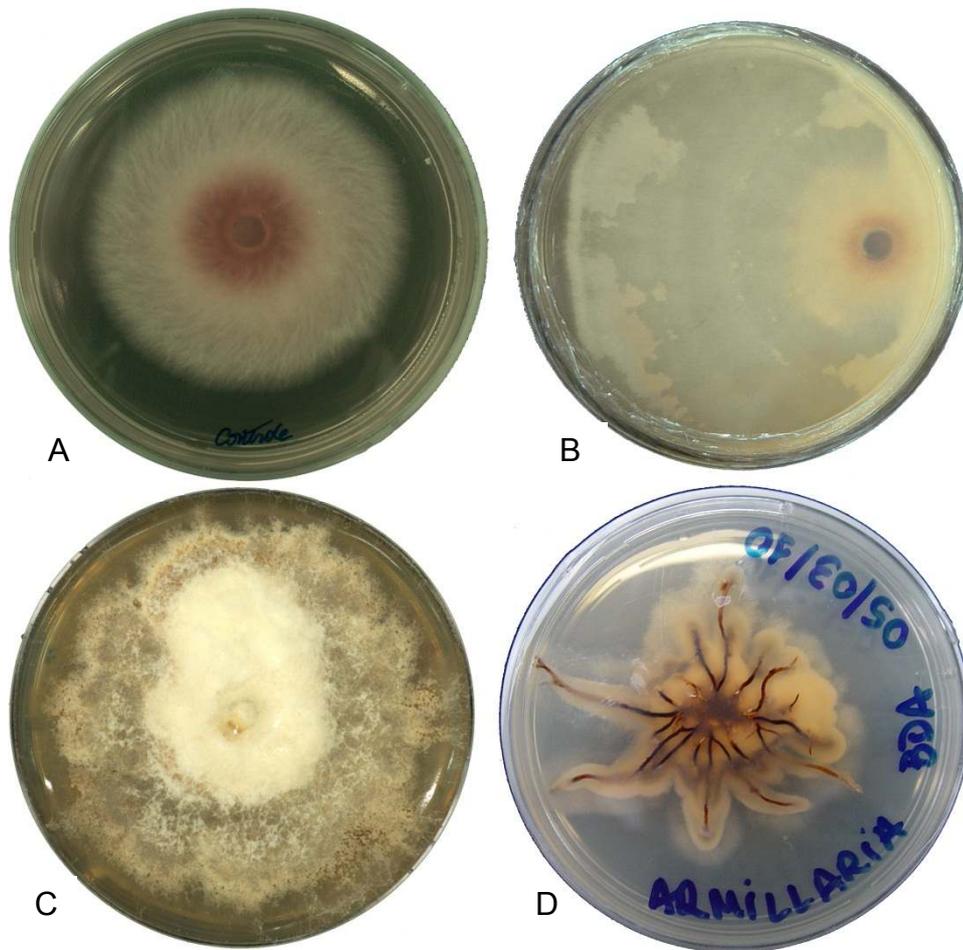


Figura 6 - Patógenos utilizados nos testes de antagonismo: *F. oxysporum* (A), *Cylindrocladium candelabrum* (B), *C. pteridis* (C) e *Armillaria* sp. (D)

Antes de qualquer teste quantitativo para avaliação da eficiência dos isolados na inibição de fungos fitopatogênicos (Tabela 1) foi feito um teste qualitativo com todos os isolados selecionados para que fossem escolhidos aqueles capazes de inibir *Fusarium*, um dos principais causadores de *damping-off* em coníferas. Para este teste qualitativo, foram inoculados concomitantemente isolados de actinobactéria e discos de um isolado de *Fusarium oxysporum*. Cada placa de petri contendo meio ISP2 recebeu um disco do patógeno ao centro e quatro isolados de actinobactérias dispostos em cruz, ao redor do inóculo de fungo com 30 mm de distância do mesmo (Figura 7A). Como controle, foi inoculado apenas o patógeno no meio da placa.

Tabela 1 - Fungos fitopatogênicos utilizados neste trabalho, gentilmente cedidos por colaboradores

Espécie	Isolado de	Origem	Cedido por
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pinus	Colombo-PR	AUER, C.G.
<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	Eucalipto	Monte Dourado - PA	ALFENAS, A.C.
<i>Cylindrocladium pteridis</i>	Eucalipto	Monte Dourado - PA	ALFENAS, A.C.
<i>Armillaria</i> sp.	Pinus	Colombo-PR	AUER, C.G.

Após o teste qualitativo, os isolados que apresentaram um halo de inibição do *F. oxysporum* foram então testados qualitativamente contra *Cylindrocladium candelabrum* *in vitro*. Apenas os isolados que apresentaram inibição contra os dois patógenos foram selecionados para os testes quantitativos.

Nos testes quantitativos, foram adotadas duas metodologias: pareamento em placa para os fungos de crescimento rápido e regular (*F. oxysporum* e *C. candelabrum*), e antagonismo em meio líquido para os fungos de crescimento lento e irregular (*Armillaria* sp. e *C. pteridis*). No pareamento em placa (ROMEIRO 2007) cada isolado actinobacteriano foi inoculado concomitantemente a um disco de 6 mm de inóculo do fungo em meio ISP2, a uma distância de 50 mm um do outro (Figura 7B), tendo como controle negativo o patógeno inoculado no meio na ausência de actinobactérias, e como controle positivo o patógeno pareado com o isolado A43 (*Streptomyces kasugaensis*), isolado e comprovado como antagonista eficiente de fungos fitopatogênicos por Vasconcellos (2008). Foram feitas medidas do crescimento do patógeno aos 10 dias. Os isolados de actinobactérias que obtiveram os melhores resultados, tendo como critério o tamanho e duração do halo de inibição, foram então selecionados para o teste de antagonismo em meio líquido com os outros dois patógenos.

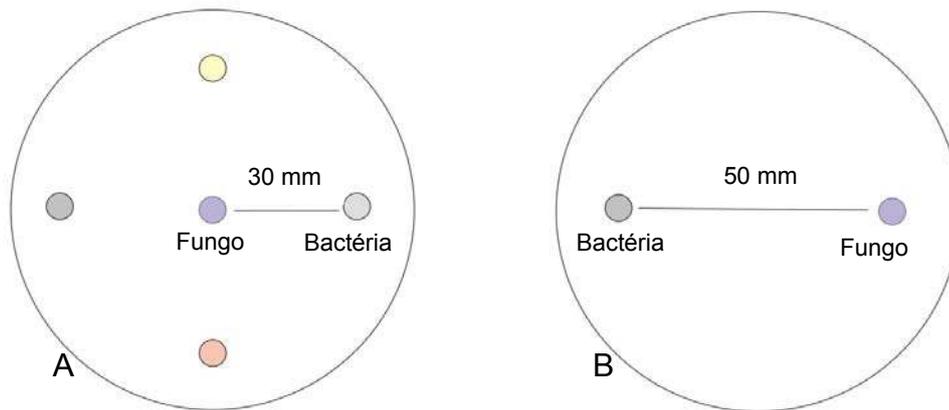


Figura 7 - Teste qualitativo (A) e quantitativo (B) para avaliação de atividade antagonista de actinobactérias contra fungos fitopatogênicos

Para o teste de antagonismo em meio líquido (Vasconcellos 2008), cada isolado actinobacteriano foi cultivado em erlenmeyer contendo meio ISP2 líquido e mantido sob agitação a 160 RPM durante sete dias. Após a incubação, o conteúdo dos frascos foi centrifugado e o sobrenadante esterilizado através de filtração com membrana milipore 0,22 $\mu$ m. O filtrado foi então misturado a meio batata-dextrose (BD) estéril, em proporção 1:1, e 7 mL da mistura foram distribuídos em frascos erlenmeyer de 50 mL, em 5 repetições para cada isolado actinobacteriano. Também foram feitos um controle apenas com meio BD, e um branco, contendo meio BD com estreptomicina 100mg/L, ciclohexamida 100mg/L e rosa bengala. Cada frasco recebeu como inóculo um disco de 6mm de uma cultura pura do patógeno. Os frascos foram mantidos em incubação, no caso de *C. pteridis* a 28°C por 5 dias, e no caso de *Armillaria* sp. a 22°C por 28 dias e, após este período, as culturas foram filtradas, secas e pesadas. Após os testes de antagonismo, foram selecionados novamente apenas os isolados que inibiram com eficiência os quatro fungos patogênicos.

### 2.2.3 Produção de substâncias antimicrobianas

Foi avaliada a produção de algumas substâncias que podem ser sintetizadas por micro-organismos que apresentam atividade antagonista a fungos. São estas: celulase, quitinase,  $\beta$ -glucanase, ácido cianídrico (HCN) e sideróforos.

A produção de celulases,  $\beta$ -glucanases e quitinases pelos isolados foi avaliada através de cultivo em meio de cultura mineral (RENWICK; CAMPBELL; COE, 1991)

acrescido dos substratos de cada uma das enzimas, respectivamente carboximetilcelulose (CMC), laminarina e quitina coloidal, em uma concentração de 5%. A evidenciação da produção de quitinases dispensa a revelação e é evidenciada através da formação de um halo translúcido no meio turvo. A evidenciação da produção de celulases foi feita através de revelação com a utilização de vermelho congo (WOOD 1980) e a de  $\beta$ -glucanases pela coloração com Gram Iodine (KASANA et al., 2008). Na presença das enzimas foi possível visualizar um halo claro hialino em volta do isolado capaz de degradar tais fontes de carbono.

Para se detectar a produção de HCN os isolados foram inoculados em pequenos poços com 1 cm de diâmetro contendo meio TSA. Estes isolados foram cultivados por 5 dias e após este período os pocinhos foram recobertos com papel de filtro embebido em reativo de Feigl e Anger (1966). Foram consideradas produtoras de HCN as que apresentaram a mudança da cor do papel de filtro para marrom (ROMEIRO, 2007).

Na evidenciação de produção de sideróforos, os isolados foram cultivados em meio líquido King B por 72h. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas para retirada de células e a 0,1mL do sobrenadante foi adicionado 0,1 mL de solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS) (ROMEIRO, 2007). Nos sobrenadantes oriundos de culturas de isolados capazes de produzir sideróforos houve mudança de coloração de azul para laranja ao se adicionar a solução indicadora.

## **2.2.4 Interações entre actinobactérias e outros organismos: microrganismos benéficos e coníferas.**

### **2.2.4.1 Interação com RPCP e fungos micorrízicos**

Conhecendo-se o potencial de algumas actinobactérias no biocontrole de fitopatógenos, era também preciso saber que tipo de interação estas actinobactérias teriam com outros micro-organismos benéficos ao crescimento vegetal. Caso também mostrassem efeito inibidor nestes, sua utilização na prática poderia ser descartada.

Os micro-organismos benéficos testados foram RPCP, FMA e EM.

Tabela 2 - Micro-organismos benéficos utilizados nos testes de interação com isolados de actinobactérias

Isolado	Fonte	Fornecido por	Tipo
<i>Bacillus subtilis</i>	Araucária	RIBEIRO, C.M.	RPCP
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Araucária	RIBEIRO, C.M.	RPCP
<i>Suillus brevipes</i>	<i>P. contorta</i>	KASUYA, M.C.M.	EM
<i>Gigaspora rosea</i>	Braquiária	CARDOSO, E.J.B.N.	FMA

A interação entre actinobactérias e RPCP foi feita por cultivo em camada dupla (ROMEIRO 2007) utilizando-se as estirpes de RPCP B4 (*Bacillus subtilis*) e RISP2 (*Bacillus amyloliquefaciens.*), isolados por Ribeiro e Cardoso (2011).

As actinobactérias foram estriadas em meio ISP2 em placas de petri, formando três estrias por placa (Figura 8A). Após a inoculação das actinobactérias, estas foram mantidas em sala climatizada a 28°C por sete dias, tempo suficiente para que produzissem as substâncias antimicrobianas. Após este período, as placas foram fumigadas com clorofórmio (2mL/placa) durante 20 minutos, para que as actinobactérias fossem mortas sem que houvesse alteração de qualquer substância que estas tivessem produzido no meio. Após a fumigação uma camada delgada de meio ágar nutriente (3g extrato de carne, 5g peptona, 15g ágar) fundido a 50°C foi aplicada sobre esta placa (Figura 8B). Sobre esta camada de meio foram então inoculados os isolados de RPCP em estrias perpendiculares às primeiras (Figura 8C) e as placas levadas para sala climatizada. Após 24h de incubação a 28°C, foi checada presença de inibição do crescimento das RPCP no ponto de intersecção com as actinobactérias.

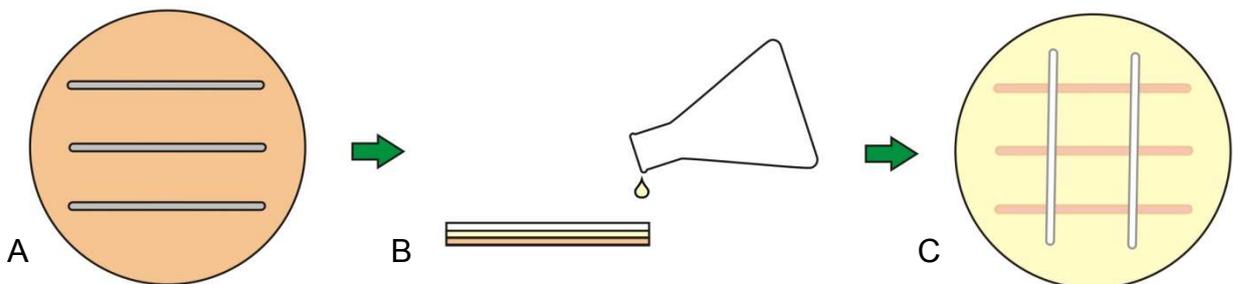


Figura 8 - Esquema explicativo do teste de camada dupla. Inoculação de três estrias de actinobactérias (A), disposição da segunda camada após a fumigação (B), estriamento das RPCP sobre a segunda camada (C)

No teste de interação *in vitro* com fungos micorrízicos, foi usado o EM *S. brevipes* e o FMA *G. rosea*. Por *S. brevipes* ser passivo de cultivo em placa, o teste de interação foi realizado por camada dupla (ROMEIRO 2007), tendo os isolados de actinobactérias sido estriados em meio ISP2 com incubação por sete dias a 28°C, seguida de fumigação e disposição de uma segunda camada de meio MNM (MARX, 1969), onde foi inoculado um disco de 6 mm de cultura do fungo *S. brevipes* no centro da placa. As placas foram então incubadas por 30 dias a 28°C e a avaliação foi feita por medição do diâmetro da colônia do fungo. Para o teste com FMA, foi testada a influência das actinobactérias na germinação de seus esporos. Os testes foram montados em placas de petri contendo ágar água, com um poço contendo meio YCED sólido onde foram inoculados os isolados bacterianos. Antes da montagem das placas foi feita a desinfestação dos esporos, deixando-os embebidos em cloramina T 2% por 20 minutos, seguindo-se de lavagem com água estéril, lavagem com álcool 70%, mais um enxágue com água estéril, imersão em solução de estreptomicina 2% com ampicilina 0,08% por uma hora e por fim enxágue com água destilada estéril. Os esporos foram então dispostos em duas linhas paralelas ao inóculo bacteriano, a uma distância de 7 mm e outra a 14 mm (Figura 9). Em cada linha foram dispostos 10 esporos e então as placas foram fechadas e incubadas por 7 dias a 26°C.

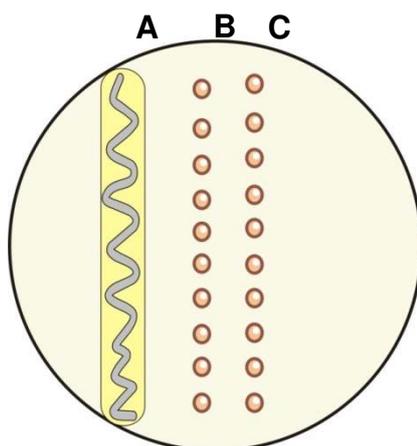


Figura 9 – Esquema explicativo do teste *in vitro* de germinação de esporos. Inoculação de isolado de actinobactéria em poço contendo meio YCED (A), esporos dispostos em linhas a 7 mm (B) e 14 mm (C) do inóculo bacteriano

Os testes de interação *in vivo* com os fungos micorrízicos foram feitos utilizando-se as mesmas espécies utilizadas para os testes *in vitro*.

A interação entre os isolados actinobacterianos e o EM foi avaliada através de experimento utilizando mudas de *Pinus elliottii* com 25 dias e o fungo ectomicorrízico *Suillus brevipes*. O substrato utilizado na montagem foi o mesmo que o usado para o teste de germinação, porém ao invés da adubação recomendada, foram fornecidos semanalmente 10 mL de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) com 1/3 de P para que fosse estimulada a micorrização. Para a produção das mudas foram utilizadas sementes microbiolizadas através da imersão por 30 minutos sob agitação das sementes em uma suspensão bacteriana contendo cerca de  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>, com exceção das mudas do tratamento controle. Uma semana após a semeadura, as mudas foram reinoculadas com 5 mL de suspensão contendo  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>, e esta reinoculação foi também repetida no dia da montagem do experimento de interação com o fungo ectomicorrízico. Foram utilizados vasos com capacidade de 3L de substrato e para cada tratamento foram montadas seis repetições. As mudas foram transferidas do tubete para os vasos e neste momento os tratamentos micorrizados receberam 1 mL de uma cultura do fungo *S. brevipes*. O experimento foi desmontado após sete meses do plantio e foi avaliada a colonização das raízes pelo fungo ectomicorrízico, além de quantificadas a massa seca da raiz e parte aérea para saber se houve interferência na eficiência do fungo. Os tratamentos consistiram de um controle sem o fungo, um controle com o fungo, e os tratamentos com inoculação do fungo e dos isolados bacterianos selecionados em conjunto, com seis repetições cada.

A interação entre as actinobactérias e o FMA *in vivo* foi realizada em casa de vegetação com utilização do milho como hospedeiro. Esta planta foi escolhida para substituir a Araucária devido ao seu curto ciclo de vida e à sua susceptibilidade à micorrização. Foram utilizados vasos de dois litros e meio contendo uma mistura estéril de neossolo quartzarênico e areia de rio lavada na proporção 1:1. Os tratamentos foram os mesmos usados para o experimento com Pinus, porém com cinco repetições. A inoculação das bactérias foi feita por microbiolização das sementes em uma suspensão bacteriana contendo  $10^8$  UFC, mantidas sob agitação por 24 horas. Após a microbiolização, as sementes foram deixadas a germinar em placas de petri contendo areia lavada estéril umedecida com 1 mL da suspensão utilizada para microbiolização das sementes. As placas com as sementes foram mantidas em câmara climática até a sua germinação. Após a emergência (5 dias), as plântulas foram transferidas para os vasos, em orifícios de 5 cm de profundidade. Os

vasos com plantas micorrizadas receberam neste orifício 6 g de solo-inóculo de FMA, contendo hifas, fragmentos de raízes e esporos. Após 60 dias do plantio, o experimento foi desmontado e foi feita a avaliação da porcentagem de colonização das raízes e quantidade de esporos no solo. Além destas, também foram avaliadas massa de matéria seca da parte aérea e das raízes após secagem em estufa por 72 horas, para avaliar uma possível alteração na eficiência do FMA.

#### 2.2.4.2 Coníferas

No intuito de saber se, além de inibir patógenos, os isolados selecionados possuem alguma influência sobre as espécies vegetais alvo, foram realizados testes com inoculação de actinobactérias nas sementes de Pinus e Araucária, e foram avaliados a germinação e o desenvolvimento inicial das mudas. No experimento para a avaliação da interação entre as bactérias e o Pinus foram utilizadas sementes de *Pinus elliottii* provenientes de plantio monoclonal. As sementes foram microbiolizadas por meio de imersão em suspensão contendo  $10^8$  células por mL, seguida de agitação por 20 minutos. Após este processo as sementes foram plantadas em tubetes com capacidade para um volume de 50 mL de substrato. O substrato utilizado foi uma mistura recomendada pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) para produção de mudas de Pinus de 3:1:1 de terra vegetal, vermiculita e solo arenoso, com adubação de 150 g de N, 300 g de  $P_2O_5$  e 100 g de  $K_2O$  por metro cúbico de substrato. Foram semeadas três sementes por tubete, tendo 64 tubetes por tratamento e constituindo uma repetição cada 8 tubetes (48 sementes). Os tratamentos foram: controle com sementes não inoculadas com actinobactéria, sementes microbiolizadas com o isolado A43 e com cada um dos isolados actinobacterianos selecionados nos testes de antagonismo. As avaliações da germinação de sementes foram feitas aos 10, 15, 20 e 25 dias, pela contagem das sementes germinadas em cada repetição, expressa em porcentagem.

Para a avaliação da germinação de araucária, foram utilizadas sementes descascadas de *Araucaria angustifolia*. Foram usados frascos de vidro contendo 200 mL de areia esterilizada com 70% da capacidade de retenção de água. As sementes foram desinfestadas utilizando-se uma mistura de álcool absoluto e peróxido de hidrogênio em uma proporção de 2:1 e levadas à agitação por 30 minutos. Após a desinfestação as sementes descascadas foram lavadas com água estéril e

microbiolizadas através de imersão em suspensão contendo bactérias na concentração de  $10^8$ . As sementes foram mantidas sob agitação por 30 minutos e semeadas, 5 sementes por frasco, sendo 5 frascos (repetições) por tratamento. Os tratamentos foram os mesmos utilizados no teste com Pinus. As avaliações da germinação foram feitas aos 7 e aos 30 dias da semeadura.

Para a avaliação do desenvolvimento inicial tanto do Pinus quanto da Araucária, as mudas foram colhidas após o último dia de avaliação da germinação, tiveram a parte aérea e raiz separadas e foram secadas a  $65^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. Após a secagem parte aérea e raízes foram pesadas.

### **2.2.5 Antagonismo *in vivo***

Para o teste de antagonismo *in vivo* foi utilizado o patógeno *F. oxysporum*, que, dentre os testados *in vitro*, é o que causa maiores perdas em casa de vegetação. Para o preparo do inóculo do patógeno, discos de 6 mm de diâmetro foram inoculados em meio BD, e incubados sob agitação por 5 dias a  $28^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação o fungo foi triturado em microprocessador a fim de se obter uma suspensão homogênea, com fragmentos de hifas.

Na montagem foram utilizadas mudas de Pinus com 25 dias de germinação, em cujas raízes foram feitos pequenos cortes para facilitar a entrada do patógeno. As mudas foram inoculadas com actinobactérias no momento da semeadura, através da microbiolização das sementes, aos 14 dias, com 5 mL de uma suspensão bacteriana contendo  $10^8$  células/mL, e no dia do plantio em substrato contaminado com *F. oxysporum*. O substrato utilizado foi o mesmo do experimento de germinação, inoculado com o patógeno *F. oxysporum*, 1 mL de inóculo de fungo a cada 200g de solo. O substrato foi distribuído em potes com capacidade para 200 mL, e as mudas plantadas e em seguida inoculadas com actinobactérias.

Para cada tratamento foram preparadas quatro repetições, sendo que cada repetição era composta por dez plantas. Os quatro tratamentos montados foram: controle com patógeno sem bactéria, patógeno + A43 e patógeno + cada um dos isolados actinobacterianos selecionados. O experimento foi conduzido por 30 dias.

### **2.2.6 Veículos de multiplicação e manutenção para preparo de inoculante de actinobactérias**

Para o teste dos diferentes veículos passíveis de serem utilizados na confecção dos inoculantes foi previamente feita uma curva de crescimento para cada um dos isolados de actinobactéria selecionados. Desta forma foi padronizado o tempo de incubação necessário para cada isolado possuir a quantidade ideal de células viáveis em um inoculante. As culturas utilizadas na confecção deste teste deveriam apresentar um número inicial de células viáveis correspondente a  $10^8$ , na mesma fase de crescimento. Para a elaboração da curva de crescimento, de cada isolado foi retirada uma colônia de uma placa estriada com o isolado incubada por 5 dias. Cada colônia foi colocada em tubo de ensaio contendo 1 mL de salina estéril e agitada com o auxílio de um agitador elétrico com o intuito de liberar esporos e fragmentos de hifas da colônia. Uma alíquota de 500 $\mu$ L de cada uma das suspensões de propágulos foi transferida para frascos erlenmeyers contendo 50 mL do meio de cultura ISP2 líquido, e estes frascos foram então mantidos sob agitação constante a 28°C durante todo o período de avaliação. Foram feitas então 12 leituras, uma a cada 4 horas, completando 48 horas, além de uma leitura no momento inicial da avaliação, para se obter a quantidade inicial de UFC inoculada no meio. Para cada leitura foram feitas diluições seriais das culturas, e uma alíquota de 50  $\mu$ L foi plaqueada em duplicata, com posterior incubação por 3 dias seguida da contagem das colônias formadas.

Após a elaboração da curva de crescimento foi testada a viabilidade destes isolados em diferentes veículos: água destilada (Dest), água filtrada (Filt), extrato de solo 1:1 (v/v) (ES), carboximetilcelulose 0,15% (CMC), glicerina 1% (Gli) e colágeno 1% (Col). Cada isolado foi cultivado em erlenmeyer contendo meio ISP2 líquido e mantido sob agitação a 28°C durante o período necessário para atingir  $10^8$  células. Após o período de crescimento estipulado, as culturas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas nos veículos devidamente esterilizados. Cada inoculante foi posto em alíquotas de 3 mL em tubinhos de polipropileno com capacidade para 5mL e depois fechado com rolha esterilizada e lacrado com parafilm. Para cada tratamento, que constava de um isolado em cada um dos veículos, foram feitas três repetições por tempo de leitura, e cada um possuía sete tempos de leitura. Estes tubos foram armazenados em temperatura

ambiente ao abrigo de luz. A quantificação de células viáveis nos veículos foi feita por diluição seriada seguida de plaqueamento e contagem de UFC. As contagens foram feitas 24 horas após a confecção dos inoculantes e então mensalmente até que o estoque completasse seis meses em bancada.

## **2.2.7 Identificação molecular dos isolados**

### **2.2.7.1 Extração do DNA genômico**

A identificação dos isolados foi feita através de sequenciamento do gene 16S. A extração do DNA foi feita através do protocolo de Stirling, (2003) modificado. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio ISP2 e mantidos sob agitação a 28°C por 72 horas. Após a incubação, as culturas foram colocadas em microtubos com tampa de rosca de 2 mL de capacidade e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e então foi adicionado 0,2g de pérolas de vidro, 200 µL de tampão A (Tabela 3), solução 1:1 de fenol + CIA (Clorofórmio e álcool isoamílico 24:1) e esta mistura foi agitada por 3 minutos. Foi então adicionado TE (Tris 1M e EDTA 0,5M 5:1, pH8) e as amostras centrifugadas novamente. A fase aquosa do sobrenadante foi então transferida para novo tubo e 200µL de CIA foram novamente aplicados, seguido de nova centrifugação para que qualquer resíduo de fenol fosse eliminado. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo e a ele foram adicionados 1000 µL de álcool absoluto. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foram então adicionados 1000µL de etanol 70% seguida de nova centrifugação e descartado novamente o sobrenadante. Os microtubos com o DNA precipitado foram então mantidos em banho seco por 40 minutos para secagem. Por último foram adicionados 40µL de TE e 1µL de RNase a cada amostra e estas foram mantidas em aquecimento por 30 minutos.

Tabela 3 – Composição do Tampão de Extração A para cada 10 amostras

<b>Substância</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração final</b>
Triton X 100%	40 µL	2%
SDS10%	200 µL	1%
NaCl 5 M	40 µL	100 mM
Tris-HCl pH 8 1M	20 µL	10 mM
EDTA pH 8 0,5 M	4 µL	1mM
Água miliQ estéril	1796 µL	-

### 2.2.7.2 Amplificação do 16S rRNA

Foi feita a amplificação do gene 16S rRNA através de PCR com o uso dos primers 8F e 1497R. Para cada reação foram utilizados: 1 µl de DNA, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2µl de dNTP 0,2 mM, 5 pmol de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase, DMSO 5% e água deionizada para completar um volume total de 50 µl. Os ciclos de temperatura utilizados durante a reação de PCR foram: desnaturação inicial a 93°C por 1 min, 30 ciclos de desnaturação a 93°C por 45 s, anelamento a 57°C por 45 s e polimerização a 72°C durante 2 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

### 2.2.7.3 Purificação dos fragmentos de DNA e quantificação em gel de agarose

Os fragmentos amplificados foram purificados usando o kit QIAquick (QUIAGEN) para purificação. Após a purificação, o DNA foi então quantificado através de um espectrofotômetro (Nanodrop) e a qualidade verificada visualmente em eletroforese em gel de agarose 1%.

### 2.2.7.4 Processamento das sequências e anotação

Para o sequenciamento das amostras foi utilizado um sequenciador de DNA ABI 3130XL. Cada isolado teve o gene de 16S rRNA sequenciado a partir do produto purificado da PCR com a utilização de múltiplos primers (3-5, conforme necessário), resultando em um fragmento de ~1490 pb com qualidade Phred > 20 para cada amostra.

### **2.2.8 Análise dos dados**

Para a análise estatística dos dados dos testes de antagonismo *in vitro* e *in vivo*, interação com FMA *in vivo*, interação com coníferas e viabilidade dos isolados em diferentes veículos foi utilizado o teste de Tukey (5%) com o auxílio do aplicativo estatístico Sisvar (FERREIRA 2008). A avaliação do teste de germinação dos esporos foi feita pelo software estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute Inc), sendo utilizado Duncan e Dunnet (5%) para os testes de médias.

As sequências foram montadas e analisadas quanto à qualidade pelo software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA) e posteriormente analisadas com os aplicativos Classifier, do RDPII (COLE, 2009) e BLAST, do GeneBank (ALTSCHUL et al., 1990)

## **2.3 Resultados e discussão**

### **2.3.1 Isolamento, antagonismo e seleção**

Foram obtidos 215 isolados de actinobactérias, sendo 187 isoladas do plaqueamento em meio YCED e 28 em meio KB. O critério para a escolha das colônias nas placas foi exclusivamente morfológico, sendo repicadas colônias com aparência mais “seca”, coriácea, e/ou que apresentassem esporulação, crescimento lento, e que estivessem bem aderidas ao meio de cultura (Figura 10A). Originalmente o meio YCED foi testado por Crawford (1993) e comprovado como eficiente para isolamento de actinobactérias em solos britânicos rizosféricos e não rizosféricos. Anos mais tarde, Vasconcellos et al (2010) testaram a eficiência de isolamento de actinobactérias para cinco meios de cultura, dentre os quais YCED, que foi confirmado como eficiente no teste; e os resultados de isolamento apresentados pelo presente trabalho corroboram estes resultados.

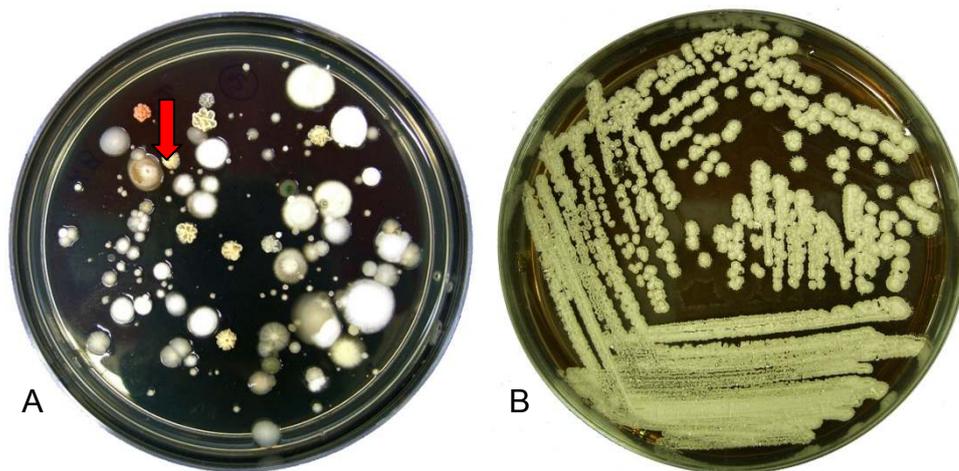


Figura 10 - Placa com meio YCED após o plaqueamento da diluição do solo e incubação (A) e placa com meio ISP2 estriada com isolado actinobacteriano após a purificação (B). É possível ver, na placa A, uma colônia característica de actinobactérias indicada pela seta vermelha

O meio KB por sua vez é normalmente utilizado para a visualização de bactérias produtoras de fluoresceína (KING; EARD; RANEY, 1954) e não para o isolamento de actinobactérias. Esta então é a principal razão pela qual um número menor de isolados foi obtido no isolamento com este meio, tendo apenas 28 isolados (13%). Dependendo da intenção no isolamento este não é o meio mais adequado para ser utilizado, no entanto, o presente trabalho tinha como objetivo o isolamento de actinobactérias que apresentassem inibição de fungos, e o meio KB favorece o isolamento de bactérias que apresentam produção de sideróforos, substância que inibe o crescimento de fungos pela privação de ferro. Dentro deste contexto o uso deste meio foi conveniente.

Após o isolamento e purificação dos isolados actinobacterianos, todos os 215 foram pareados com o fungo fitopatogênico *F. oxysporum* em teste qualitativo (Figura 11A). Dentre os 215 isolados, 55 (26%) mostraram alguma inibição do crescimento do micélio deste fungo (46 isolados em YCED e 9 em KB). Os isolados que apresentaram antagonismo contra *F. oxysporum* foram então pareados com *C. candelabrum* (Figura 11B), e 39 deles (71%) apresentaram algum grau de inibição deste patógeno (Tabela 4). Foram feitas então medidas dos halos de inibição de ambos os fungos e foi constatado que as estirpes isoladas em meio KB mostraram-se bem agressivas na inibição de ambos os patógenos quando comparados os tamanhos dos seus halos de inibição com os das actinobactérias isoladas nos dois meios (Tabela 4). Uma possível razão para este fato é o meio KB não ter adição de Fe (ALEXANDER; ZUBERER, 1991), sendo inclusive utilizado para a detecção da

produção de sideróforos. Isso resulta no favorecimento de bactérias capazes de produzir estas substâncias. Com isso, a produção de ao menos uma substância antimicrobiana já é garantida. Além disso, os sideróforos produzidos pelas bactérias possuem uma afinidade maior com o ferro do que os produzidos por fungos, garantindo que esta característica iniba o crescimento dos mesmos (MISK; FRANCO, 2011). A porcentagem de estirpes capazes de controlar os fungos isolados em YCED está dentro dos valores encontrado em literatura (CUESTA et al 2010), enquanto que a porcentagem de isolados antagonistas isolados em KB foi mais alta (Tabela 4).

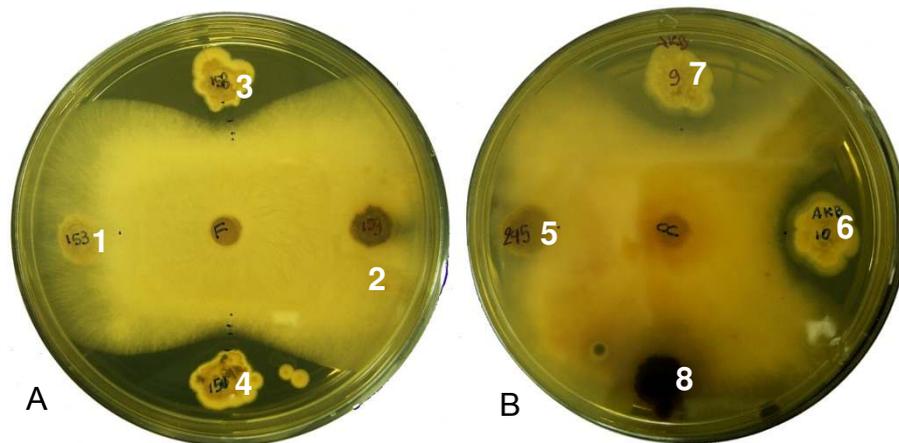


Figura 11 - Teste qualitativo de antagonismo por pareamento em placa de isolados de actinobactérias contra *F. oxysporum* (A) e *C. candelabrum* (B). É possível ver na placa com *F. oxysporum* dois isolados que não apresentam inibição (1 e 2) e dois que apresentam (3 e 4), assim como na placa com *C. candelabrum*, com dois isolados que não inibem (5 e 8) e dois que inibem (6 e 7)

Tabela 4 - Medida do halo de inibição dos 56 isolados actinobacterianos capazes de inibir o crescimento de *F. oxysporum* (F.o.) e *C. candelabrum* (C.c.)

Isolado	F.o.	C.c.	Meio de isolamento	Isolado	F.o.	C.c.	Meio de isolamento
AC 8	3	5	YCED	AC 90	3	0	YCED
AC 9	1	7	YCED	AC 94	0,5	1,5	YCED
AC 11	3,5	0	YCED	AC 99	2,5	2,5	YCED
AC 19	2,5	0	YCED	AC 104	0	4	YCED
AC 20	0,5	1	YCED	AC 105	5,75	6	YCED
AC 23	5,25	6	YCED	AC 107	3,25	3	YCED
AC 24	5	6	YCED	AC 110	6	7	YCED
AC 25	2	3	YCED	AC 113	1,75	4,5	YCED
AC 28	0,05	0	YCED	AC 117	0,5	1	YCED
AC 33	3,5	4	YCED	AC 118	2,5	2	YCED
AC 36	0,5	0	YCED	AC 128	1	0	YCED
AC 38	0,5	0	YCED	AC 136	6	4,5	YCED
AC 42	1,75	3	YCED	AC 139	1	0	YCED
AC 59	2	2	YCED	AC 166	0,3	2,5	YCED
AC 63	1	3	YCED	AC 171	0,5	0	YCED
AC 64	4,5	1,5	YCED	AC 175	2	0	YCED
AC 66	3	0,5	YCED	AC 176	0,75	0	YCED
AC 67	0,5	0	YCED	AC 184	0,05	1,5	YCED
AC 68	1	0	YCED	AC 189	4,5	4	KB
AC 71	1,5	3,5	YCED	AC 190	1,75	1	KB
AC 72	3,5	1	YCED	AC 192	5	5	KB
AC 73	0,5	2	YCED	AC 196	4	7	KB
AC 74	0,5	1	YCED	AC 197	1,25	1,5	KB
AC 77	2,5	3	YCED	AC 200	2,5	5	KB
AC 78	1,5	2	YCED	AC 201	6	1	KB
AC 79	1,5	0	YCED	AC 202	4,75	2	KB
AC 87	1	0	YCED	AC 207	4,75	5	KB
AC 88	0,25	0	YCED	A43	2,25	2	-

Os halos de inibição dos 39 isolados capazes de controlar o crescimento de ambos os fungos foram então avaliados quantitativamente, o que resultou na seleção de 13 isolados que apresentaram os melhores resultados na inibição de ambos os fungos (Ac8, Ac9, Ac24, Ac33, Ac105, Ac110, Ac136, Ac189, Ac192, Ac196, Ac200, Ac202 e Ac207) para os posteriores testes (Figura 12). Dos 13 isolados, sete (54%) foram isolados em meio YCED e seis (46%) em meio KB. Observando estas porcentagens pode-se dizer que há mais estirpes provenientes do isolamento em meio YCED do que do meio KB presente entre as 13 com melhor desempenho, porém, olhando-se o número inicial de isolados, 187 em YCED e 28 em KB, podemos dizer que apenas 3% das estirpes isoladas em YCED apresentaram alta eficiência no controle dos patógenos enquanto que para o

isolamento em meio KB, 21% das estirpes tiveram os melhores desempenhos. Isso novamente sugere a eficiência do meio KB em isolar microrganismos eficientes na inibição do crescimento de fungos principalmente ligada à produção de sideróforos. De acordo com Goto (1990), quando alguns microrganismos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos crescem em meio deficiente em ferro, eles são capazes de sintetizar sideróforos.

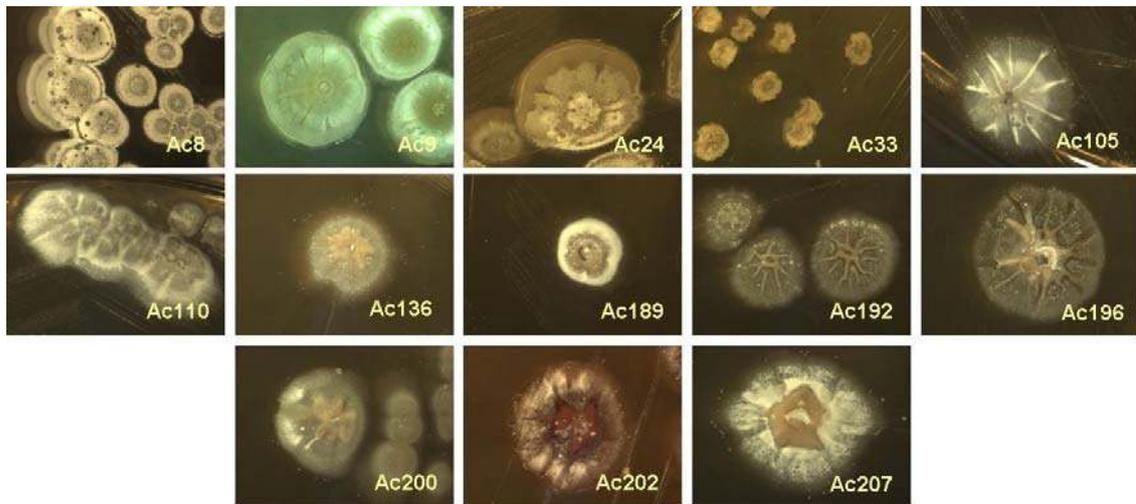


Figura 12 - Imagens em aumento de 8X das colônias das 13 actinobactérias com melhor desempenho no antagonismo aos dois fungos fitopatogênicos testados

Tabela 5 - Comparação entre desempenho de dois meios na seleção de actinobactérias antagonistas a fungos fitopatogênicos. %F.o. = porcentagem do total de actinobactérias isoladas em cada um dos meios de cultura capazes de controlar *F. oxysporum*; %C.c. = porcentagem de actinobactérias capazes de controlar *F. oxysporum* capazes de controlar *C. candelabrum*; H F.o. = média dos halos de inibição de *F. oxysporum* aos 5 dias; H C.c. = média dos halos de inibição de *C. candelabrum* aos 5 dias

Meio	% F.o.	%C.c.	H F.o. (mm)	H C.c. (mm)
YCED	24,60	76,60	1,98	2,05
KB	32,14	100,00	3,83	3,50

Os 13 isolados selecionados foram submetidos a testes quantitativos de antagonismo contra quatro espécies de fungos fitopatogênicos (Tabela 1). Além destes foi também utilizado um isolado actinobacteriano comprovadamente eficiente no controle in vitro dos patógenos *F. oxysporum* e *Armillaria* sp. como controle

positivo, o isolado A43 (VASCONCELLOS & CARDOSO 2009). No teste de pareamento contra *F. oxysporum* (Figura 14A), os isolados Ac105, Ac110, Ac136, Ac189, Ac202 e Ac207 apresentaram as maiores inibições, enquanto que as inibições mais baixas foram apresentadas pelos isolados A43, Ac24, Ac33 e Ac192 (Figura 13A). No teste de pareamento dos isolados de actinobactérias contra *C. candelabrum* (Figura 14B) os isolados mais eficientes foram Ac9, Ac24, Ac105, Ac110, Ac136, Ac189, Ac196, Ac202 e Ac207, e os menos eficientes, não se diferenciando do controle, foram A43, Ac33, Ac192 e Ac200 (Figura 13 B).

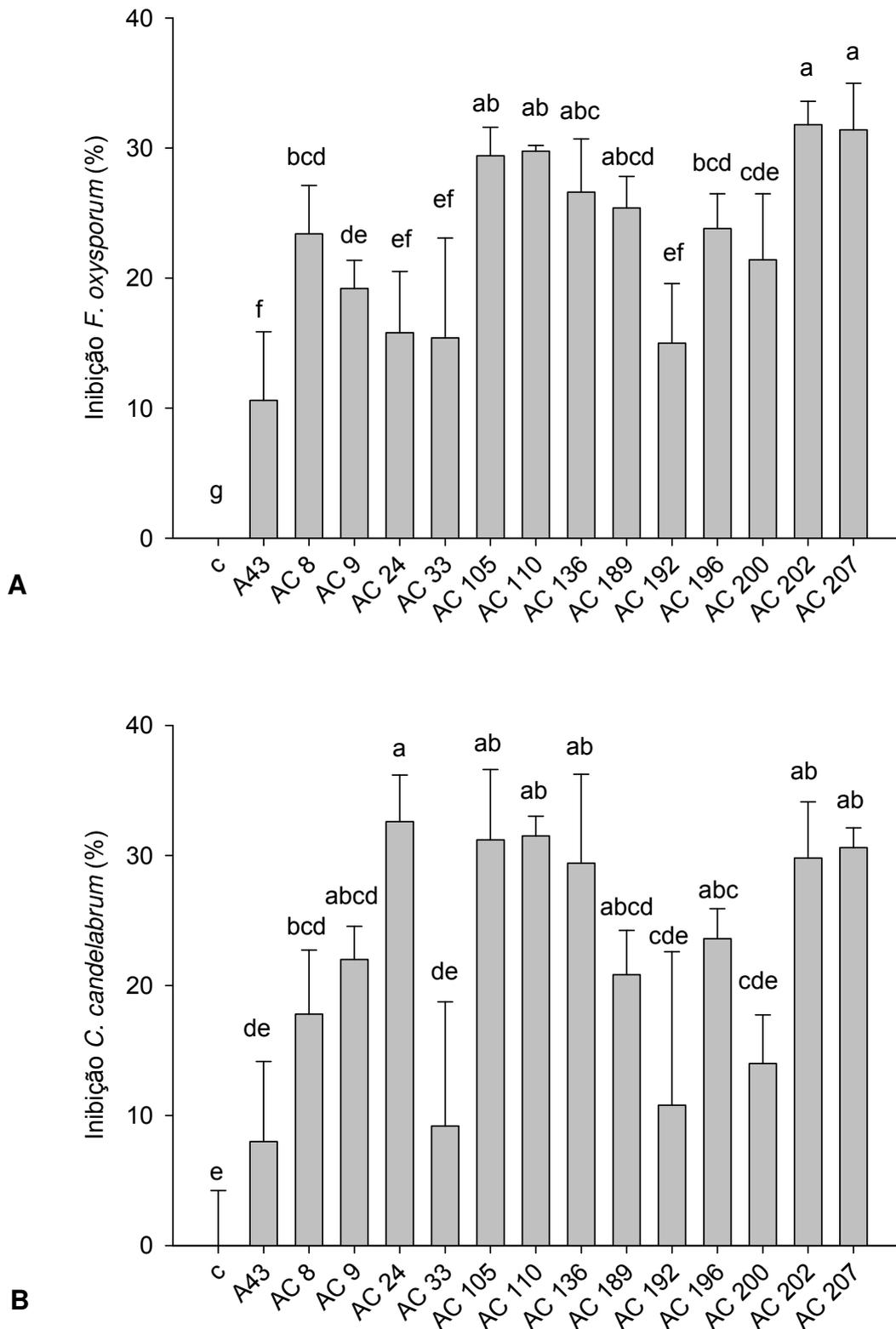


Figura 13 - Inibição percentual do crescimento micelial de *F. oxysporum* (A) e *C. candelabrum* (B) por isolados de actinobactérias. As barras representam o desvio padrão das médias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente

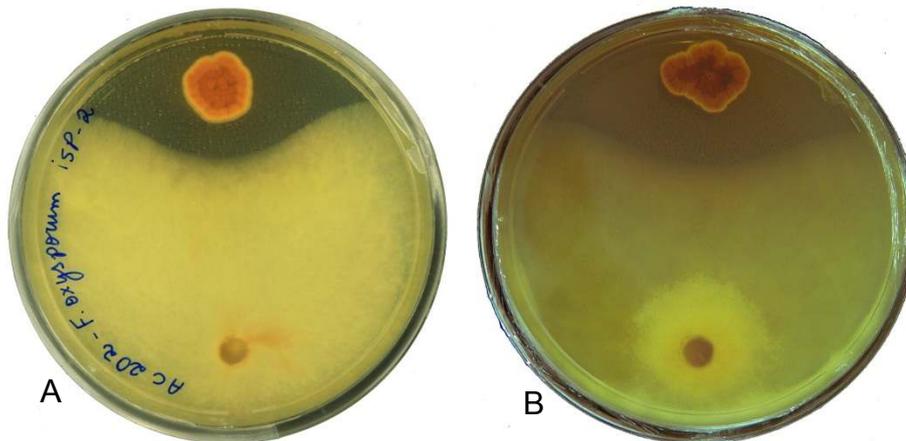


Figura 14 - Teste quantitativo de antagonismo por pareamento em placa de isolados de actinobactéria (isolado Ac202) contra *F. oxysporum* (A) e *C. candelabrum* (B)

Os testes com os fungos *C. pteridis* e *Armillaria* sp., que foram feitos em meio líquido, apresentaram resultados mais acentuados quando comparados aos testes de pareamento em placa, cuja inibição mais acentuada encontrada foi de 32,60% (*C. candelabrum* por Ac24), enquanto que nos testes em meio líquido vários isolados inibiram 100% do crescimento do fungo. A razão para este fenômeno provavelmente é que no teste de pareamento, o fungo e a bactéria são postos a certa distância um do outro, além de serem inoculados no mesmo dia. Com isto a bactéria ainda não iniciou a produção de substâncias antimicrobianas. Até que a bactéria comece a se multiplicar e produzir os metabólitos responsáveis pela inibição do fungo, este tem tempo e espaço para se desenvolver antes que entre em contato com as substâncias inibidoras. Já nos testes em meio líquido, o fungo entra em contato com os antimicrobianos assim que inoculado no meio de cultura e desta forma passa a ser inibido imediatamente. No teste de inibição de *C. pteridis*, os isolados Ac136 e Ac202 tiveram o melhor desempenho, inibindo 100% do crescimento do fungo, enquanto que o isolado com pior desempenho foi Ac192, que não diferiu do controle (Figura 15 A). Já no teste de inibição de *Armillaria* sp. oito isolados, Ac105, Ac110, Ac136, Ac189, Ac196, Ac200, Ac202 e Ac207 obtiveram os melhores desempenhos, tendo inibições variando de 98,14% a 100%. Os isolados de pior desempenho no teste de antagonismo contra *Armillaria* sp. foram Ac9, Ac24 e Ac33, com 13,9%, 17,1 e 21% de inibição, respectivamente (Figura 15 B).

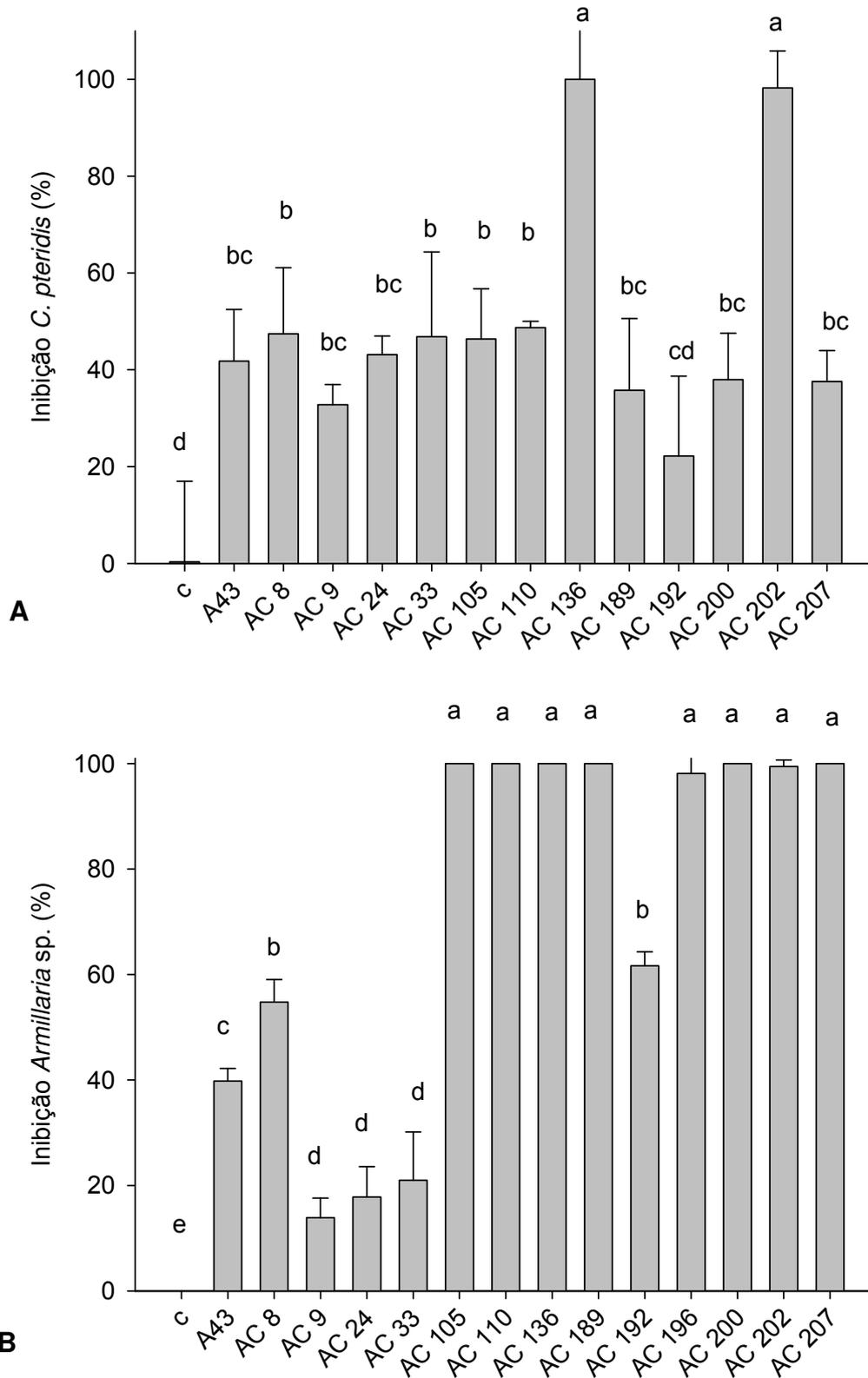


Figura 15 - Inibição percentual do crescimento micelial de *C. pteridis* (A) e *Armillaria* sp. (B) por isolados de actinobactérias em meio líquido. As barras representam o desvio padrão das médias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente

Quando se comparou a inibição provocada nos patógenos por estas actinobactérias com a provocada pelo isolado A43 obtido anteriormente por

Vasconcellos e Cardoso (2009), verificou-se que este último foi superado por muitos dos novos isolados. Isso pode ser em consequência de diferenças nas metodologias utilizadas nos dois casos. Seguindo Misk e Franco (2011), o trabalho anteriormente citado obteve a esporulação do isolado antes de ser feita a inoculação dos fungos. Com isso aguardou-se que a actinobactéria em questão iniciasse a produção de seus metabólitos secundários antes que se colocasse o fitopatógeno na placa, fornecendo uma vantagem para a bactéria. Além disso, as actinobactérias isoladas no presente trabalho apresentavam esporulação em tempo menor quando comparada à esporulação de A43, e com isso provavelmente passavam a produzir substâncias antimicrobianas mais rapidamente. Com os isolados actinobacterianos e os patógenos sendo inoculados no mesmo dia, os isolados que produzissem antimicrobianos mais rapidamente passavam a inibir o crescimento do fungo mais cedo e, conseqüentemente, com maior eficiência. Esta situação também é mais condizente com um suposto contato entre o patógeno e seu antagonista no solo, pois o patógeno não irá aguardar a produção de substâncias antimicrobianas por parte do antagonista para que então possa atacar as raízes do hospedeiro. Também deve ser levado em consideração o fato de que A43 foi isolada dois anos antes das estirpes do presente estudo, tendo então sido repicada diversas vezes. As consecutivas repicagens em um meio onde não há competição como ocorreria no solo, pode levar o isolado a diminuir a produção de metabólitos secundários responsáveis pela inibição do patógeno.

Após os testes de inibição contra os quatro patógenos, foram selecionados dois isolados com melhor desempenho na inibição dos fungos. Foi feita uma tabela (Tabela 6) apenas com os isolados que apresentaram o melhor resultado para cada fungo. Como o objetivo do trabalho foi obter isolados eficientes no controle destes quatro patógenos que atingem coníferas foi verificado quais isolados estavam presentes nas quatro colunas da tabela, isto é, os isolados capazes de inibir com a maior eficiência todos os quatro patógenos, sendo estes considerados os mais eficientes dentre todos eles. Foram eles os isolados Ac136 e Ac202. Cuesta et al. (2010) também encontraram isolados de actinobactérias com alta capacidade antagônica frente a cinco espécies de fungos fitopatogênicos, sendo que 25% das estirpes isoladas de solo e compostos orgânicos apresentaram antagonismo a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium debaryanum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Thanatephorus cucumeris*. Oliveira, Silva e Sand (2010) isolaram 70

estirpes de actinobactéria, das quais 88,6% apresentaram atividade antimicrobiana contra ao menos um dos dezesseis fitopatógenos testados, dos quais oito eram fungos filamentosos. No entanto, apenas três isolados foram capazes de inibir todos os fungos testados.

Tabela 6 - Isolados mais eficientes na inibição de crescimento de cada um dos patógenos. Em negrito encontram-se os isolados que apresentaram os melhores resultados nos testes de inibição para todos os 4 fungos

<i>F. oxysporum</i>	<i>C. candelabrum</i>	<i>C. pteridis</i>	<i>Armillaria sp</i>
Ac105	Ac9	<b>Ac136</b>	Ac105
Ac110	Ac24	<b>Ac202</b>	Ac110
<b>Ac136</b>	Ac105		<b>Ac136</b>
Ac189	Ac110		Ac189
<b>Ac202</b>	<b>Ac136</b>		Ac196
Ac207	Ac189		Ac200
	Ac196		<b>Ac202</b>
	<b>Ac202</b>		Ac 207
	Ac207		

Os resultados obtidos *in vitro* nem sempre são semelhantes àqueles obtidos em campo e, desta forma, não podemos extrapolar os resultados obtidos para uma situação *in vivo*. Existe a esperança de que os isolados apresentem a mesma eficácia no controle dos patógenos *in vivo*, mas isto também dependerá da capacidade destas bactérias em se estabelecer na rizosfera das plantas, além de conseguir competir com os micro-organismos já existentes no solo. Estes têm sido os desafios com relação à obtenção de isolados que apresentem eficiência em campo, pois logo após a inoculação de algum isolado bacteriano no solo, se este não estiver muito bem adaptado às condições reinantes, sua população passa a declinar rapidamente. Estudo feito com bactérias estimulantes de fungos ectomicorrízicos demonstrou que nas primeiras semanas após a inoculação, as suas populações apresentam declínio acentuado, sendo por fim sua presença indetectável na rizosfera das plantas após duas semanas (FREY-KLETT et al., 1999). Por outro lado, estudos como o de Lehr et al. (2007) demonstram a possibilidade de estudos feitos *in vitro* poderem apresentar resultados semelhantes *in vivo*. Os autores testaram a atividade inibitória do isolado AcH505, um estreptomiceto, contra 12 estirpes de fungos do gênero *Heterobasidion*, um

importante causador de doença em *Picea abies*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e constatou que 11 das 12 estirpes do patógeno foram controladas pelo isolado actinobacteriano. Cao et al. (2005) isolaram 131 isolados de actinobactérias endofíticas de raízes de bananeira, e destas 18,3% foram capazes de inibir o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *cubense in vitro*, e em experimento *in vivo* o isolado S96 (*Streptomyces griseorubiginosus*) foi capaz de reduzir significativamente a severidade da doença causada pelo fungo.

### 2.3.2 Produção de substâncias antimicrobianas

Foram feitos testes para a verificação de substâncias antimicrobianas que os isolados podem produzir e que inibem o crescimento dos fungos. Nesta avaliação foram utilizados os 13 isolados estudados nos testes de antagonismo, além do controle positivo A43. Foi verificado que a maioria dos isolados foi capaz de produzir ao menos uma das substâncias antimicrobianas avaliadas

A produção de sideróforos foi a mais frequente, sendo estes produzidos por nove entre os 14 isolados avaliados (64%). Todos os isolados provenientes do isolamento em KB e selecionados para esta fase (Ac189, Ac192, Ac196, Ac200 e Ac202) apresentaram a produção deste metabólito, enquanto que das estirpes isoladas em YCED, apenas 3 (43%) os produziram. Isto novamente é uma indicação de que talvez este meio de cultura possa atuar na seleção de actinobactérias capazes de produzir esta substância importante na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos. O número de isolados inibidores capazes de produzir esta substância sugere que ela esteja ligada ao controle do crescimento dos patógenos nos testes de antagonismo *in vitro*. A inibição dos patógenos pelos sideróforos varia de acordo com a habilidade deste metabólito em sequestrar ferro. De uma maneira geral os sideróforos bacterianos privam os fungos fitopatogênicos deste elemento essencial já que os sideróforos fúngicos possuem afinidade menor com o Fe (LOPER; HENKELS, 1999). Além de serem substâncias antimicrobianas, estes metabólitos também podem auxiliar plantas na nutrição por ferro (OLIVEIRA; SILVA; SAND, 2010), trazendo assim mais um potencial benefício às plantas que com estes isolados sejam inoculadas. Khamna, Yokota e Lumyong (2009) isolaram, 445 estirpes de actinobactéria, das quais 75 foram capazes de produzir esta substância.

Além disso, os autores afirmam que os sideróforos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* são do tipo hidroxamato.

A segunda substância mais produzida foi a celulase, sendo detectada em 3 (Ac8, Ac9, Ac24) dos 13 isolados (21%), seguida de apenas dois isolados capazes de produzir quitinases (14%). Nenhum isolado produziu  $\beta$ -glucanases. Estas substâncias estão relacionadas com a inibição de fungos fitopatogênicos através da lise da parede celular, que tem como principais componentes a quitina, as  $\beta$ -glucanases e, no caso dos oomycetos como os importantes patógenos *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp., a celulose. A baixa porcentagem de enzimas ligadas à degradação da parede celular dos fungos sugere que este não seja um dos principais mecanismos de inibição do crescimento dos mesmos. No entanto, vários trabalhos apresentam a produção de enzimas como importante mecanismo de inibição de doenças causadas por fungos em plantas. Apesar de a celulase ter sido produzida por um maior número de isolados, este é o componente menos comum nas paredes celulares de fungos, sendo então a produção de quitinases a mais importante, já que  $\beta$ -glucanases não foram produzidas. El-Tarabily et al. (1996) demonstraram que tanto a produção de celulase pelo isolado actinobacteriano *Micromonospora inositola* quanto a aplicação da versão comercial desta enzima causaram a degradação da parede celular de *Phytophthora cinnamomi*. Além disso, a aplicação do isolado actinobacteriano *in vivo* diminuiu a severidade da doença causada por este fungo em *Banksia grandis*, embora não a tenha controlado totalmente. Já a produção de altos níveis de quitinase por *Actinoplanes missouriensis* foi responsável pela extensiva plasmólise seguida de lise da parede celular do fungo fitopatogênico *Plectosporium tabacinum*, reduzindo a severidade da doença causada pelo mesmo em tremoço. A comprovação de que esta degradação da parede celular foi consequência da produção de quitinas e foi que um isolado mutante de *A. missouriensis* incapaz de produzir tal enzima não causou lise celular no fungo (EL-TARABILY, 2003). El-Tarabily (2006) também relatou a produção de 3 tipos de  $\beta$ -glucanases por quatro isolados actinobacterianos (*Streptomyces griseoalbus*, *Microbispora rosea*, *Micromonospora chalcea* e *Actinoplanes philipinensis*), sendo estas enzimas responsáveis pela plasmólise e lise das hifas de *Pythium aphanidermatum* *in vitro*, além do controle do damping-off causado por este patógeno em experimento de casa de vegetação com pepino. A produção de quitinases e  $\beta$ -glucanases por isolados actinobacterianos pertencentes às espécies

*Serratiamarcescens*, *Streptomyces viridodlasticus* e *Micromonospora carbonacea* também foi relatada por El-Tarabily et al. (2000). Tais isolados se mostraram os mais eficientes antagonistas dentre 129 isolados de actinobactérias, e a produção destas substâncias causaram plasmólise das células do patógeno *Sclerotinia minor*. Macagnam et al. (2008b) também avaliaram a produção de quitinases, celulasas e  $\beta$ -glucanases em actinobactérias do gênero *Streptomyces*, no entanto, dentre os cinco isolados avaliados, nenhum produziu  $\beta$ -glucanases ou celulasas, mas todos foram capazes de produzir quitinases. De Boer et al. (1998) e Macagnam et al. (2008b) sugerem que as bactérias mais eficientes na inibição de fungos fitopatogênicos seriam as capazes de produzir quitinases, no entanto, o presente trabalho mostra que apenas uma pequena porcentagem dentre os 13 isolados mais eficientes no controle dos fungos são capazes de produzir esta enzima lítica. Por outro lado, a maioria dos isolados foi capaz de produzir sideróforos, logo podemos supor que esta foi a substância de maior importância dentre as avaliadas neste trabalho na inibição dos quatro patógenos testados.

A produção de HCN não foi detectada em nenhum dos isolados avaliados. Esta substância volátil é atuante na inibição de enzimas envolvidas na respiração microbiana, mas parece não ser muito comum sua síntese, apesar de já terem sido encontradas actinobactérias capazes de produzi-la (MACAGNAM, 2005; GOPALAKRISHNAN et al., 2011).

Apenas os isolados A43 e Ac33 não foram capazes de produzir nenhuma das substâncias avaliadas, mas, sem dúvida, estes dispõem de outros mecanismos que não foram avaliados neste estudo. Apesar de terem sido evidenciadas algumas das substâncias potencialmente antimicrobianas produzidas por estas bactérias, não podemos afirmar que estas são as principais responsáveis pela inibição de crescimento dos patógenos. Estes micro-organismos são capazes de produzir diversas substâncias dentre as quais muitas substâncias fungicidas não avaliadas neste estudo. Estas podem ter tido maior peso na inibição dos fungos, assim como também pode ter sido a ação de uma ou mais substâncias em conjunto com as encontradas nas avaliações feitas, o que é, aliás, mais provável, já que é raro que o controle seja feito por apenas um mecanismo. Um agente de controle bem sucedido, de uma maneira geral, é equipado com várias características que agem em conjunto e são cruciais para o resultado final (GERHARDSON 2002).

### 2.3.3 Interações entre actinobactérias e outros organismos: microrganismos benéficos e coníferas

#### 2.3.3.1 Interação com RPCP e fungos micorrízicos

A capacidade de controlar o crescimento de fungos leva a uma dúvida com relação à interação destes isolados com outros micro-organismos que não sejam prejudiciais às plantas, e muitas vezes até benéficos.

Neste experimento (Figura 16) verificou-se que 9 dos 14 isolados actinobacterianos testados (64%) inibiram o crescimento tanto de B4 (*Bacillus subtilis*) quanto de RISP2 (*B. amyloliquefaciens*). Apenas Ac8, Ac9, Ac24, Ac110 e Ac192 não interferiram no crescimento das RPCP, porém os dois isolados com melhor desempenho no controle dos fungos fitopatogênicos, Ac136 e Ac202, além do isolado A43, estavam entre as que interferiram.

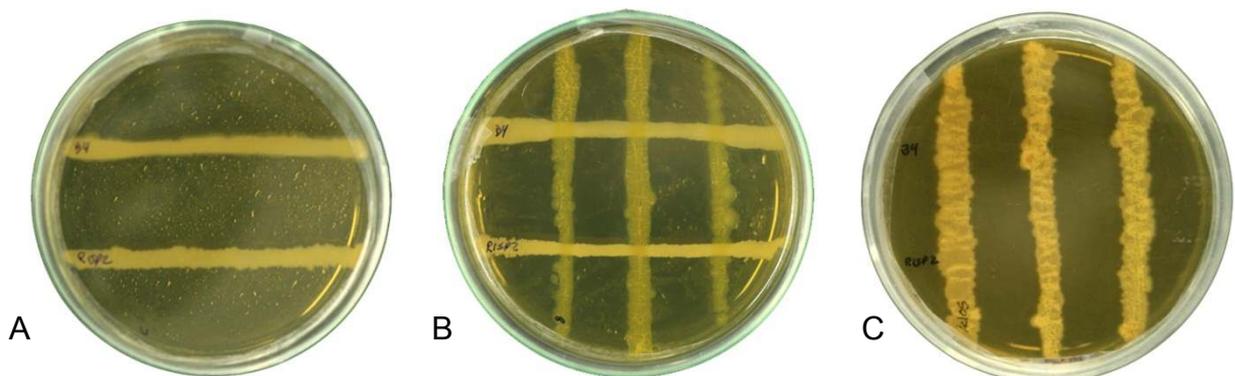


Figura 16 - Interação entre isolados de actinobactéria e RPCP. Isolados B4 e RISP2 estriados em placa sem inoculação de actinobactéria (A), isolado de actinobactéria sem atividade inibidora sobre os isolados de RPCP (B) e isolado de actinobactéria com atividade inibidora sobre RPCP (C)

O antagonismo que alguns dos isolados actinobacterianos apresentou aos dois isolados de RPCP pode ser prejudicial, visto que estes beneficiariam a planta, inclusive com atividade antagônica a fungos patogênicos de plantas. Isto também afetaria a eficiência de uma co-inoculação destas actinobactérias com estes isolados de *Bacillus*, ou mesmo os exemplares destas espécies nativas no solo. A inibição de bactérias pelos isolados de actinobactérias também sugere que as substâncias antagônicas produzidas por elas possam um amplo espectro de ação, podendo agir tanto em bactérias quanto em fungos e/ou que há uma produção de diversas substâncias dentre as quais algumas atuam sobre fungos e outras sobre bactérias.

Isto mostra um pouco do quanto as actinobactérias estão bem armadas para a competição existente no solo e também como são ainda fonte de diversas substâncias de interesse industrial. Também mostra que, mesmo sendo agentes de biocontrole, devem ser bem estudadas antes de se tornarem um produto comercial, para que não causem outros tipos de desequilíbrio à planta, prejudicando a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfato, dentre outras, ao serem aplicadas.

Já o fungo ectomicorrízico *S. brevipes* teve seu crescimento inibido por todos os isolados de actinobactéria (Figura 17).

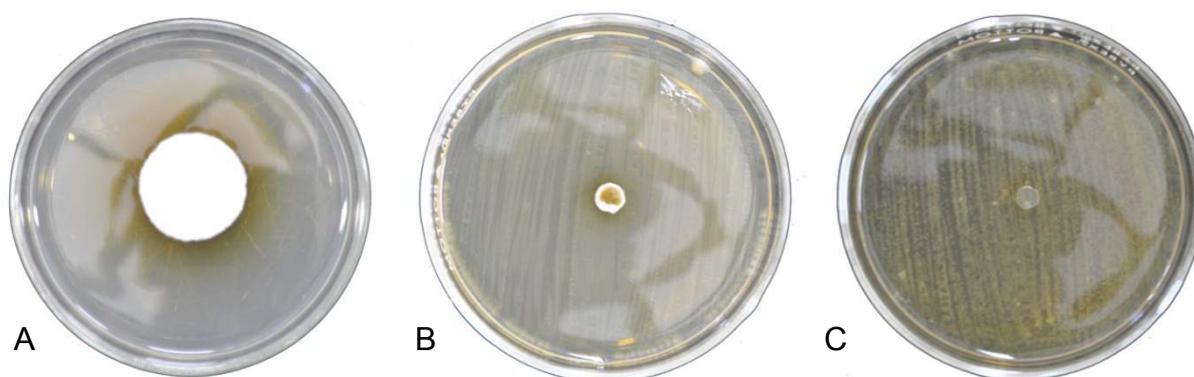


Figura 17 - inibição de crescimento do fungo ectomicorrízico *Suillus brevipes* por actinobactérias. Controle (A), A43 (B) e Ac 8 (C)

Richter et al. (1989) testaram a influência de estirpes de actinobactérias isoladas do micorrizoplano sobre três espécies de fungos ectomicorrízicos. A maioria apresentou algum tipo de efeito sobre estes, sendo que muitos inibiram o crescimento dos fungos e alguns estimularam. Estes autores ainda afirmam que os isolados têm potencial para serem co-inoculados com fungos ectomicorrízicos para o desenvolvimento de mudas. Schrey et al. (2005) avaliaram a interação de dois isolados de actinobactéria, Ach 505, inibidor de fungos fitopatogênicos, e Ach 1003, sem atividade inibitória de fungos fitopatogênicos, com quatro fungos ectomicorrízicos. Ambos os isolados actinobacterianos apresentaram o mesmo padrão de interação, apresentando aumento na taxa de crescimento das hifas de duas espécies micorrízicas, *Amanita muscaria* e *Suillus bovinus*, diminuição de uma (*Hebeloma cylindrosporum*) e sem alteração na taxa de crescimento da outra (*Paxillus involutus*). Os autores afirmam que o efeito estimulatório no crescimento dos EM foi resultante da ativação do metabolismo fúngico, que é estimulado através da mudança de expressão gênica pelas actinobactérias. Schrey et al. (2007)

constatarem um aumento no crescimento das hifas de *A. muscaria* em pareamento deste fungo ectomicorrízico com o isolado Ach505. Os autores atribuíram este estímulo a uma alteração no esqueleto de actina do fungo, causada por substâncias liberadas pelo isolado bacteriano. Em estudo conduzido por Lehr et al (2008) o crescimento das hifas do fungo fitopatogênico *Heterobasidion abietinum* foi estimulado ao ser inoculado em pareamento em placa com o isolado GB 402 (*Streptomyces* sp.). Além disso, a inoculação deste isolado bacteriano em *Picea abies* aumentou a infecção do córtex pelo fungo em função do estímulo do crescimento micelial provocado por esta bactéria. Ao mesmo tempo a colonização do cilindro vascular das plantas inoculadas com o isolado bacteriano foi atenuada em função de alterações na anatomia da parede celular de células do córtex e cilindro vascular como o engrossamento da parede celular das células presentes nestes locais. Desta forma os autores afirmam que apesar de estimular o crescimento do fungo, o isolado actinobacteriano induz respostas de defesa por parte da planta.

Para o FMA *G. rosea* a porcentagem de germinação dos esporos foi obtida na presença e na ausência das actinobactérias e estas foram analisadas estatisticamente através dos testes de Duncan e Dunnett. De acordo com ambos os testes houve efeito negativo da inoculação dos isolados actinobacterianos apenas na primeira linha, com distância de 7mm do inóculo bacteriano. Para a distância de 14 mm, a germinação não foi afetada. De acordo com o teste de Dunnett, os tratamentos que apresentaram diminuição na germinação com relação ao controle foram os inoculados com os isolados Ac202 e Ac136. As placas inoculadas com A43 não apresentaram diferenças na germinação quando comparadas ao controle. Já o teste de Duncan (Figura 18) mostrou que todos os tratamentos em que houve inoculação de bactérias diferiram do controle. A43 apresentou a menor redução na porcentagem de germinação, enquanto que Ac136 e Ac202 apresentaram os menores valores de germinação de esporos de fungo micorrízico.

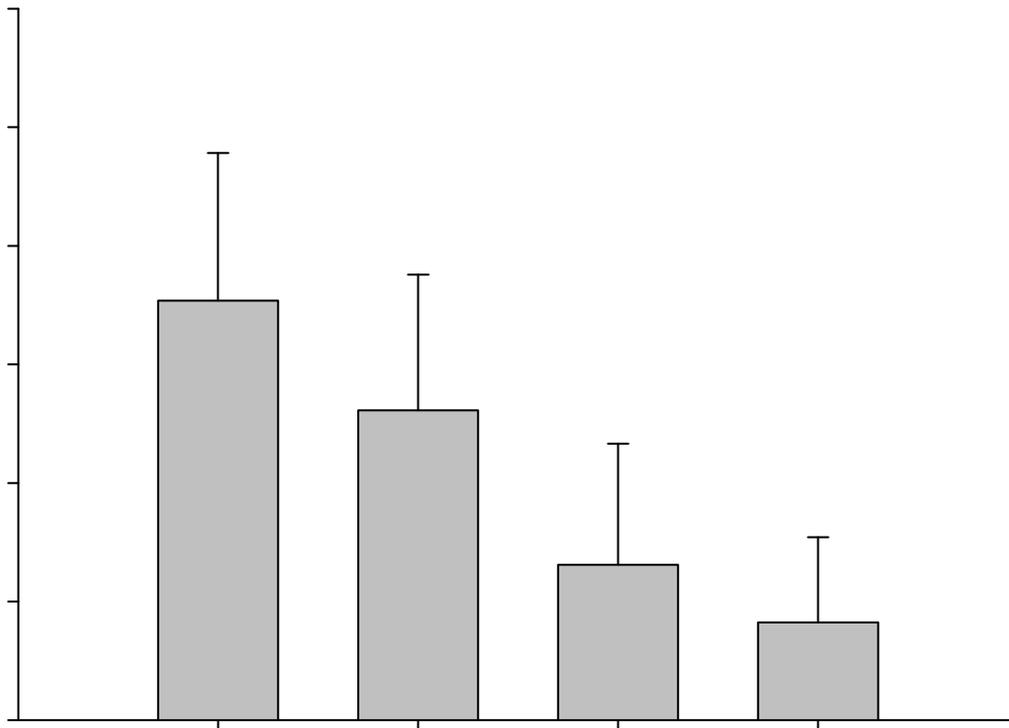


Figura 18 - Resultado do teste de Duncan para germinação de esporos de *Gigaspora rosea* em placas de petri inoculadas com isolados de actinobactéria na distância de 7 mm. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P < 0.05$ )

Os resultados obtidos *in vitro* sugerem que estes isolados de actinobactérias não podem ser denominados como “mycorrhiza helper bacteria” (MHB), pois o efeito delas sobre os fungos é justamente o contrário. No entanto, o efeito negativo em FMA aparece apenas quando os esporos encontram-se na linha mais próxima ao inóculo bacteriano. Em uma situação real, a população de actinobactérias seria menor, e o inóculo fúngico maior, havendo além de esporos, hifas e raízes de outras plantas micorrizadas. O que este experimento mostrou é que os isolados possuem um potencial para prejudicar a germinação de esporos de FMA no caso de se encontrarem em alta concentração. Entretanto, antes de se considerar este resultado como definitivo, há de se realizar experimento *in vivo*. Sabe-se também que algumas actinobactérias, em testes *in vitro*, podem estimular tanto a germinação dos esporos quanto o crescimento das hifas, como o reportado no trabalho de Franco-Correa et al. (2010). Carpenter-Boggs, Loynachan e Stahl (1995) testaram a influência de isolados actinobacterianos sobre a germinação de esporos do FMA

*Gigaspora margarita*. Alguns dos isolados bacterianos causaram um aumento na germinação do FMA, e este aumento foi atribuído à produção de compostos voláteis como o CO<sub>2</sub>, geosmina e 2-metilisoborneol pelos isolados actinobacterianos.

Na avaliação da interação entre os isolados actinobacterianos e o EM *S. brevipes* *in vivo* foi encontrado resultado oposto ao encontrado *in vitro* (Figura 19). Embora a porcentagem de colonização das raízes de *Pinus* tenha sido baixa de uma maneira geral, variando de 0,8% no tratamento controle a 4,8%, foi possível verificar que o isolado Ac202 estimulou a colonização das raízes pelo EM, apresentando o maior valor dentre os tratamentos. Já os outros dois isolados não apresentaram diferença significativa com relação ao controle.

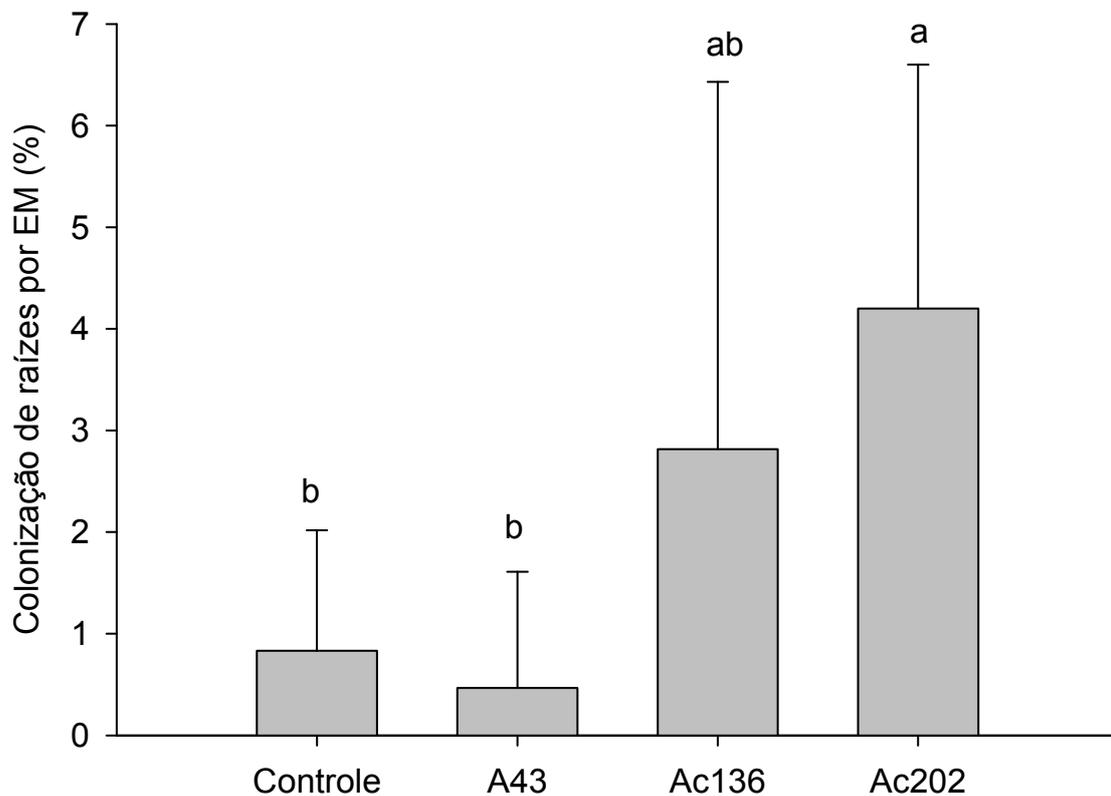


Figura 19 - Porcentagem de colonização das raízes de *Pinus elliottii* por *S. brevipes* na presença e ausência de actinobactérias

Em experimento *in vivo* para análise da influência da inoculação dos isolados actinobacterianos sobre FMA foi possível notar a interferência destes isolados sobre a colonização das raízes e esporulação. A colonização das raízes foi maior para as plantas inoculadas com Ac136 e Ac202 (Figura 20). Já nas plantas inoculadas com o isolado A43 a colonização não diferiu da do controle.

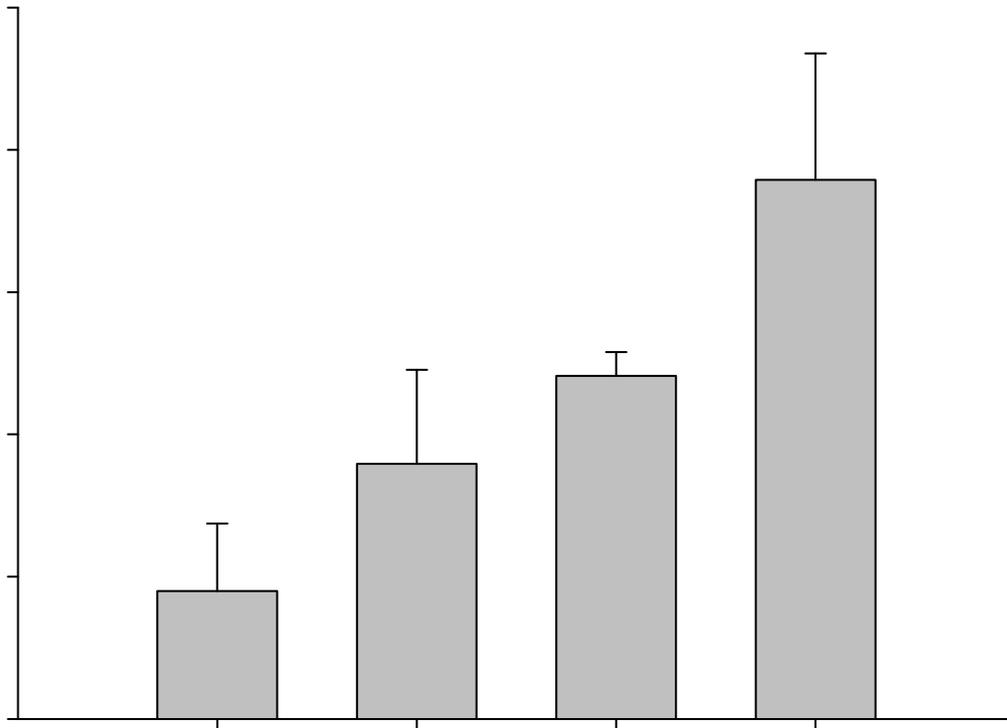


Figura 20 - Porcentagem de colonização das raízes de *Zea mays* por *G. rosea* na presença e ausência de actinobactérias

Já a esporulação foi afetada apenas pelo isolado A43, tendo um número menor de esporos encontrados no solo cultivado com a planta inoculada com este isolado (Figura 21).

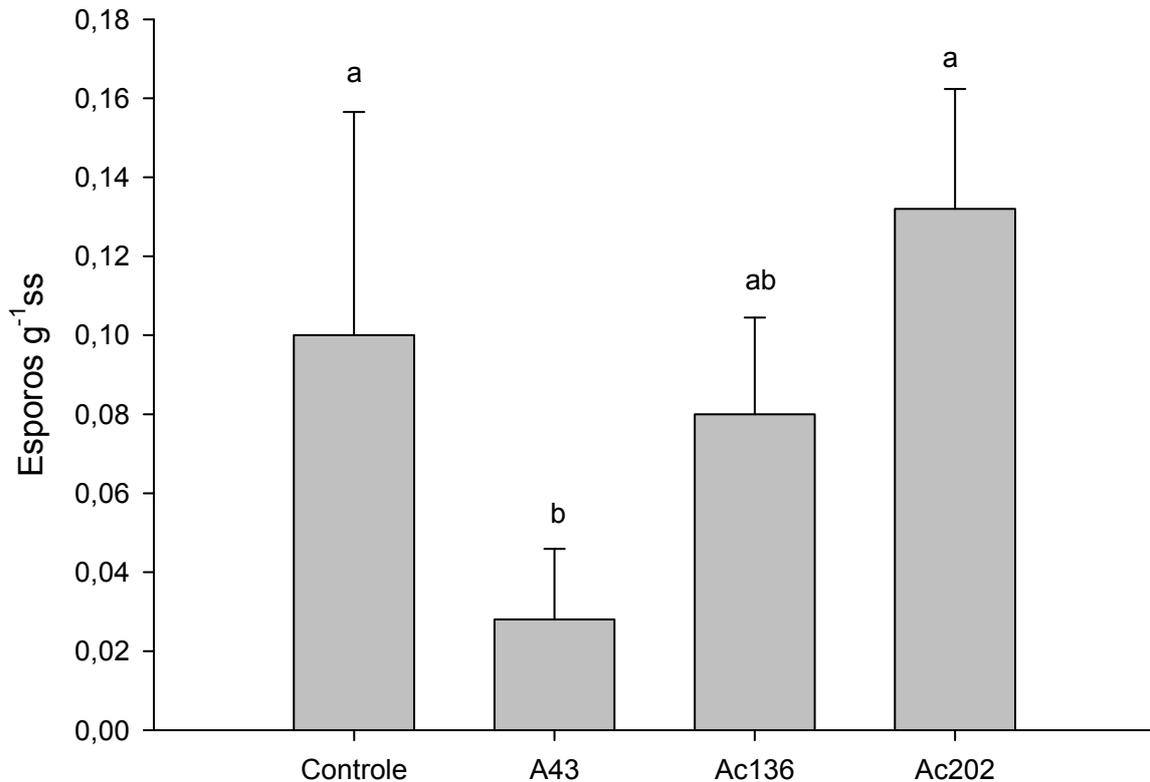


Figura 21 - Número de esporos por grama de solo seco produzido por *G. rosea* sem inoculação de bactérias (FMA) e com inoculação dos isolados A43, Ac136, Ac202

Apesar do efeito inibitório apresentado pelos isolados actinobacterianos tanto com relação à germinação dos esporos de *G. rosea* quanto ao crescimento de *S. brevipes* em experimento *in vitro*, não houve influência negativa sobre estes fungos micorrízicos ao ser feita a avaliação da ação destes isolados actinobacterianos *in vivo*, podendo então ser dito que estes não foram prejudiciais, e sim benéficos. Franco-Corrêa et al. (2010) encontraram resultados semelhantes para o isolado do gênero *Thermobifida* sp.. Esta actinobactéria inibiu a germinação de esporos de *Glomus* sp. tanto *in vitro* quanto *in solo*, enquanto que em experimento com trevo, este isolado aumentou a colonização das raízes, além da biomassa vegetal. Estes resultados mostram não só que os isolados Ac136 e Ac202 atuaram como MHB, mas também que resultados obtidos *in vitro* não necessariamente refletem a realidade. Uma outra suposição é que os isolados tenham induzido alterações na fisiologia da planta, tornando-a mais receptiva à infecção das raízes pelos fungos micorrízicos. Lehr et al. (2007) notaram que o isolado de actinobactéria Ach505, também considerada MHB, suprimiu a resposta de defesa de *Picea abies*,

diminuindo a atividade da peroxidase e também do gene PaSpi2 nas raízes desta conífera. Em parte este é um fato que pode contribuir para o aumento na micorrização da planta, facilitando a penetração do fungo micorrízico, mas por outro lado deve ser levado com cautela, pois a diminuição da resposta de defesa da planta pode também permitir a entrada de fungos fitopatogênicos nas raízes.

Com relação à produção de esporos, um número menor de esporos não deve necessariamente ser interpretado como negativo, já que esporos de fungo micorrízico são esporos de resistência e são formados diante de situações que representam estresse. Neste caso, a alta esporulação apresentada pelo tratamento controle, inoculado apenas com FMA, poderia até ser interpretada como estresse, frente à baixa colonização das raízes. Além do mais há o fato de o solo usado para o experimento ser pobre em nutrientes. No caso do tratamento controle poderia estar havendo uma disputa entre o fungo e a planta, o que justificaria a baixa colonização das raízes, já que a colonização é mediada pela planta.

### **2.3.3.2 Interação com coníferas**

A inoculação de actinobactérias nas sementes de *Pinus* e *Araucária* resultou em efeitos diferentes para cada espécie. No caso das sementes de *Pinus*, o controle não inoculado com isolados bacterianos apresentou sempre a menor porcentagem de germinação de sementes dentre os tratamentos, tanto aos 10 quanto aos 15, 20 e 25 dias (Figura 22A). As plantas inoculadas apresentaram respostas iguais com relação ao estímulo da germinação, com exceção das plantas inoculadas com Ac136 aos 10 dias, que apresentou uma resposta menor quando comparada às das plantas inoculadas com os dois outros isolados no mesmo período, mas ainda assim mais alto que o controle. Já no experimento utilizando sementes de *Araucária*, o efeito da inoculação de isolados de actinobactérias foi oposto ao efeito apresentado por *Pinus*. Aos sete dias, apenas a inoculação com o isolado Ac202 foi prejudicial à germinação, enquanto que A43 e Ac136 não diferiram do controle. No entanto, aos 30 dias, os três tratamentos com plantas inoculadas com bactérias tiveram menor altura e massa de planta quando comparados ao tratamento controle (Figura 22B). A inoculação de sementes de *Pinus roxburghii* com *Bacillus subtilis* (SINGH et al., 2008) também estimulou a germinação das sementes em uma porcentagem semelhante à encontrada neste trabalho, porém, este aumento pode ser

consequência de vários fatores como produção de fitormônios ou mesmo da produção de enzimas que ajudem no rompimento do tegumento da semente. Khamna et al. (2010) atribuíram o aumento da germinação de sementes de milho e feijão-de-corda à produção de ácido-indol-acético (AIA) por isolados do gênero *Streptomyces*. Haveria necessidade de estudos mais aprofundados para que a razão deste estímulo fosse elucidada. Já a diminuição na germinação das sementes de araucária pode ser consequência de alguma substância com efeito alelopático. Nos estudos de Dhanasekaran et al. (2011) quatro isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentaram atividade alelopática contra plantas, tendo sido considerados potenciais herbicidas.

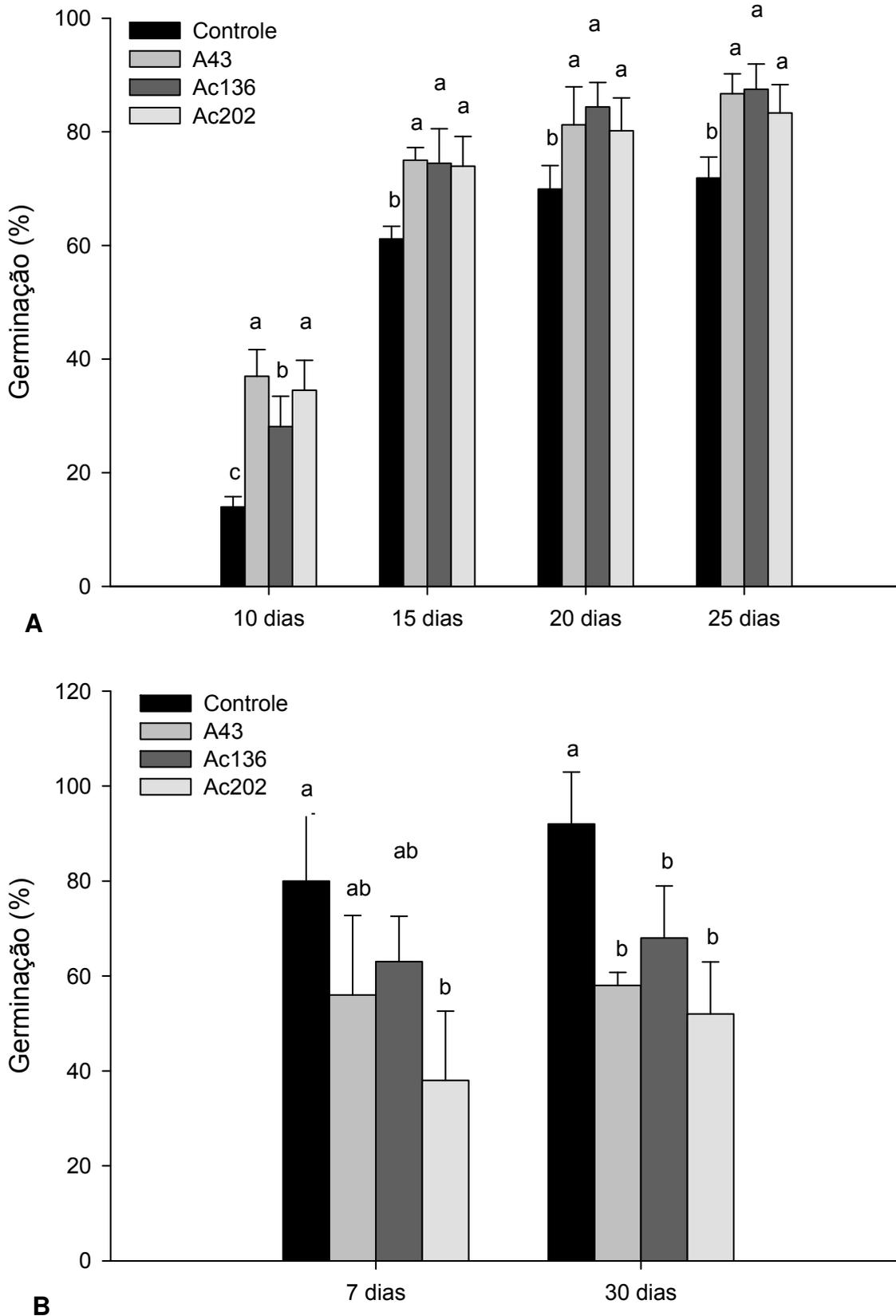


Figura 22 - Porcentagem de germinação de sementes de Pinus aos 10, 15, 20 e 25 dias (A) e de germinação de sementes de Araucária aos 7 e aos 30 dias (B), na presença ou não de actinobactérias antagonistas a fungos fitopatogênicos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P < 0.05$ )

Após a avaliação da influência dos isolados na germinação, procedeu-se a avaliação do desenvolvimento inicial das duas espécies. Notou-se que tanto as mudas de Pinus quanto de Araucária foram influenciadas pela inoculação dos isolados bacterianos, apresentando efeitos similares aos observados na avaliação da germinação. As mudas de Pinus não tiveram o desenvolvimento de suas raízes influenciado pela inoculação dos isolados no que diz respeito à massa seca produzida. No entanto, a massa seca da parte aérea teve um incremento de 41% em consequência da inoculação com o isolado Ac202, quando comparado à massa seca da parte aérea produzida pelas mudas do controle não inoculado (Figura 23A). No caso das mudas de Araucária (Figura 23B), a massa seca da parte aérea só apresentou diferenças com relação ao controle não inoculado no caso das plantas tratadas com o isolado Ac202, que apresentou uma redução de 46% no crescimento. A massa seca da parte aérea das plantas inoculadas com A43 e Ac136, no entanto, não apresentou diferenças com relação ao controle. No caso das raízes, as plantas inoculadas com os isolados Ac136 e Ac202 apresentaram a menor formação de massa quando comparada com as inoculadas com A43, que foi o tratamento com maior produção de massa seca de raízes. Já o tratamento controle não se diferenciou dos tratamentos com inoculação.

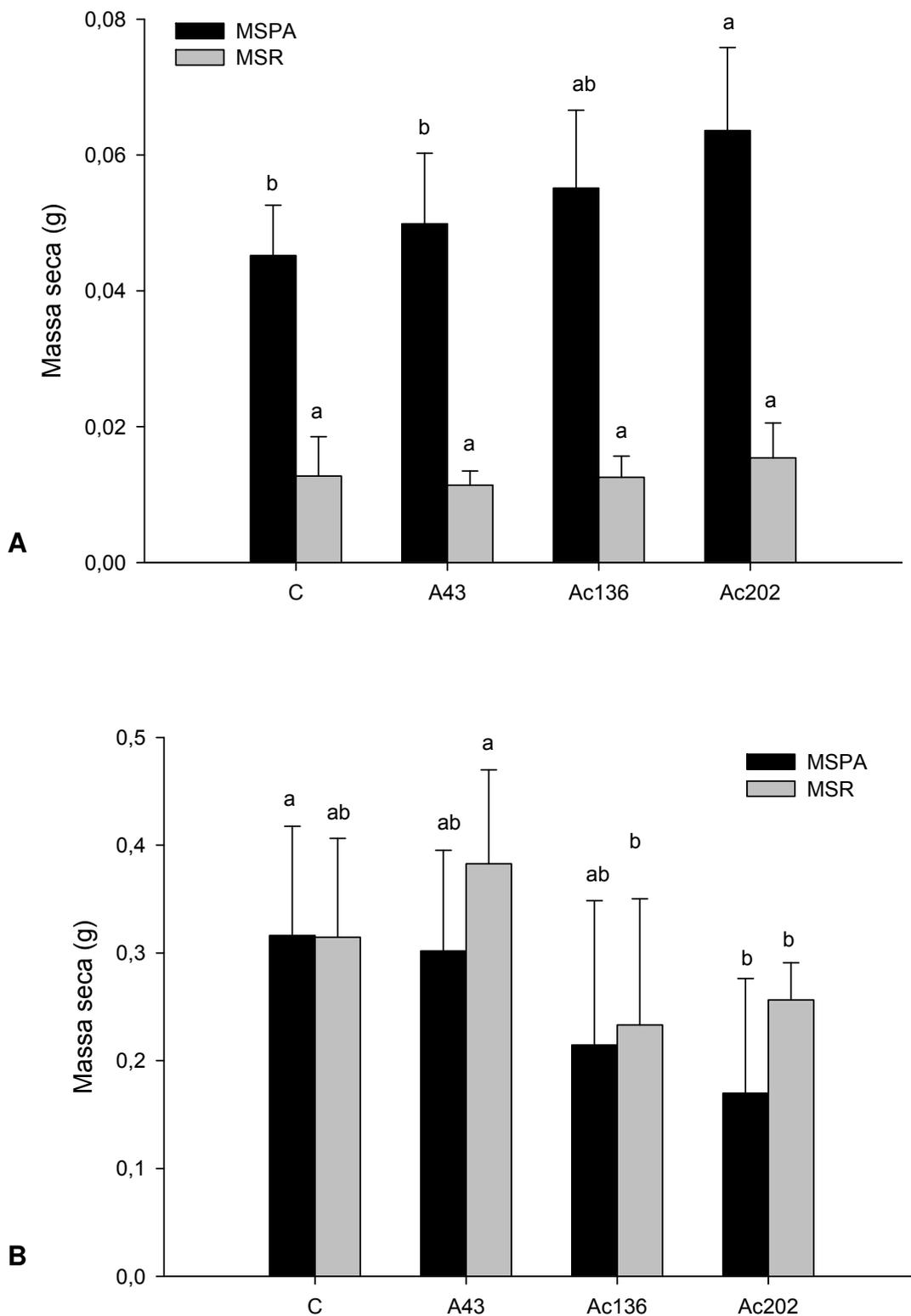


Figura 23 - Desenvolvimento inicial de mudas de *Pinus* aos 25 dias (A) e *Araucária* aos 30 dias (B), avaliado através da massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plantas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P < 0.05$ )

Assim como o ocorrido neste estudo com *P. elliotii*, *Pinus roxburghii* também teve o seu desenvolvimento incrementado pela inoculação de isolado bacteriano

antagonista a fungos fitopatogênicos. A inoculação do isolado BN1 aumentou a altura da parte aérea, a massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e também aumentou a ramificação das raízes (SINGH et al., 2008). Outro isolado com potencial de controle de fungos fitopatogênicos em coníferas, *Pseudomonas aeruginosa*, também promoveu o crescimento de *P. roxburghii* ao ser inoculado em experimento em vaso (SINGH et al. 2010). Estirpes de *Streptomyces*, isoladas no intuito de controlar *Pythium aphanidermatum* em pepinos, ajudaram as plantas a crescer melhor e também a compensar danos aos tecidos causados pelo patógeno (EL-TARABILY et al., 2009). Isolados do gênero *Streptomyces* antagonistas a *Alternaria alternata* tiveram a produção de AIA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos como responsáveis pelo incremento que ocorreu no crescimento de *Azadirachta indica*.

A mortalidade de mudas foi avaliada no mesmo experimento. Também foi possível observar efeitos opostos provocados pela inoculação de actinobactérias nas duas espécies arbóreas avaliadas. Nas mudas de *Pinus* a mortalidade apresentada pelo tratamento controle foi de 29,67%, enquanto que as inoculadas com os isolados A43, Ac136 e Ac202 apresentaram porcentagens inferiores, com valores de 2,21%, 3,51% e 4,36%, respectivamente (Figura 24). Já as mudas de *Araucária* cujas sementes foram inoculadas com os isolados Ac136 e Ac202 apresentaram as maiores porcentagens de mortalidade, sendo de 66,8 e 70%, respectivamente, enquanto que as inoculadas com A43 e as não inoculadas apresentaram os menores valores, 16,6% e 9%, respectivamente.

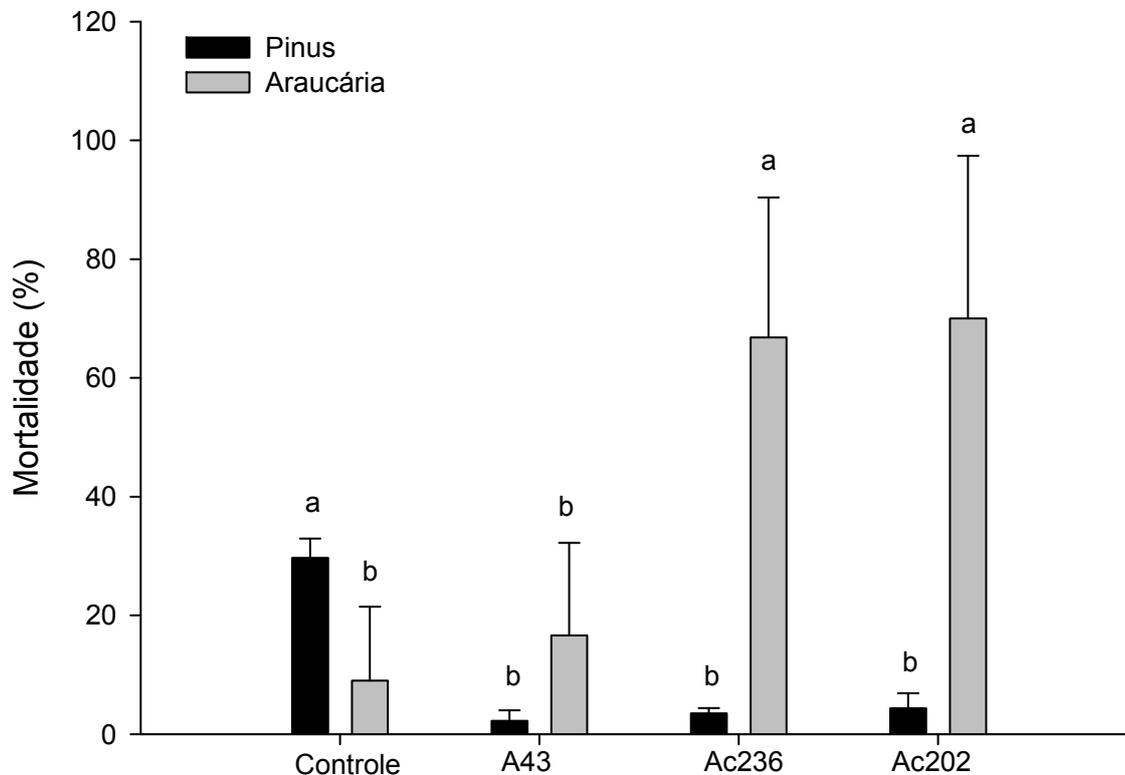


Figura 24 - Mortalidade de mudas de Pinus e Araucária tratadas com isolados de actinobactéria, avaliada aos 25 e 30 dias da sementeira, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P < 0.05$ )

O fato de os isolados promoverem a germinação e crescimento de Pinus enquanto causavam o efeito oposto à Araucária demonstra em parte a especificidade da ação dos isolados às diferentes espécies vegetais. Apesar de as estirpes bacterianas terem sido isoladas de raízes de Araucária, apresentaram efeito benéfico apenas em Pinus. Desta forma, estes isolados seriam bons agentes de biocontrole de doenças causadas por fungos apenas na produção de mudas de Pinus, pois, além de serem capazes de inibir diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos, como comprovado anteriormente em experimentos *in vitro*, e de terem diminuído a mortalidade das mudas de Pinus, são capazes de atuar na promoção de crescimento do mesmo, já que também aumentaram sua massa seca de raízes. Também foi verificado que um mesmo isolado pode apresentar diferentes atributos promotores de crescimento, neste caso, inibição de patógeno, estimulação de germinação e de produção de biomassa de planta. Com relação ao aumento na taxa de mortalidade de Araucária, não podemos afirmar com precisão o motivo para

tal fenômeno, no entanto uma teoria plausível é a de que, assim como o ocorrido no experimento de Lehr et al. (2007), os isolados actinobacterianos podem ter tido efeito sobre a capacidade da planta em se defender dos patógenos. As plantas possuem algo similar a um sistema imune, que se trata de diversos mecanismos que lhes permite se proteger do ataque de doenças e pragas, como a produção de substâncias oxidantes, resinas, alterações morfológicas, dentre outros. No entanto, microrganismos podem produzir substâncias que alteram esta resposta, suprimindo a defesa da planta contra organismos que eventualmente venham a colonizar seus tecidos. A supressão da defesa da planta e consequente infecção de seus tecidos pode ter sido a causa do aumento da mortalidade das mudas de Araucaria inoculadas com os isolados actinobacterianos.

#### **2.3.4 Antagonismo *in vivo***

Frente aos resultados encontrados em experimento *in vitro*, em que quatro patógenos foram inibidos de forma eficiente por dois dos treze isolados actinobacterianos, fez-se necessário a condução de um experimento *in vivo* que pudesse então confirmar de fato a eficiência destes isolados como agentes de biocontrole de doenças causadas por fungos em plantas. Foi então montado um experimento utilizando os dois isolados selecionados Ac136 e Ac202, assim como o controle positivo A43, além do tratamento controle.

Neste experimento, mesmo após 30 dias em casa de vegetação, nenhuma muda apresentou sintomas da doença ou mortalidade. Uma possível razão é que a patogenicidade de *F. oxysporum* declina após 3 a 4 semanas do isolamento (FARQUHAR; PETERSON, 1989) e o isolado utilizado neste experimento já havia sido isolado há muito mais tempo.

No entanto, as mudas do experimento de germinação que apresentaram mortalidade apresentaram sintomas semelhantes com os descritos em literatura como sendo resultado de morte por fusariose: passavam a apresentar estagnação do crescimento seguida por murcha das acículas e tombamento. Na figura 25 é possível ver uma das mudas do tratamento controle do experimento de germinação que apresentaram tombamento no decorrer do experimento.



Figura 25 - Muda de Pinus do tratamento controle apresentando sintomas de *Damping-off*. apodrecimento da raiz e base do caule, levando a planta ao tombamento e morte

Uma muda doente foi então levada para o laboratório e fragmentos da base de seu caule foram colocados em meio BDA com rosa bengala. Após alguns dias já era possível ver o micélio crescendo em torno do fragmento de caule. Um pedaço do micélio foi então passado para uma nova placa com meio BDA, e após uma semana foi possível observar que o fungo apresentava o crescimento semelhante a fungos do gênero *Fusarium*, com coloração vinácea inicialmente no centro e depois tingindo todo o meio (GRIGOLETTI JÚNIOR; PARIS; AUER, 2006).

Este fungo foi então colocado em cinco frascos contendo areia lavada estéril com 70% da capacidade de retenção de água, e foram semeadas duas sementes desinfestadas de *P. elliottii* em cada uma. Em outros cinco frascos foram também semeadas duas sementes por frasco, porém sem a inoculação do fungo. Após um mês, as plantas dos frascos inoculados com o fungo morreram e, em função da alta umidade presente no frasco hermeticamente fechado, foram cobertas inteiramente pelo micélio (Figura 26).



Figura 26 - *Damping-off* causado pelo fungo isolado das plantas tombadas em experimento de germinação e desenvolvimento inicial. À esquerda planta inoculada com o fungo e à direita planta não inoculada

Seguindo-se os postulados de Koch, o reisolamento do fungo por meio do plaqueamento de fragmentos das raízes doentes, em meio BDA, recuperou o isolado de *Fusarium* sp., comprovando a associação do patógeno com a doença. Ficou então demonstrado que as mortes causadas no experimento de germinação (Figura 24) foram causadas por fungo do gênero *Fusarium*, e os isolados actinobacterianos A43, Ac136 e Ac202 foram capazes de reduzir a mortalidade de 29% no controle para 2, 3 e 4% respectivamente. Gopalakrishnan et al. (2011) fizeram o isolamento de estirpes de actinobactéria que apresentaram eficiência no biocontrole de fusariose (*F. oxysporum*) tanto em experimento *in vitro* quanto *in vivo* em casa de vegetação e em campo, tendo grão-de-bico como planta hospedeira. O sucesso de seus experimentos demonstra a possibilidade de que estes agentes de biocontrole tenham eficiência em aplicação prática. No experimento conduzido por Hagn et al. (2008) a adubação de um solo condutivo com material de compostagem tornou o solo supressivo a *Pythium ultimum*. A análise do solo adubado e do solo não adubado mostrou uma alteração na comunidade bacteriana do solo, sendo que no solo adubado a população bacteriana se caracterizou por uma alta abundância de

bactérias do grupo actinobactéria, enquanto que no solo não adubado este grupo foi bem menos expressivo. Isso demonstra a importância das actinobactérias na supressão de doenças causadas por fungos.

Além da inibição da mortalidade das plântulas pelo fungo através da produção de substâncias antimicrobianas, reportada em diversos artigos, a inoculação das actinobactérias também pode ter causado a indução de resistência sistêmica na planta, como já relatado por Lehr et al. (2008) e Macagnam (2008a). Estes autores aplicaram isolados do gênero *Streptomyces* e estes induziram a produção de enzimas que são responsáveis pela proteção contra patógenos por *P. abies* e cacaueiro comum, além de terem também induzido alterações morfológicas nas raízes de *P. abies*. Os estudos de mecanismos de ação das actinobactérias têm focado principalmente a triagem *in vitro*, no entanto desta forma alguns mecanismos como a indução de resistência aos patógenos não podem ser detectadas (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

### **2.3.5 Veículos de multiplicação e manutenção para preparo de inoculante de actinobactérias**

Existem diversos estudos que tratam a respeito de veículos para inoculantes bacterianos, no entanto em sua maioria são voltados à produção de inoculantes à base de *Rhizobium* sp e *Bradyrhizobium* sp (ALBAREDA et al., 2008; ARORA et al., 2008; DAZA et al., 1999; STEPHENS; RASK, 2000). Também são encontrados, em menor número mas em um volume significativo, estudos avaliando veículos para inoculantes de RPCP principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (ARORA et al., 2008; MANJULA; PODILE, 2001; TRIVEDI; PANDEY; PALN, 2005). Por último temos as actinobactérias, com um número relativamente pequeno de estudos avaliando possíveis veículos para inoculantes, e em sua maioria os estudos abrangem veículos sólidos como a turfa e pó-de-serra.

Os veículos usados nos testes foram avaliados com relação à sua capacidade em manter o maior número de células viáveis dos isolados actinobacterianos selecionados, Ac136 e Ac202, além do isolado A43, pelo período de seis meses, que é um tempo de vida de prateleira excelente para inoculantes. Esta avaliação é importante, principalmente em se tratando de inoculantes líquidos, apesar de serem mais fáceis de manusear, possuem uma vida de prateleira menor,

além da necessidade de uma temperatura baixa de estocagem (STEPHENS; RASK, 2000).

O primeiro passo tomado foi a elaboração de uma curva de crescimento para cada isolado (Figura 27), para que fosse possível determinar o momento em que a cultura apresentaria o número de células viáveis desejado no inoculante ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

O isolado A43, *S. kasugaensis*, apresentou o crescimento com formação de grumos de hifas. Isto acabou impossibilitando uma quantificação fiel das células existentes no meio de cultura. Tampouco foi possível chegar ao número de UFC mL<sup>-1</sup> desejado, pois conforme o tempo passava, os grumos aumentavam, o que dificultava a diluição e quantificação. No entanto, após 28 horas de leitura, havia a formação de um precipitado de volume considerável formado por grumos de hifas. Este foi então considerado o suficiente para a elaboração do inoculante.

Foi então possível determinar o número de horas de incubação necessárias para ser obtida uma quantidade correspondente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, ideal para a confecção dos inoculantes (Tabela 7).

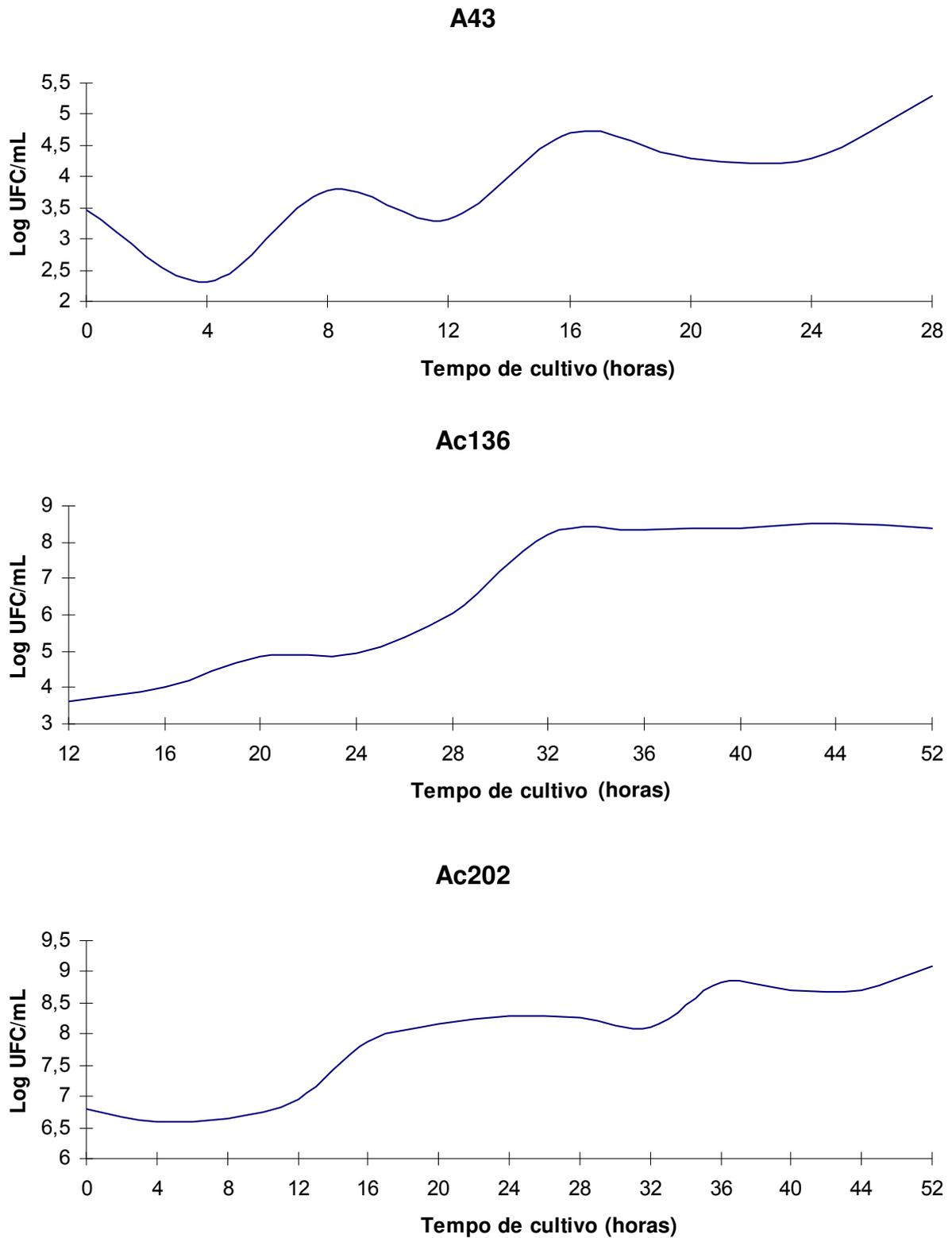


Figura 27 - Curva de crescimento dos isolados A43, Ac136 e Ac202, determinada por contagem de UFC

Tabela 7 - Tempo de incubação necessário para a obtenção de número de células viáveis correspondente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>

<b>Isolado</b>	<b>Número aproximado de células</b>	<b>Tempo de cultivo (horas)</b>
A43	$10^5$	28
Ac136	$10^8$	32
Ac202	$10^8$	24

A utilização de veículos líquidos facilita a produção e aplicação dos inoculantes (ALBAREDA et al., 2008). Além disso, a turfa, veículo mais comumente utilizado nos inoculantes, é uma fonte esgotável e muitas vezes de difícil obtenção, de matéria prima e sua utilização libera carbono estocado no solo. Desta forma foram escolhidos veículos líquidos para a elaboração dos inoculantes - água filtrada (Filt), água destilada (Dest), extrato de solo (ES), colágeno (Col), carboximetilcelulose (CMC) e glicerina (Gli). Estes foram então elaborados e avaliados quanto ao número de células viáveis em função do tempo de estocagem, sobrevivência de cada um dos isolados, desempenho de cada veículo na conservação do maior número de células viáveis, desempenho de cada veículo para cada isolado e por fim sobrevivência de cada isolado ao longo dos seis meses de estocagem.

O teste feito para avaliar o número de células viáveis nos inoculantes durante o tempo de estocagem mostrou que, de uma maneira geral, os isolados apresentaram uma queda no número de células viáveis com o passar do tempo, sendo esta mais acentuada nas primeiras 24 horas, período em que o número de Log UFC mL<sup>-1</sup> de inoculante caiu de 8 para 6,53. Nos meses seguintes a quantidade de células viáveis foi diminuindo até chegar a 5,11 Log UFC mL<sup>-1</sup> aos 6 meses de estocagem a 28°C (Figura 28). Apesar da queda no número de células, seria necessário experimento avaliando a quantidade mínima de células a serem aplicadas nas mudas para que seja definido se a quantidade é baixa ou não para o produto. Mas, levando-se em consideração que a quantidade de células por mL<sup>-1</sup> do inoculante é mais alta do que a densidade de cada indivíduo na rizosfera, pressupõe-se que seja uma quantidade considerável de propágulos para que consigam se estabelecer na rizosfera.

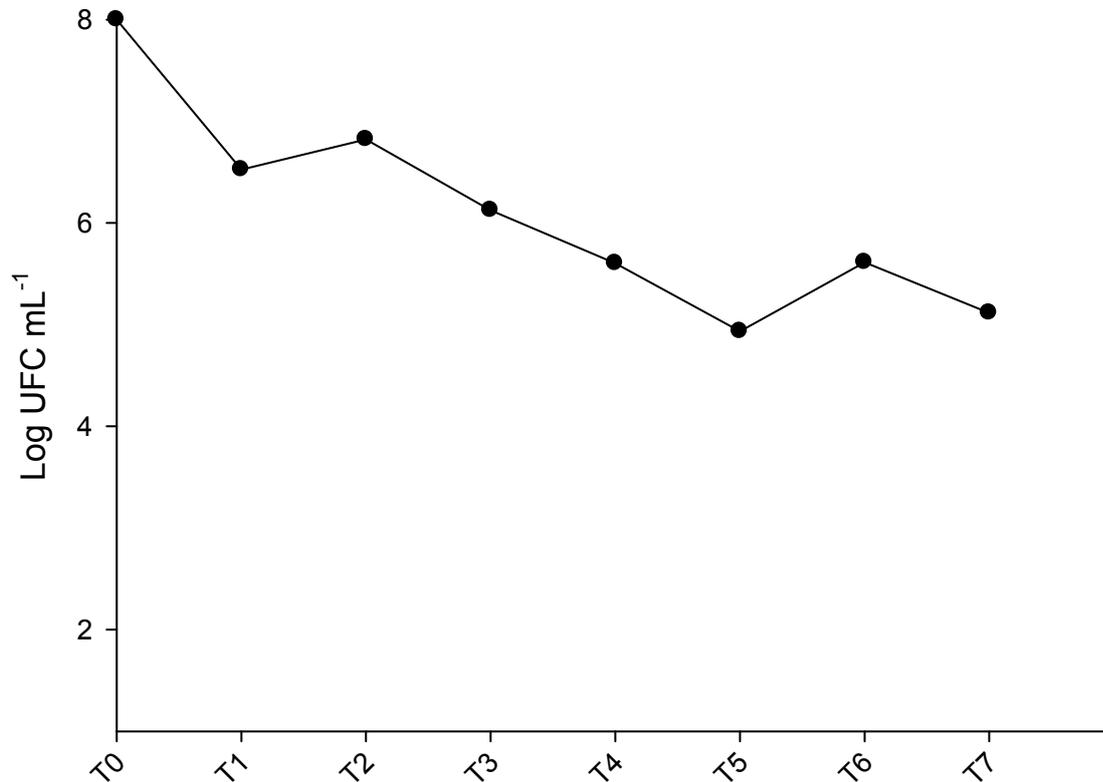


Figura 28 - Número viável de bactérias nos inoculantes em função do tempo de estocagem, onde T<sub>0</sub> é o número de células viáveis no momento da confecção dos inoculantes, T<sub>1</sub> = 24h após a confecção, T<sub>2</sub> = 1 mês, T<sub>3</sub> = 2 meses, T<sub>4</sub> = 3 meses, T<sub>5</sub> = 4 meses, T<sub>6</sub> = 5 meses e T<sub>7</sub> = 6 meses

Avaliando isoladamente a sobrevivência de cada um dos isolados à estocagem, o isolado Ac202 foi o que apresentou maior número de propágulos viáveis durante o período de estocagem avaliado, com uma média de 6,21 Log UFC mL<sup>-1</sup>, seguido de A43 com 5,72 Log UFC mL<sup>-1</sup> e por fim Ac136, com 5,52 Log UFC mL<sup>-1</sup> (Figura 29). Pelo número de células viáveis, o isolado Ac 202 seria o mais indicado para a confecção de inoculante, já que a sobrevivência do isolado no veículo é uma condição exigida na confecção de inoculante (STEPHENS; RASK, 2000).

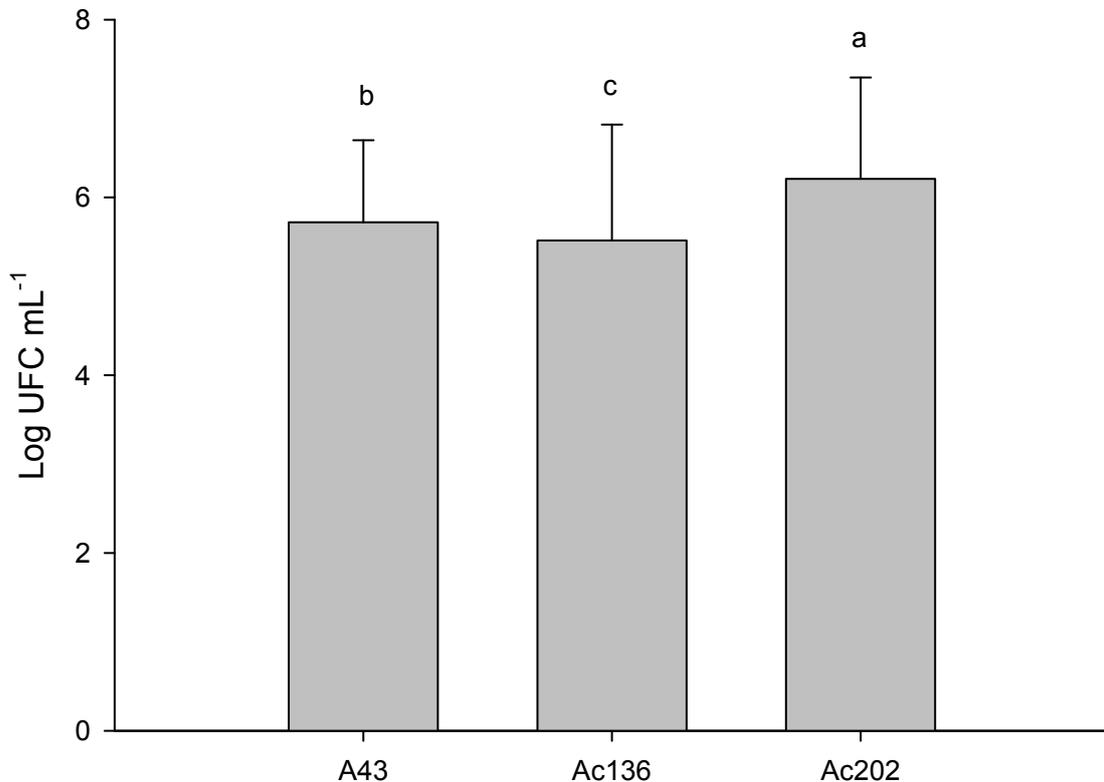


Figura 29 - Sobrevivência das bactérias em estocagem à temperatura ambiente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P < 0.05$ )

No que diz respeito à eficiência de cada veículo na conservação do maior número de células viáveis, o que obteve o melhor desempenho foi Gli, apresentando uma média de  $6,17 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ . Por outro lado, os veículos com os piores desempenhos foram Col e ES com  $5,57 \text{ Log UFC mL}^{-1}$  e  $5,77 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 30). Como um veículo deve manter as bactérias, sendo a fonte de nutrientes e conservando a sua umidade (ALBAREDA et al., 2008), Gli é candidato a um bom veículo, podendo servir como fonte de carbono. Além disso, a glicerina é um subproduto da produção de biodiesel, sendo então facilmente obtida a um preço acessível. Esta substância também não é tóxica, sendo inclusive fonte de nutriente em diversos meios de cultura para isolamento de actinobactérias (VASCONCELLOS et al., 2010; meio extrato de solo: ágar 25 g/L, glicerol 5 g/L, 1L extrato de solo 1:1, pH7; meio glicerina-caseína-ágar: glicerina 10 g, caseína hidrolisada 0,3 g, KNO<sub>3</sub> 2,0 g, NaCl 2,0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0 g, MgSO<sub>4</sub> 0,05 g, CaCO<sub>3</sub> 0,02 g, FeSO<sub>4</sub> 0,01 g, ágar 18 g, pH 7,2,; dentre outros), além de ser usado em indústrias como a alimentícia e farmacêutica (BIODIESELBR).

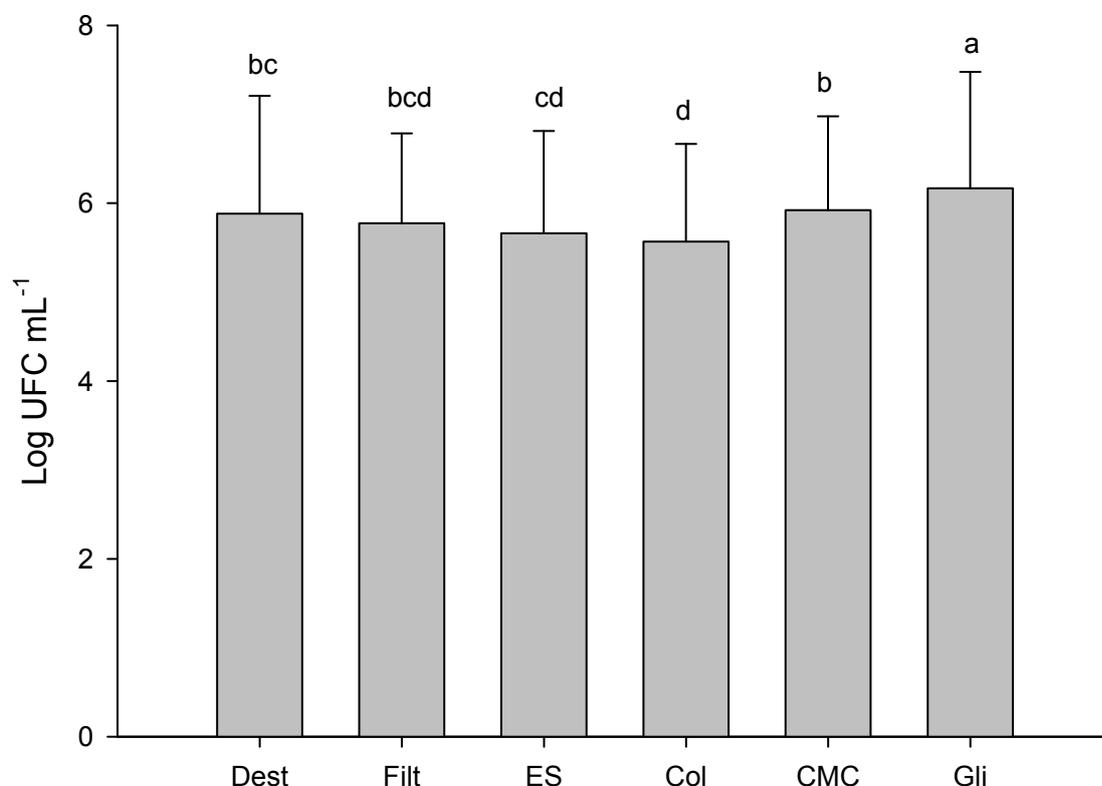


Figura 30 - Desempenho geral dos diferentes veículos para elaboração de inoculante considerando os diferentes isolados em conjunto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $P < 0.05$ )

Ao se analisar individualmente o desempenho de cada veículo para cada isolado foi possível observar que Gli foi capaz de conservar os maiores números de células viáveis ao ser usado como veículo nos três isolados avaliados (Tabela 8). O isolado A43 não teve o número de células viáveis alterado pelo veículo em que estavam suspensas, sendo assim qualquer um dos veículos poderia ser utilizado, sendo que a preferência sempre deverá ser para o que traga melhor custo-benefício. Já no caso do isolado Ac136 Gli se destacou com relação aos demais veículos, apresentando os maiores valores de UFC mL<sup>-1</sup> do inoculante, enquanto que Col e Filt apresentaram os piores resultados. Para o isolado Ac202 tanto Gli quanto CMC e Dest apresentaram os melhores desempenhos e Col, ES e Filt foram os de mais baixo desempenho. No caso de se escolher um veículo para os três isolados certamente Gli seria a escolha mais adequada, inclusive sendo capaz de conservar as células por mais tempo em caso de estocagem a baixas temperaturas, já que a

glicerina é um crioprotetor amplamente usado em laboratórios para conservação de estirpes bacterianas.

Tabela 8 - Número de células viáveis de cada isolado individualmente nos diferentes veículos

Veículo	Isolado		
	A43 (log UFC mL <sup>-1</sup> )	Ac136 (log UFC mL <sup>-1</sup> )	Ac202 (log UFC mL <sup>-1</sup> )
Dest	5,80 a	5,54 b	6,27 ab
Filt	5,88 a	5,27 bc	6,10 bc
ES	5,69 a	5,49 b	5,78 c
Col	5,54 a	5,00 c	6,08 bc
CMC	5,83 a	5,47 b	6,41 ab
Gli	5,59 a	6,33 a	6,61 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, P<0.05)

Com relação à sobrevivência de cada isolado ao longo do tempo de estocagem (Figura 31) pôde-se notar que tanto A43 quanto Ac202 apresentaram o número de células viáveis mais de 10 vezes maior que o número de células viáveis apresentado por Ac136 ao final dos seis meses. O isolado A43, apesar do declínio acentuado no número de células viáveis nas primeiras 24 horas após a elaboração do inoculante, teve uma boa recuperação, apresentando logo no primeiro mês um aumento de 15 vezes o número de células viáveis e então uma equiparação ao isolado Ac202 nos meses seguintes. As primeiras 24 horas mostraram-se as mais críticas na confecção do inoculante, pois é o momento em que há a diminuição mais rápida no número de células viáveis. Os isolados com melhor sobrevivência, A43 e Ac202 possuíam um número de propágulos viáveis de 5,46 e 5,48 Log UFC mL<sup>-1</sup> ao final do tempo do experimento. Mesmo assim, os números obtidos foram superiores aos obtidos por Sabaratnam e Traquair (2002), que, mesmo usando formulações em pó, consideradas mais duráveis quando comparadas às formulações líquidas (STEPHENS; RASK, 2000), apresentaram um número de propágulos viáveis de 7 X 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> (correspondente a 3,85 Log UFC g<sup>-1</sup>) em sua formulação mais durável.

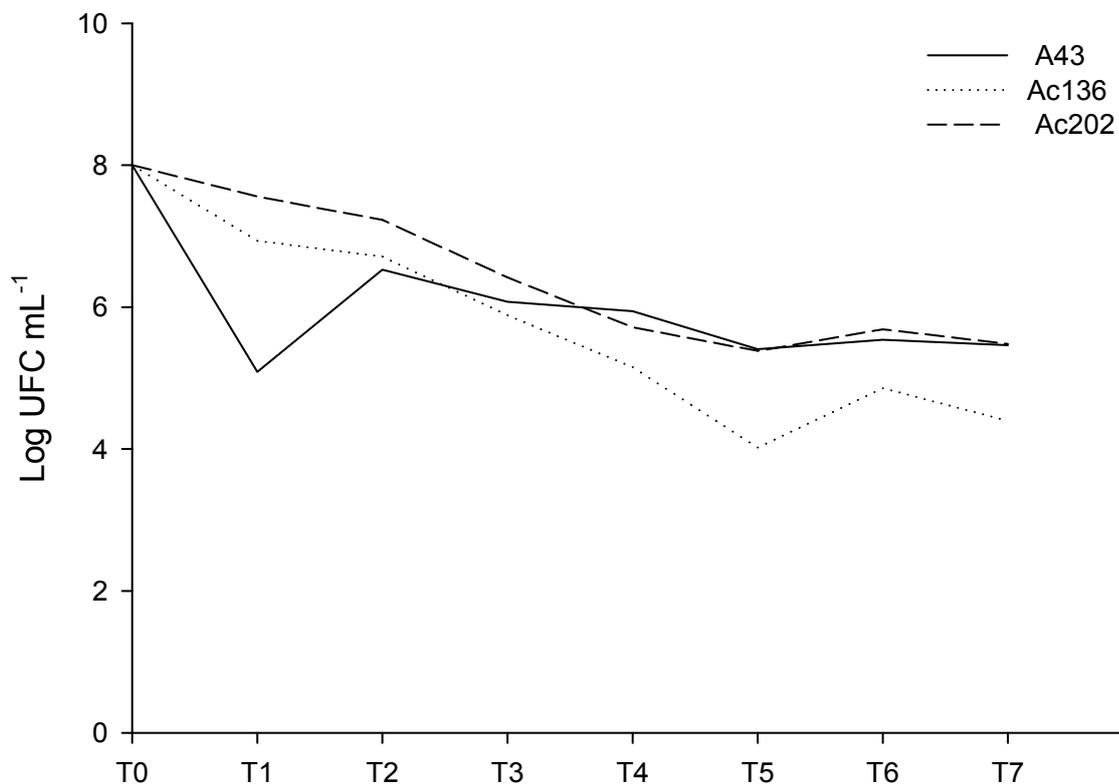


Figura 31 - Sobrevivência dos isolados durante o período de estocagem à temperatura ambiente

Tanto os isolados quanto os veículos apresentaram diferenças significativas na escolha de quais deverão ser utilizados na elaboração de inoculante. O veículo mais adequado mostrou-se ser a glicerina, por ter uma capacidade maior de manter os propágulos viáveis durante o tempo de prateleira estipulado, assim como Ac136 mostrou ter a menor capacidade de sobrevivência no mesmo período. Desta forma, este isolado, apesar de seu bom desempenho na inibição de patógenos tem a sobrevivência como fator limitante para seu uso como agente de biocontrole de fungos fitopatogênicos do solo.

### 2.3.6 Identificação molecular dos isolados

Com a metodologia utilizada para a extração de DNA foi possível obter o DNA genômico dos isolados. O método utilizado é próprio para a extração de DNA de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, estes dois últimos apresentando parede celular com alta resistência. O método de extração de DNA utilizado

mostrou-se eficiente, enquanto que o uso de kits de extração de DNA próprios para bactérias falharam. Isso pode ter ocorrido em função do crescimento em grumos que estas bactérias apresentam devido à formação de hifas, além de suas paredes celulares resistentes.

Os 13 isolados selecionados para serem identificados molecularmente tiveram um fragmento de ~1490 pb sequenciado. Os fragmentos foram analisados primeiramente através da função Classifier do RDPII. O RDPII é um banco de dados especializado no gene 16S rRNA e que apresenta controle de qualidade das sequências depositadas. Além disso, o alinhamento é feito baseando-se na estrutura secundária do RNA, o que confere maior confiabilidade na análise do que um alinhamento local das sequências de DNA. No entanto, a classificação fornecida é apenas até o nível de gênero.

Os isolados foram classificados hierarquicamente como representado na Tabela 9, sendo então pertencentes ao gênero *Streptomyces* sp, com exceção do isolado Ac8, pertencente ao gênero *Kitasatospora* sp..

Tabela 9 - Resultado da análise das sequências através do aplicativo “Classifier” do RDPII

Hierarquia taxonômica	Ac9 a Ac207	Score (%)	Ac8	Score (%)
Domínio	Bacteria	100	Bacteria	100
Filo	“Actinobacteria”	100	“Actinobacteria”	100
Classe	Actinobacteria	100	Actinobacteria	100
Subclasse	Actinobacteridae	100	Actinobacteridae	100
Ordem	Actinomycetales	100	Actinomycetales	100
Subordem	Streptomycineae	100	Streptomycineae	100
Família	Streptomycetaceae	100	Streptomycetaceae	100
Gênero	Streptomyces	100	Kitasatospora	63

A classe das actinobactérias é responsável pela produção de aproximadamente 500 tipos de antibióticos produzidos atualmente, e o gênero *Streptomyces* é o mais importante dentre os gêneros desta classe quando se trata de produção de antibióticos. Cerca de 50 % dos isolados pertencentes a este gênero são capazes de produzir algum tipo de antibiótico (MACAGNAM et al. 2006). Muitos destes antibióticos têm sido utilizados na medicina, mas diversos trabalhos têm sido realizados para aproveitar este potencial antimicrobiano no biocontrole de doenças

de plantas. Seguindo esta ideia, Fang et al. (2011) isolaram actinobactérias de solos chineses com atividade fungistática e, posteriormente, com o uso de ARDRA, agruparam os isolados em quatro diferentes famílias, dentre as quais a mais numerosa foi a Streptomycetaceae, tendo 164 isolados do gênero *Streptomyces* e um do gênero *Kitasatospora*. Este experimento é um dos que confirma a importância de actinobactérias ao gênero *Streptomyces* na supressão do crescimento de fungos no solo, e sua expressiva proporção com relação aos outros gêneros da classe actinobactéria. Os isolados de actinobactérias mais eficientes no controle da doença conhecida como vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipelis perniciosa*, também pertenciam ao gênero *Streptomyces*. No entanto o sequenciamento parcial do gene 16S não foi capaz de distinguir os isolados em nível de espécie. (MACAGNAM et al., 2006). Actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido também reportadas como eficientes na inibição de doenças causadas por fungos como *F. oxysporum* (GOPALAKRISHNAN et al., 2011; VASCONCELLOS e CARDOSO, 2009). A importância dos estreptomicetos chegou a levar a divisão das actinobactérias em dois grupos: estreptomicetos e não-estreptomicetos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006).

Já o gênero *Kitasatospora* foi descrito por Omura et al. (1982) e é também um gênero de interesse biotecnológico, sendo produtora de isoflavonóides (YOON et al., 2006), celulasas (ULRICH, KLIMKE, WIRTH, 2008), substâncias antifúngicas (HAESLER et al., 2008), inibidores de células cancerígenas (PETTIT et al., 2007), dentre outros. Haesler et al. (2008) isolaram de solo rizosférico de Faia-européia (*Fagus sylvatica*) estirpes do gênero *Kitasatospora* capazes de produzir ciclohexamida, molécula até então produzida apenas por isolados do gênero *Streptomyces*. Estes isolados de *Kitasatospora* apresentaram atividade antagônica ao fungo fitopatogênico *Phytophthora citrícola*. Vale a pena ressaltar que, apesar de existirem trabalhos explorando o potencial de bactérias deste gênero para o uso no biocontrole de patógenos do solo, estes são escassos. Somando-se isto ao fato de que o isolado Ac8, pertencente a este gênero, apresentou resultados que muitas vezes se equiparava ou mesmo superava o desempenho do isolado A43 (Figuras 13 a 15), que já teve sua eficiência comprovada por Vasconcellos e Cardoso 2009, e por experimento *in vivo* com Pinus (Figura 24), podemos dizer que o potencial dos microrganismos deste gênero é subexplorado no que se diz respeito a controle biológico de fungos fitopatogênicos.

Em seguida todas as sequências foram analisadas pelo aplicativo Blast em comparação ao GeneBank (Tabela 10)

Tabela 10 - Análise das sequências pelo aplicativo Blast do GeneBank

Isolado	Resultado	Ref. GeneBank	Score	Coverage	Identity
	<i>Kitasatospora kifunensis</i>	NR044810.1	2375	89%	100%
Ac8	<i>Kitasatospora mediocidica</i>	NR026069.1	2363	89%	100%
	<i>Kitasatospora azatica</i>	NR026068.1	2340	89%	100%
Ac9	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	AM921646.1	2577	100%	98%
Ac24	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2660	100%	99%
Ac33	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	AM921646.1	2579	100%	98%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2662	100%	99%
Ac105	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	NR041150.1	2651	100%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2625	100%	99%
Ac110	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	NR041150.1	2615	100%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2662	100%	99%
Ac136	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	NR041150.1	2651	100%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2656	99%	99%
Ac189	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	NR041150.1	2645	99%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2675	99%	99%
Ac192	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	NR041150.1	2663	99%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2660	100%	99%
Ac196	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2660	100%	99%
Ac200	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2599	100%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2599	100%	99%
Ac202	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	NR041150.1	2599	100%	99%
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2662	100%	99%
Ac207	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	AB024442.1	2662	100%	99%

De acordo com a análise feita pelo GeneBank, o isolado Ac8 apresentou maior similaridade com três espécies do gênero *Kitasatospora*, enquanto que os isolados Ac9 e Ac33 apresentaram maior similaridade com *Streptomyces drozdowiczii*. Todos os demais isolados (77% dos 13 avaliados) apresentaram similaridade com a espécie *Streptomyces kasugaensis*, no entanto Ac105, Ac110, Ac136, Ac189, Ac192 e Ac202 apresentaram também similaridade com *S. celluloflavus*. Os isolados que apresentaram similaridade com mais de um isolado necessitarão de mais dados, morfológicos, bioquímicos e moleculares, para que seja feita uma classificação adequada. *Kitasatospora kifunensis* foi descrita inicialmente

por Nakagaito et al. (1992) como *Streptomyces kifunensis*, e mais tarde foi transferida para o gênero *Kitasatospora* por Groth et al. (2003). A maioria dos trabalhos envolvendo esta espécie foca a produção de isoflavonas, substâncias de interesse médico e que também apresentam atividade antifúngica (YOON et al., 2006). *Kitasatospora azatica* foi descrita por Nakagaito et al. (1992b), sendo posteriormente transferida para o gênero *Kitasatospora*. No entanto são escassos os trabalhos envolvendo esta espécie, assim como trabalhos envolvendo *K. mediocidica*, descrita por Labeda (1988).

*Streptomyces drozdowiczii* foi primeiramente isolado da Mata Atlântica, em 2004, e descrito como isolado produtor de celulases por Semêdo et al. (2004). O isolado Ac9, que apresentou 98% de similaridade com esta espécie também apresentou atividade celulolítica, o que reforça a classificação deste isolado. Já o isolado Ac33 não apresentou esta característica, mesmo apresentando valor de similaridade idêntico. Poucos dados existem a respeito de *S. celluloflavus*, ao contrario de *S. kasugaensis*, que foi descrito em 1965 (UMEZAWA et al., 1965), e é produtor de um importante antibiótico, a *Kasugamicina*, que é amplamente utilizada em plantações de arroz no Japão para o controle do “Rice blast”, doença causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (TAGA et al., 1978). Esta substância também é capaz de controlar outros fungos, além de bactérias (TANAKA; YAMAGUCHI; UMEZAWA; 1966).

Dentre as técnicas existentes para identificação de actinobactérias, o sequenciamento do 16S está entre as mais utilizadas (CAO et al 2005; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; HAESLER et al., 2008; HOSTER; SCHMITZ; DANIEL, 2005; KHAMNA et al 2010; SALAMONI et al., 2010), principalmente por ser um gene presente em todas as bactérias, conservado e geneticamente estável (MACAGNAM et al., 2006), mas outras técnicas como análise morfológica, bioquímica e fisiológica também costumam ser aplicadas (SALAMONI et al., 2010). Dees et al. (2011) fizeram uma comparação entre duas metodologias para diferenciação de 14 estreptomicetos produtores de melanina e 14 não produtores deste pigmento, sequenciamento total do gene 16s e microarranjo de DNA. O sequenciamento do 16S identificou os 14 produtores de melanina como *S. turgidiscabies*, e os 14 não produtores como *S. scabeis*, enquanto que o microarranjo determinou que estes 14 não produtores de melanina não pertenciam à espécie designada pelo 16S. Correa (2008) afirma que o sequenciamento do 16S

não tem sido eficiente em determinar as relações filogenéticas de espécies pertencentes ao mesmo gênero. Considerando a classificação obtida no presente trabalho, faz-se necessária a utilização de diferentes técnicas além do sequenciamento do 16S, pois, apesar de se ter chegado em nível de gênero, muitos isolados permaneceram sem uma identificação segura em nível de espécie.



### 3 CONCLUSÕES

- Obtiveram-se isolados de actinobactérias provenientes de rizosfera de araucária que apresentam potencial no controle biológico de doenças causadas por fungos fitopatogênicos;
- Estes isolados produzem substâncias antimicrobianas, das quais algumas foram identificadas, mas diversas outras não foram avaliadas;
- Alguns isolados com potencial no biocontrole de fungos fitopatogênicos mostraram exercer efeito inibitório sobre micro-organismos benéficos da rizosfera em experimentos *in vitro*;
- Os efeitos dos isolados sobre as plantas dependem da espécie da planta em que são inoculados, podendo ser prejudicial para uma e benéfico para outra;
- Os isolados apresentam efeito inibitório de patógenos indígenas *in vivo*;
- Os isolados Ac136 e Ac202 foram capazes de aumentar a micorrização das raízes de milho
- O veículo mais eficiente para a elaboração de inoculante foi a glicerina, uma substância barata e não tóxica, capaz de manter o maior número, dentre os veículos testados, de propágulos vivos por 6 meses de estocagem;
- O isolado Ac202 foi o mais promissor dentre os isolados actinobacterianos obtidos neste trabalho, apresentando forte antagonismo contra os quatro patógenos testados, promovendo a germinação e desenvolvimento inicial de Pinus, e aumentando a sobrevivência de plântulas de Pinus contaminadas com fungos fitopatogênicos;
- Alguns isolados mostraram efeito prejudicial à germinação dos esporos de FMA *in vitro*, no entanto estimularam a micorrização das raízes em experimento *in vivo*.

Em resumo, as estirpes selecionadas neste trabalho possuem potencial como agentes de biocontrole a serem utilizadas em produção de mudas de *P. elliottii*, em casa de vegetação, embora tenham sido isoladas de *A. angustifolia*. No entanto ficou claro que, para que os antagonistas sejam transformados em inoculantes devem ser submetidos a testes que certifiquem que estes não sejam prejudiciais a outros microrganismos benéficos ou mesmo às plantas inoculadas.



## REFERÊNCIAS

- Anuário Estatístico da Abraf.** 2010. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2011.
- ALBAREDA, M. RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F.J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2771-2779. 2008.
- ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 12, n. 1, p. 39-45. 1991.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. London, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. in: MILO I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna, EMBRAPA – CNPMA, 1998. p. 351-367.
- ARORA, N.K.; KHARE, E.; NARAIAN, R.; MAHESHWARI, D.K. Sawdust as a superior carrier for production of multipurpose bioinoculant using plant growth promoting rhizobial and pseudomonad strains and their impact on productivity of *Trifolium repense*. **Current Science**, Bangalore, v. 95, n. 1, p. 90-94. 2008.
- AUER, C.G.; GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Armilariose em Pinus no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 5p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico).
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á.F. **Doenças em Pinus: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 28 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica).
- BEG, Q.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G.S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Ottawa, v. 24, p. 396-402. 2000.
- BELLEI, M.M., CARVALHO, E.M.S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, P.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 297-318.
- BIODISELBR. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>>. Acesso em: 23 set 2011.
- BORA, N.M.; WARD, A.C. The actinobacteria. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L.H. (Ed.). **Practical handbook of microbiology**. 2.ed. Boca Raton: CRC press, 2009. chap. 27, p.373-443.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, 2011. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/pdf/booklet/booklet.pdf> > Acesso em: 15-set. 2011

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de janeiro 1992, p.870-872 (Portaria IBAMA 06-N).

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Cultivo da *Araucaria angustifolia***: análise de viabilidade econômico-financeira. Agência de Florianópolis. Gerência de Planejamento. Florianópolis: BRDE, 2005. 53p. Disponível em: <http://www.brde.com.br/>. Acesso em: 12 Jan. 2009.

BREUNINGER, M.; EINIG, W.; MAGEL, E.; CARDOSO, E.; HAMPP, R. Mycorrhiza of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia* [Bert. O. Ktze.]). **Plant biology**, Malden, v. 2, p. 4–10. 2000.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 247, p.147-152, 2005.

CARDOSO E.J.B.N.; VASCONCELLOS, R.L.F.; RIBEIRO, C.M.; MIYAUCHI., M.Y.H. PGPR in Coniferous Trees. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. chap. 12 p. 345 – 369.

CARPENTER-BOGGS, L.; LOYNACHAN, T.E.; STAHL, P.D. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1445-1451, 1995.

CESAR FILHO, M. Araucária, a planta do futuro. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 218, p. 56-57, 2005.

CHEN, X.; ZHENG, Y.; SHEN, Y. Bioassay method for the quantitative determination of tautomycin in the fermentation broth with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, [s.l.], v. 16, p. 199-209, 2008.

CHEN, X.C.; KIHARA, T.; KUSAKABE, H.; MAGAE, J.; KOBAYASHI, Y.; FANG, R.P.; NI, Z.F.; SHEN, Y.C.; KO, K.; YAMAGUCHI, I. A new antibiotic, tautomycin. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.40, n. 6, p.907-909, 1987.

CHEN, X.H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; PIEL, J.; BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 140, p.27-37, 2009.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, (Database issue): D141-D145, 2009.

CORRÊA, E.B.; BETTIOL, W.; SUTTON, J.C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 275-281, 2010.

CORREA, M.F. **Evaluación de caracteres PGPR em actinomicetos e interacciones de estas rizobactérias com hongos formadores de micorrizas**. 2008. 261p. (Thesis Magister Sciences ) - Universidad de Granada, Granada, 2008.

CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. (Ed.). **Anticancer agents from natural products**. New York: CRC, 2005. 600p.

CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; OUSLEY, M.A., Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 3899-3905. 1993.

CUESTA, G.; GARCÍA-DE-LA-FUENTE,R.; ABAD, M.; FORNES, F. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. **Journal of Environmental Management**. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190787>>. Acesso em: 20 set 2011.

DAZA, A.; SANTAMARÍA, C.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M.; ORIVE, R.; TEMPRANO, F. Perlite as a carrier for bacterial inoculantes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 567-572. 2000.

DE BOER, W.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; LAFEBER, P.; JANS, J.D.; SPIT, B.E.; WOLDENDORP, J.W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 193-203, 1998.

DEES, M.W.; SOMERVUO, P.; LYSØE, E.; AITTAMAA, M.; VALKONEN, J.P.T. Species' identification and microarray-based comparative genome analysis of *Streptomyces* species isolated from potato scab lesions in Norway. **Molecular Plant Pathology** – *in press*

DHANASEKARAN, D.; AMBIKA, K.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Allelopathic effect of actinobacterial isolates against selected weeds. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03235408.2011.587988>>. Acesso em: 22 Set. 2011.

EARLE, C.J. **The gymnosperm database**. 2009. Disponível em: <<http://www.conifers.org/index.html>>. Acesso em: 12 Jan. 2009.

EL-TARABILI, K.A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 51, p. 257-266, 2003.

- EL-TARABILY, K.A. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84, p. 211-222, 2006.
- EL-TARABILY, K.A.; NASSAR, A.H.; HARDY G.E.St.J.; SIVASITHAMPARAM, K. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 13–26, 2009.
- EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1505–1520, 2006.
- EL-TARABILY, K.A.; SOLIMAN, M.H.; NASSAR, A.H.; AL-HASSANI, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNAD, F.; HARDY, G.E.ST.J. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, Malden, v. 49, p. 573-583, 2000.
- EL-TARABILY, K.A.; SYKES, M.L.; KURTBÖKE, L.D.; HARDY, G.E.St.J.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 618-624, 1996.
- FANG, L.Z.; KUN, X.C.; SONG, Z.C.; QIN, X.J.; QIU, H.Y.; QUN, D.C.; HE, M.M. Fungistatic intensity of agricultural soil against fungal agents and phylogenetic analysis on the actinobacteria involved. **Current Microbiology**, New York, v. 62, p. 1152-1159, 2011.
- FARQUHAR, M.L.; R.L. PETERSON. Pathogenesis in Fusarium root rot of primary roots of *Pinus resinosa* grown in test tubes. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 11, p. 221-228, 1989.
- FEIGL, F.; ANGER, V. Replacement of benzidine by cooperethylacetoacetate and tetrabase as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. **Analyst**, London, v. 91, p. 282-284, 1966.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FERREIRA, F.A. **Patologia florestal** - principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FRANCO-CORREA, M.; QUINTANA, A.; DUQUE, C.; SUAREZ, C. RODRÍGUEZ, M.X.; BAREA, J.M. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 209-217, 2010.

FREY-KLETT, P.; CHURINA, J.L.; PIERRAT, J.C.; GARBAYE, J. Dose effect in the dual inoculation of an ectomycorrhizal fungus and a mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1555-1562, 1999.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytologist**, Oxford, v. 176, p. 22–36, 2007.

GEELS, F.P.; SCHIPPERS, B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 108, p. 193-206, 1983.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

GOMES, R.C.; SEMÊDO, L.T.A.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R.R. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 146-150. 2000.

GOPALAKRISHNAN, G.; PANDE, S.; SHARMA, M.; HUMAYUN, P.; KIRAN, B.K.; SANDEEP, D.; VIDYA, M.S.; DEEPTHI, K.; RUPELA, O. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. **Crop Protection**, Oxford, v. 30, p. 1070-1078, 2011.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1990. 305 p.

GREGOR, A.K.; KLUBEK, B.; VARSA, E.C. Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 483–491, 2003.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; PARIS, C.; AUER, C.G. **Fusariose em Mudas de Pinus taeda**. Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 52, p.157-162, jan./jun,2006

GROTH, I.; SCHÜTZE, B.; BOETTCHER, T.; PULLEN, C.B.; RODRIGUEZ, C.; LEISTNER, E.; GOODFELLOW, M. *Kitasatospora putterlickiae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil, transfer of *Streptomyces kifunensis* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora kifunensis* comb. nov., and emended description of *Streptomyces aureofaciens* Duggar 1948. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Oxford, v. 53, p. 2033-2040, 2003.

HAESLER, F.; ALEXANDRA HAGN, A.; FROMMBERGER, M.; NORBERT HERTKORN, N.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M. In vitro antagonism of an actinobacterial *Kitasatospora* isolate against the plant pathogen *Phytophthora citricola* as elucidated with ultrahigh resolution mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 188-195, 2008.

HAESLER, F.; HAGN, A.; FROMMBERGER, M.; HERTKORN, N.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M. *In vitro* antagonism of an actinobacterial *Kitasatospora* isolate against the plant pathogen *Phytophthora citricola* as elucidated with ultrahigh resolution mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam v. 75, p. 188-195, 2008.

HAGN, A.; ENGEL, M.; KLEIKAMP, B.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M.; BRUNS, C. Microbial community shifts in *Pythium ultimum*-inoculated suppressive substrates. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 44, p. 481-490, 2008.

HAMADALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphste solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 12-19, 2008.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 32p. (California Agricultural Experiment Station Circular, 347).

HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 66, p. 434-442, 2005.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$ , with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 265-270. 1994.

INDERIATI, S.; FRANCO, C.M.M. Isolation and identification of endophytic actinomycetes and their antifungal activity. **Journal of Biotechnology Research in Tropical Region**, Oxford, v. 1, p. 1-6, 2008.

IPEF. **Produção de Mudas e Recomendações de Adubação no Viveiro para Pequenos Produtores**. 2008. Disponível em: <<http://www.ipef.br/silvicultura/producaomudas.asp>>. Acesso em: 02 out. 2010.

JIANG, Z.Q.; DENG, W.; LI, X. T.; AI, Z.L.; LI, L.T.; KUSAKABE, I. Characterization of a novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 36, n. 7, p. 923-929, 2005.

JIMÉNEZ-ESQUILÍN A.E.; ROANE, T.M. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 32, p. 378-381. 2005.

KASANA, R.C.; RICHA S.; HENA, D.; SOM, D.; ARVIND, G. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram  $\square$ s iodine. **Current microbiology**, New York, v. 57, p. 503-507, 2008.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.25, p. 649–655, 2009.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **Eurasian Journal of BioSciences**, Oxford, v. 4, p. 23-32, 2010.

KIM, M.S.; HANNA, J.W.; KLOPFENSTEIN, N.B. First report of an *Armillaria* root disease pathogen, *Armillaria gallica*, associated with several new hosts in Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p 1503, 2010.

KING, E.O.; EARD, M.K., RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Milwaukee, v. 44, p.301-307, 1954.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: Institute National de la Recherche, 1978. v. 2, p. 879-882.

KLOPFENSTEIN, N.B.; LUNDQUIST, J.E.; HANNA, J.W.; KIM, M.S.; MCDONALD, G.I. First report of *Armillaria sinapina*, a cause of Armillaria root disease, associated with a variety of forest tree hosts on sites with diverse climates in Alaska. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 1, p. 111, 2009.

KO, W.H.; WAMG, I.T.; ANN, P.J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 597-599, 2005.

LABEDA, D.P. *Kitasatosporia mediocidica* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Dordrecht, v. 38, p. 287-290, 1988.

LEHR, N.A.; SCHREY, S.D.; BAUER, R.; HAMPP, R.; TARKKA, M.T. Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. **New Phytologist**, Oxford, v. 174, n. 4, p. 892-903, 2007.

LEHR, N.A.; SCHREY, S.D.; HAMPP, R.; TARKKA, M.T. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. **New Phytologist**, Oxford, v. 117, n. 4, p. 965-976, 2008.

LIMA, A.L.; NASCIMENTO, R.P.; BON, E.P.S.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 272-277, 2005.

LOPER, J.E.; HENKELS, M.D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5357–5363, 1999.

LOQMAN, S.; BARKA, E.A.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 81-91, 2009.

MACAGNAM, D. **Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis perniciosa***. 2005. 113p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

MACAGNAM, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 34-37, 2008a.

MACAGNAM, D.; ROMEIRO, R.S.; POMELLA, A.W.V.; SOUZA, J.T. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) perniciosa* by phylloplane actinomycetes. **Biological Control**, San Diego, v. 47, p. 309-314, 2008b.

MACAGNAM, D.; ROMEIRO, R.S.; SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 122-132, 2006.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 7, p. 618-625, 2001.

MANN, J. Natural products as immunosuppressive agents. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, n. 4, p.417-430, 2001.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria – I: antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.153-163,1969.

MISK, A.; FRANCO, C. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. **BioControl**, Dordrecht, v.56, n.5, p. 811-822, 2011.

NAKAGAITO, Y.; SHIMAZU, A.; YOKOTA, A.; HASEGAWA, T. Proposal of *Streptomyces atroaurantiacus* sp. nov. and *Streptomyces kifunensis* sp. nov. and transferring *Kitasatosporia cystarginea* Kusakabe and Isono to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces cystargineus* comb. nov. **Journal of General and Applied Microbiology**,Tokio, v. 38, p. 627-633. 1992.

NAKAGAITO, Y.; YOKOTA, A.; HASEGAWA, T. Three new species of the genus *Streptomyces*: *Streptomyces cochleatus* sp. nov., *Streptomyces paracochleatus* sp. nov., and *Streptomyces azaticus* sp. nov. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 38, n. 2, p. 105-120, 1992b.

NATURE INDUSTRIES. Disponível em: < <http://www.actinovate.com>>. Acesso em: 23 set. 2011.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES V.M.C.; MARRIEL I.E.; GOMES E.A.; SCOTTI M.R.; CARNEIRO N.P.; GUIMARÃES C.T.; SCHAFFERT R.E.; SÁ N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in na oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2008.

OLIVEIRA, M.F.; SILVA, M.G.; SAND, S.T. van der. 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 Microbiology**, Amsterdam, v. 161, p. 565-572, 2010.

OLIVEIRA, O.S. Fungos causadores de danos em *Araucaria angustifolia* (bert) o. ktze. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 12, p. 23-27, 1981.

ŌMURA, S.; TAKAHASHI, Y; IWAI, Y.; TANAKA, H. *Kitasatosporia*, a new genus of the order *Actinomycetales*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 35, p. 1013-1019, 1982.

PERTOT I.; GOBBINA, D.; DE LUCA, F.; PRODORUTTI. D. Methods of assessing the incidence of Armillaria root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 1061-1070, 2008.

PETTIT, G.R.; TAN, T.; PETTIT, R.K.; SMITH, T.H.; FENG, S.; DOUBEK, D.L.; RICHERT, L.; HAMBLIN, J.; WEBER, C.; CHAPUIS, J.C. Antineoplastic Agents. 560. Isolation and structure of Kitastatin 1 from an Alaskan *Kitasatospora* sp.<sup>1</sup>. **Journal of Natural Products**, Washington , v. 70, n. 7, p. 1069-1072, 2007.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D.L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 12, p. 3057-3063, 1988.

RBMA. Disponível em:

<[http://www.rbma.org.br/anuario/mata\\_03\\_anosdedesttuicao\\_dest\\_araucaria.asp](http://www.rbma.org.br/anuario/mata_03_anosdedesttuicao_dest_araucaria.asp)>. Acesso em: 20 set. 2011.

RENEWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*, **Plant Pathology**, Malden, v. 40, p. 524-532, 1991.

RIBEIRO C.M.; CARDOSO E.J.B.N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*).

**Microbiol Res**. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501311000255>>. Acesso em 30 ago. 2011

RICHTER, D.L.; ZUELLIG, T.R.; BAGLEY, S.T.; BRUHN, J.N. Effects of red Pine (*Pinus resinosa* Ait.) mycorrhizoplane-associated actinomycetes on in vitro growth of ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 109-116, 1989.

RIEDLINGER, J.; SCHREY, S.D.; TARKKA, M.T.; HAMPP R.; KAPUR M.; FIEDLER H.P. Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain Ach 505. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3550-3557, 2006.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de plantas: procedimentos**. Viçosa, Editora UFV, 2007. 172 p.

SABARATNAM, S.; TRAQUAIR, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**, San Diego, v.23, n. 3, p. 245-253, 2002.

SACRAMENTO, D.R.; COELHO, R.R.R.; WIGG, M.D.; LINHARES, L.F.T.L.; SANTOS, M.G.M.; SEMÊDO, L.T.A.S.; SILVA, A.J.R. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 20, n. 3, p. 225-229, 2004.

SALAMONI, S.P.; MANN, M.B.; CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAND, S.T. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1847-1856, 2010.

SAUNDERS, A.P.; OTTO, R.H.; SYLVESTER, J.C. The production of vitamin B12 by various strains of actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 725-728, 1952.

SCHREY, S.D.; SALO, V.; RAUDASKOSKI, M.; HAMPP, R.; NEHLS, U.; TARKKA, M.T. Interaction with mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* sp. Ach 505 modifies organization of actin cytoskeleton in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* (Fly agaric). **Current Genetics**, New York, v. 52, p. 77-85, 2007.

SCHREY, S.D.; SCHELLHAMMER, M.; ECKE, M.; HAMPP, R.; TARKKA, M.T. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* Ach505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **New Phytologist**, Oxford, v. 168, p. 205-216, 2005.

SEMÊDO, L.T.A.S.; GOMES, R.C.; LINHARES, A.A.; DUARTE, G.F.; NASCIMENTO, R.P.; ROSADO, A.S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. SILVA, K.R.A.; ALVIANO, C.S.; MANFIO, G.P.; SOARES, R.M.A.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1323-1328, 2004.

SHIRLING, E.B., GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 16, p. 313-340, 1966.

SHRIVASTAVA, S.; SOUZA, S.F.D.; DESAI, P.D. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. **Current Science**, Bangalore, v. 94, p. 1595-1604, 2008.

SILVA, H.; BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A.; BOGNOLA, I.A. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 43, p. 61-74, 2001.

SINGH, N.; KUMAR, S.; BAJPAI, V.K.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K.; KANG, S.C. Biological control of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* PN1 and its plant growth promontory activity in chir-pine. **Crop Protection**, Oxford, v. 29, n.10, p. 1142-1147, 2010.

SINGH, N.; PANDEY, P.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.24, p. 1669-1679, 2008.

SOLDEVILLA, C. Marras de origen fúngico (damping off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas em invernadero. **Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas**, Madrid, v. 21, p. 87–109, 1995.

SOLÓRZANO FILHO, J.A. **Demografia, fenologia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão**. 2001. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAÚJO, J.M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardioopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 137-141, 2001.

STEPHENS, J.H.G.; RASK, H.M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 249-258, 2000.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **Methods in molecular biology: PCR protocols**. 2<sup>nd</sup> ed. Totowa: Humana Press, 2003. chap. 13 p. 53-54.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, n. 8, p. 492-497, 1988.

TAGA, M.; NAKAGAWA, H.; TSUDA, M.; UEYAMA, A. Ascospore analysis of kasugamycin resistance in the perfect stage of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 815-817, 1978.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TANAKA, N.; YAMAGUCHI, H.; UMEZAWA, H. Mechanism of Kasugamycin action on polypeptide synthesis. **The Journal of Biochemistry**, Oxford, v.60, n. 4, 1966.

TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L.; LUIZ A. MAFFIA; MOUNTEER, A.H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 118-123, 2007.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALN, L.S. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 21, p. 941-945, 2005.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 21-32, 2008.

ULRICH, A.; KLIMKE, G.; WIRTH, S. Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 512-522, 2008.

UMEZAWA, H.; OKAMI, Y.; HASHIMOTO, T.; SUHARA, Y.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T. A new antibiotic, kasungmycin. **Journal of Antibiotics**, Tokio, v. 18, p. 101-103, 1965.

VASCONCELLOS R.L.F. **Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial biotecnológico**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

VASCONCELLOS R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizospheric *Streptomyces* as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. **BioControl**, Dordrecht, v. 54, p. 807–816, 2009.

VASCONCELLOS, R.L.F.; SILVA, M.C.P.; RIBEIRO, C.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth-promoting actinobacteria from *A. angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.6, p.743-746, 2010.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHATER, K.F.; SINDEREN, van.D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 3, p.495-548, 2007.

VERDERA. Disponível em: <<http://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&sl=fi&tl=pt&u=http%3A%2F%2Fwww.verdera.fi%2F>>. Acesso em: 16 set. 2011.

WELLER, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soil borne pathogens: Looking back over 30 years. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 250-256, 2007.

WOOD, P.J. Specify in the interactions of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 85, p. 271-287. 1980.

YOON, T.M.; KIM, J.W.; KIM, J.G.; KIM, J.G.; SUH, J.W. Talosins A and B: New Isoflavonol glycosides with potent antifungal activity from *Kitasatospora kifunensis* MJM341. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 10, p. 633-639, 2006.

ZANDAVALLI, R.B.; DILLENBURG, L.R.; SOUZA, P.V.D. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 245-255, 2004.