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

**Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial
biotecnológico**

Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos
Biólogo

**Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial
biotecnológico**

Orientadora: Prof.^a Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Vasconcellos, Rafael Leandro de Figueiredo
Actinobactérias da rizosfera de *Araucária angustifolia* com potencial biotecnológico /
Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos. - - Piracicaba, 2008.
73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Actinomycetales 2. Controle Biológico 3. Fungos fitopatogênicos 4. Fungos micorrízicos
5. 5. Pinheiro 6. Rizosfera I. Título

CDD 589.92
V331a

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

Aos meus queridos pais Carlos Alberto e Vaneza, irmãos Alessandra, Carlos Henrique e Cristiane e à minha amada esposa Livia pela compreensão, carinho, amor e incentivo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me presentear com o dom da vida e por ter colocado em meu caminho pessoas exemplares a admirar e a seguir, tornado a jornada mais fácil e prazerosa.

A todos os meus familiares pai, mãe, irmãos agradeço pela preocupação constante e pelas dicas insubstituíveis. A minha querida esposa pelo amor, pela atenção e paciência nos momentos mais árduos deste tortuoso caminho. A minha orientadora Elke Cardoso pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, pelas conversas e pela paciência com seu discípulo. Ao Doutor Celso Auer pelas ajudas em metodologias e pela doação dos fungos utilizados neste estudo. A todos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Denise, Fernando, Mylenne, Rafael Valadares, Alessandra, André, Simone, Henrique, Daniel, Pillar, Fabiana, Sandra, Carlos, Priscila e Júlia agradeço pela amizade, ajudas, dicas, críticas e sugestões. Agradeço também, aos órgãos de fomento CAPES E FAPESP pela ajuda financeira. E a todos aqueles, que em meu caminho passaram para fazer o bem ou mal agradeço, pois sem vocês a vida realmente não seria desafiadora e sim apática e sem graça. Muito obrigado a todos.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Actinobactérias	12
2.1.1 Aspectos Morfológicos, Fisiológicos e Sistemáticos das Actinobactérias	12
2.1.2 Histórico da utilização das actinobactérias como agentes de biocontrole de doenças de plantas	13
2.1.2.1 Interação Planta e Microrganismos na Rizosfera	13
2.1.2.2 O biocontrole de doenças de plantas por actinobactérias	14
2.2 <i>Araucaria angustifolia</i>	17
2.3 <i>Pinus taeda</i>	19
2.4 Doenças Fúngicas em <i>Pinus spp.</i> e <i>Araucaria angustifolia</i>	20
3 Material e métodos	22
3.1 Isolamento dos microrganismos	22
3.1.1 Identificação, manutenção e cultivo dos isolados de actinobactérias	23
3.1.2 Análise fisiológica e morfológica dos principais isolados	23
3.2 Manutenção e Cultivo dos Fungos <i>Fusarium spp.</i>	24
3.2.2 Teste de antagonismo aos fungos patogênicos <i>Fusarium sp</i> isolados de sementes de milho e de mudas de <i>Pinus taeda</i>	25
3.3 Manutenção e Cultivo do fungo <i>Armillaria sp.</i>	26
3.3.1 Teste de antagonismo ao fungo patogênico <i>Armillaria sp.</i>	26
3.3.2 Inibição <i>Armillaria sp.</i> em placa de petri	27
3.4 Identificação molecular dos principais isolados	27
3.4.1 Extração do DNA	27
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	28
3.4.3 Purificação dos produtos de PCR	29
3.4.4 Quantificação dos produtos de PCR	29
3.4.5 Seqüenciamento	29
3.4.6 Análise das seqüências	30
3.5 Efeito das actinobacterias sobre o crescimento de <i>Pinus taeda</i>	30
3.6 Efeito dos metabólitos sobre a germinação de esporos de <i>Gigaspora rosea</i>	32
4 Resultados e Discussão	33
4.1 Identificação, manutenção e cultivo dos isolados de actinobactérias	33

4.2 Análise fisiológica e morfológica dos principais isolados	35
4.3 Inibição de <i>Fusarium</i> spp.	40
4.4 Teste de antagonismo ao fungo patogênico <i>Armillaria</i> sp.	44
4.4.1 Inibição <i>Armillaria</i> sp. em placa de petri	46
4.5 Identificação molecular dos principais isolados	49
4.6 Efeito dos principais isolados sobre o crescimento de <i>Pinus taeda</i> em casa de vegetação.....	53
4.7 Efeito dos metabólitos sobre a germinação de esporos de <i>Gigaspora rosea</i>	58
5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial biotecnológico

A espécie *Araucaria angustifolia*, pertencente ao fragilizado Bioma Mata Atlântica, foi, durante décadas, uma das maiores fontes de madeira no Brasil. Essa espécie é de grande importância sendo fonte de alimento e matéria prima para a produção de móveis, polpa de celulose e vernizes. Devido à grande importância econômica e ambiental da araucária, estudos voltados à preservação e manejo da espécie se tornaram necessários. Este trabalho teve como finalidade isolar actinobactérias, presentes na rizosfera de araucária, antagônicos aos fungos *Fusarium sp.* e *Armillaria sp.* Estes patógenos são responsáveis por danos às raízes e sementes causando podridão e perda de mudas. Além disso, verificou-se também o efeito das actinobactérias sobre a germinação de esporos de *Gigaspora rosea*. Após a seleção dos melhores inibidores, identificação morfológica e sequenciamento do gene 16S rRNA, verificou-se o efeito destes sobre o crescimento de *Pinus taeda*, na presença e na ausência do fungo ectomicorrízico (*Suillus brevipes*). Os isolados ainda foram avaliados quanto à produção de enzimas como quitinase, lipase, fosfatase, celulase, amilase e protease. Para o isolamento foram coletadas raízes de 15 árvores adultas presentes na mata nativa. Dez gramas de raízes frescas com resíduos de solo aderidos firmemente foram agitados por 30 minutos em solução salina 0,85 % padronizando como solo rizosférico aquele que soltou das raízes. Neste isolamento foram utilizadas duas metodologias: por plaqueamento e por separação física pela utilização de membrana de 0,45 micrômetros. Foram obtidos 33 possíveis actinobactérias. Os isolados foram testados quanto à capacidade antagônica pelo método de contato direto, inoculando-os a 30 mm de distância do fungo fitopatogênico *Fusarium sp.*, em placas de *petri* contendo meio ISP2. Os halos de inibição foram medidos após 3, 5, 7 e 10 dias. De todos os isolados testados 6 mantiveram a inibição por 10 dias com manutenção de halos de inibição de até 4 mm contra um *Fusarium sp.* isolado de sementes de milho e 2 foram eficientes na inibição de *Fusarium sp.*, patógeno de *Pinus sp.* A análise de inibição do fungo *Armillaria sp.*, foi feito em meio líquido medindo o crescimento em mg/dia após 30 dias na presença de extratos de actinobactérias e também pela contagem de rizomorfos em placa de *petri* após 20 dias de incubação em contato direto com as actinobactérias. Verificou-se que de 28 isolados testados 24 foram capazes de inibir a produção de rizomorfos, destacando-se o isolado A43 que foi capaz de inibir ambos os fungos, *Fusarium* e *Armillaria*. Os esporos de *Gigaspora rosea* tiveram a taxa de germinação avaliada na presença de actinobactérias a partir da técnica de dupla camada. Todos os seis isolados testados foram capazes de estimular a germinação dos esporos desse fungo micorrízico. Nenhum dos seis isolados (A43, A43b, PNA, A64, A75 e A93) foi capaz de produzir fosfatases e lipases. Porém os isolados A93, A75, A64 e PNA produziram protease, quitinase e amilase. Em casa de vegetação, foi testado o efeito de seis isolados, na presença e não ausência de ectomicorriza (*Suillus brevipes*), sobre plântulas de *Pinus taeda*. Analisou-se o diâmetro, a altura, a massa seca da raiz e da parte aérea e também o fósforo da parte aérea. Destaca-se o isolado A43 que, quando na ausência de ectomicorriza, estimulou o desenvolvimento da planta em relação ao controle

também sem ectomicorriza, provocando aumento de 100 % para massa seca da parte aérea e da raiz. Os resultados encontrados neste trabalho poderão levar ao desenvolvimento de novas tecnologias, visando à identificação de novos metabólitos e novas técnicas de manejo, voltados ao controle de doenças de plantas, especialmente as espécies arbóreas.

Palavras-chave: Actinobactérias, *Streptomyces*, Fungo micorrízico, *Gigaspora rosea*, Antagonismo, *Araucaria angustifolia*, *Fusarium* sp., *Armillaria* sp.

ABSTRACT

Rhizosphere Actinobacteria from *Araucaria angustifolia* with biotechnological potential

The tree *Araucaria angustifolia*, belonging to the endangered Atlantic Forest biome, for many decades was the source of Brazilian wood. This species is also very important in providing food and feed, as well as raw material for joinery, cellulose pulp and varnish. Due to the economic and environmental importance of *A. angustifolia*, research projects involving the preservation and management of this species are becoming more urgent and necessary. The aim of this work was to isolate *Araucaria* rhizosphere actinobacteria with antagonistic effects against the plant pathogens *Fusarium* sp. and *Armillaria* sp. These fungi cause root rot and seed damage, with the consequent loss of seedlings. Moreover, the effect of these actinobacteria on *Gigaspora rosea* spore germination was studied. After the selection of the best pathogen inhibitors, we also tested the effect of these microorganisms on *Pinus taeda* growth, in the presence or absence of the ectomycorrhizal fungus *Suillus brevipes*. The production of protease, chitinase, lipase, phosphatase, cellulase and amylase of these bacteria in culture media was also investigated. For the isolation of rhizosphere bacteria, we collected roots of 15 adult trees in a native forest. Ten grams of fresh roots with soil residues adhered to the surface were shaken in 0,85 % salt solution for 30 minutes. Two techniques were used, the dilution plate method and the coverage of the medium, utilizing a 0,45 µm membrane to separate these filamentous bacteria. About 33 actinobacteria were isolated. After isolation the actinobacteria were tested against the plant pathogenic fungi *Fusarium* spp., utilizing dual culture techniques and ISP2 medium. The inhibition halo was measured after 3, 5, 7 and 10 days. Six of our isolates maintained an inhibition zone measuring at least 4 mm against *Fusarium* sp. isolated from corn seed and 2 mm against the *Fusarium*, which causes root rot of Pine trees. For the inhibition test of *Armillaria*, in liquid medium with the addition of culture extracts of actinobacteria, the growth in mg/day was measured after thirty days growth, and the number of rizomorphs produced in culture dishes after twenty days in dual culture with the actinobacteria was counted. Six bacteria proved to be antagonistic (A43, A43b, A64, PNA, A93 e A75), and only one had no effect. Possibly the elevation of the pH value played also a role in this situation. About 24 of 28 isolates inhibited the rizomorph production, especially the isolate A43 that showed a double antagonism against *Fusarium* and *Armillaria*. The dual layer test was used to investigate the reaction of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* spore germination to the presence of actinobacteria. All the six actinobacteria stimulated the germination, but the germ tube did not grow straight forward as in the control. This result may indicate a negative effect against this arbuscular mycorrhizal fungus. None of the six isolates tested (A43, A43b, PNA, A64, A75 and A93) produced phosphatases and lipases, but A93, A75, A64 and PNA produced protease, amylase and chitinase. Isolates A43 and A43b did not produce any of the enzymes tested. This fact suggests that there is production of an antibiotic acting against the pathogenic fungi. *Pinus taeda* seedlings were grown under green-house conditions. After three months the stem diameter, shoot height, root and shoot dry weight and shoot phosphorus content were evaluated. Plants with ectomycorrhiza presented a significant growth promotion in comparison with the non-mycorrhizal ones. Among the actinobacteria in the absence of mycorrhiza only the isolate A43 produced a 100% growth enhancement in comparison with the control plant without ectomycorrhiza. The results presented in this dissertation could lead to the development of new technologies and new management techniques, with regard to the control of plant diseases, especially in tree species.

Keywords: Actinobacterias, *Streptomyces*, Mycorrhiza fungi, *Gigaspora rosea*, Antagonic effect, *Araucaria angustifolia*, *Fusarium* sp., *Armillaria* sp.

1 INTRODUÇÃO

“Quanto mais a Ciência progredir,
mais claramente enxergaremos
os Milagres.”

As actinobactérias são microrganismos filamentosos, que se propagam por formação de esporos e colonizam o solo por meio de hifas. São importantes para a comunidade da rizosfera, pois influenciam o desenvolvimento das plantas e protegem as raízes contra patógenos. Essas características têm resultado em vários estudos sobre o controle biológico e produção de antimicrobianos. Dos antimicrobianos conhecidos, 70% são de actinomicetos e desses, 75% são usados na medicina e 60% são usados na agricultura (MIYADOH, 1993; TANAKA; MURA, 1993).

Estudos desenvolvidos por Maier et al. (2004) demonstraram a eficiência de substâncias produzidas por actinobactérias sobre o crescimento de fungos micorrízicos, favorecendo-os, e sobre o crescimento de fungos patogênicos de raiz, prejudicando-os. Essas pesquisas sugerem a possibilidade da utilização de microrganismos para aprimorar o plantio agrícola, diminuindo os insumos decorrentes de pesticidas e tratamento do solo.

Dentre as utilidades das actinobactérias na agricultura, recomenda-se a sua utilização na recuperação de ecossistemas degradados como, por exemplo, a floresta de araucária ou Floresta Ombrófila Mista, cuja espécie arbórea predominante (*Araucaria angustifolia*) é a mais explorada. O estudo foi conduzido no Parque Estadual de Campos do Jordão, onde ainda existe um raro fragmento de Mata de Araucária nativa.

A vegetação tem papel essencial na manutenção da comunidade microbiana do solo na rizosfera, região do solo onde as raízes têm efeito direto sobre os microrganismos através da liberação de exsudatos. Esses exsudatos alteram o ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos. Os microrganismos do solo, por sua vez, são importantes na manutenção da fertilidade do solo, pois estão envolvidos na formação e na remoção de toxinas, produção de fitormônios, participação nos ciclos biogeoquímicos, entre outros (CARDOSO; FREITAS, 1992).

Desse modo, é de suma importância estudar os microrganismos do solo da Mata Atlântica como forma de buscar alternativas para a recuperação dessas florestas, para se ter formas de

buscar a recuperação dessas florestas, através do conhecimento e funcionamento da microbiota e sua relação com a vegetação. É imprescindível o isolamento e a caracterização das actinobactérias da floresta de araucária, além de buscar conhecer o efeito desses microrganismos sobre fungos micorrízicos e patogênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Actinobactérias

2.1.1 Aspectos Morfológicos, Fisiológicos e Sistemáticos das Actinobactérias

Actinobactérias são microrganismos gram-positivos, com alto conteúdo de G+C (Guanina + Citosina) em seu DNA. Atualmente as actinobactérias se encontram agrupadas filogeneticamente a partir do seqüenciamento do rRNA 16S na classe Actinobacteria dividida em cinco subclasses (Acidimicrobiae, Rubrobacteridae, Corynebacteridae, Sphaerobacteridae e Actinobacteridae) (STACKEBRANDT; RAINEYF; WARD-RAINEY, 1997). Possuem crescimento vegetativo na forma de micélio com hifas ramificadas de 1 µm de diâmetro. Geralmente formam colônias pequenas e bem aderidas ao substrato. Possuem esporos de disseminação, os quais podem ser encontrados na parte aérea do micélio ou nas hifas encontradas no substrato, ou em ambos estes locais. Podem ainda se agrupar em conídios com diferentes formas ou em esporângios ou ainda apresentar mobilidade em algumas espécies (HOLT et al., 1994).

A parede celular pode ser formada pelos isômeros L- ou meso- do ácido diaminopimélico (diaminopimelic acid), podendo existir, também, ácidos diamino como: lisina, ornitina e ácido diaminobutírico (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967)

A grande maioria das espécies apresenta as seguintes características: quimiorganotróficas, aeróbias, mesófilas, e crescem geralmente em pH próximo à neutralidade (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). No entanto, existem actinobactérias termofílicas (ALBRECHT, 2000), acidófilas (ZAKALYUKINA et al., 2002) e alcalifílicas (SELYAN et al., 2005).

As actinobactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente encontradas no solo, atuando na reciclagem de material orgânico como lignocelulose

(CRAWFORD, 1978). Existem, inclusive, vários estudos a respeito desse grupo de microrganismos em diferentes locais, como em pasto (LEE; HWANG, 2002), em areia de praia (SUZUKI, K; NAGAI ; SUZUKI, Y 1994), no subsolo (GROTH et al., 1999), em desertos (NOROVSUREN et al., 2007), nas geleiras da Antártica (PRISCU et al., 1999) e também em ambientes marinhos (JENSEN et al., 2005).

Além da sua ubiquidade e de sua importância na ciclagem de nutrientes, são conhecidos pela vasta produção de substâncias de alto potencial biotecnológico como: vitaminas do complexo B (SAUNDERS; OTTO; SYLVESTER, 1952), enzimas como xilanases (JIANG et al., 2005), lipases (SZTAJER; MALISZEWSKA; WIECZOREK, 1988), pectinases (BEG et al., 2000), amilases (STAMFORD et al., 2001), quitinases (GOMES et al., 2000), peroxidases (RAMACHANDRA; CRAWFORD; HERTEL, 1988) e possíveis fosfatases (HAMDALI et al., 2008) e ainda, agentes antitumorais (CRAGG; KINGSTON; NEWMAN 2005), antibióticos (BERDY, 2005) e agentes imunossupressivos (MANN, 2001).

2.1.2 Histórico da utilização das actinobactérias como agentes de biocontrole de doenças de plantas

2.1.2.1 Interação Planta e Microrganismos na Rizosfera

A rizosfera é a região sob influência das raízes que abriga grande diversidade de microrganismos do solo (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001) é fundamental para a manutenção da fertilidade do solo, uma vez que a comunidade microbiana está envolvida na sua formação, remoção de toxinas, produção de fitormônios, participação nos ciclos biogeoquímicos entre outros (CARDOSO; FREITAS, 1992). É também considerado um fator importante na sustentabilidade de ecossistemas, cuja redução ou eventual extinção de espécies pode comprometer as funções do solo, sua resiliência e produtividade (GILLER et al., 1997).

Para a formação dessa interação entre planta e microrganismo na rizosfera, a raiz das plantas possui um papel considerável. Além de ser um órgão que garante a absorção de água e nutrientes, também libera para o solo, exsudatos compostos principalmente por carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, fatores de crescimento, substâncias alelopáticas, entre outras. (BERTIN; YANG; WESTON, 2003; FAN et al., 2001; NEUMANN; RÖMHELD, 2000). Estas substâncias

presentes na rizosfera possuem grande diversidade e varia sua composição de acordo com a espécie vegetal, tipo de solo e fatores ambientais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Sobretudo, estes exsudatos influenciam o crescimento das populações de fungos e bactérias pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos do solo (BOWEN; ROVIRA, 1999 apud MAFIA et al., 2007).

Neste ecossistema predominam bactérias de vida livre e associativas (SCHIPPERS; BAKKER A. W.; BAKKER, A. H. M., 1987) que afetam a fertilidade do solo e podem ser benéficas, neutras ou deletérias para os hospedeiros.

Dessa forma, esses microrganismos podem estimular a exsudação e ainda, modificar a composição química e biológica da rizosfera (BAIS et al., 2006; KLEIN et al., 1988). São também responsáveis pela mineralização da matéria orgânica, solubilização de minerais, fixação de nitrogênio, produção de vitaminas, produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas e produção de antibióticos. Sendo assim, os microrganismos associados às plantas podem influenciar a fertilidade do solo e a saúde da planta (BAREA et al., 2005; MORGAN; BENDING; WHITE, 2005).

Além disso, fungos podem formar simbioses com as plantas através de associações micorrízicas. Esta interação, além de garantir suprimento de carboidratos e lipídeos aos fungos, favorece a absorção de nutrientes pelas plantas (BAGO et al., 2003).

2.1.2.2 O biocontrole de doenças de plantas por actinobactérias

As actinobactérias são encontradas em grande quantidade no solo, sendo responsáveis por 12 a 20 % da biomassa microbiana da rizosfera (POLYANSKAYA et al., 2003; SHIROKIKH et al., 2004). Esses microrganismos exercem papéis importantes neste ecossistema, verificando-se a formação de nódulos de fixação de nitrogênio em Angiospermas não-leguminosas como: Betulaceae, Casuarinaceae, Coriaceae, Datisceae e Elaeaginaceae (CHAUDHARY et al., 1981). Contudo, essas bactérias filamentosas também protegem as raízes das plantas hospedeiras de patógenos.

As plantas, a partir dos exsudatos, estimulam as actinobactérias da rizosfera, as quais se utilizam desses exsudatos para a síntese de antibióticos (TOKALA et al., 2002) e enzimas como quitinases e glucanases (GOMES et al., 2000; FAYAD et al., 2001) que afetam o crescimento de

fungos. Inclusive, em plantas sadias, a quantidade de actinobactérias é significativamente maior que em plantas doentes (POLYANSKAYA et al., 2003).

Desde a descoberta do primeiro antibiótico proveniente de uma actinobactéria do solo em 1940 por Selman Waksman (KRESGE; SIMONI; HILL, 2004), milhares de novas moléculas e microrganismos já foram estudados. Sendo assim, a utilização das actinobactérias na agricultura se tornou um caminho promissor a ser seguido, principalmente em relação ao controle biológico. Este método tem como objetivo principal buscar, em ambientes naturais, organismos que controlam o número de patógenos por indivíduo dentro de uma população.

Os primeiros casos de biocontrole descritos foram sobre o controle de insetos, ácaros e ervas daninhas, sendo reportado, em 1888, sucesso para o controle do “pulgão” *Icerya purchasi* com ajuda da “joaninha” *Rodolia cardinalis* no Estado da Califórnia (Estados Unidos da América). Porém, com o avanço dos métodos de controle biológico, as formas de sua utilização se tornaram mais amplas, agregando o controle de invertebrados, alguns vertebrados e patógenos de plantas (PARRA et al., 2002). Para o caso específico da patologia de plantas, o controle biológico consiste na redução da densidade de inóculo ou da capacidade de produção de doença pelo patógeno ou parasita a partir de um ou mais organismos, sendo efetuado naturalmente ou através da manipulação ambiental, ou do hospedeiro, ou mesmo por introdução de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1974).

Dessa forma, actinobactérias têm sido estudadas como alternativa ao uso convencional de pesticidas (WHIPPS, 2001), os quais podem ser danosos ao meio ambiente e ao homem. Por conseguinte, pode-se destacar o uso das actinobactérias em diferentes formas de controle biológico. Esses microrganismos ou seus metabólitos secundários têm sido usados no controle de insetos (HAYASHI et al., 1991), ervas daninhas (SILVA, 2005) e nematóides (COIMBRA; CAMPOS, 2005).

Porém, sua principal utilização se concentra no controle de fungos e bactérias, os quais podem promover grandes perdas na produção agrícola. Observa-se o uso de actinobactérias no controle de *Rhizoctonia solani* e na murcha bacteriana do tomateiro (SABARATNAM; TRAQUAIR, 2002; CARRER, 2002.), no controle de *Fusarium oxysporum* causador da murchadeira em trigo e de *Colletotrichum musae*, agente causal da antracnose em bananeira (TAECHOWISAN; PEBERDY; LUMYONG, 2003), além do controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho (BRESSAN; FIGUEIREDO 2003). Muitos outros trabalhos ainda frisam o

potencial desses microrganismos como agentes de biocontrole de doenças (CRAWFORD et al., 1993; YUAN; CRAWFORD, 1995; EL-TARABILY et al., 1997; GOMES et al., 2000; SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2008).

Além de participarem do processo de controle de doenças, as actinobactérias também possuem papel importante quanto à interação com a planta e outros organismos que vivem no mesmo ecossistema.

Observa-se que esses microrganismos são capazes de estimular a germinação de esporos e a colonização radicular de fungos micorrízicos arbusculares (AMES, 1989; CARPENTER-BOGGS; LOYNACHAN; STAHL, 1995) e também o crescimento de fungo ectomicorrízico, sendo então conhecidas como MHB (Mycorrhiza Helper Bacteria) (MAIER et al., 2004; SCHREY et al., 2005). Os fungos ectomicorrízicos ainda participam diretamente na proteção da planta a partir da formação de um manto micorrízico ou indiretamente, por competição por nutrientes encontrados na rizosfera (AUER; KRÜGNER, 1991 apud GRIGOLETTI Jr et al., 2000).

As actinobactérias ainda possuem a capacidade de promover o crescimento de plantas, sendo reconhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (TOKALA et al., 2002; MERZAEVA; SHIROKIKH, 2006; MAFIA et al., 2007; SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2008). Em sistemas florestais ocorrem grandes perdas de mudas, principalmente por contaminação por fungos. O controle desses patógenos é feito pelo manejo e principalmente por uso de fungicidas (FERREIRA, 1989). Dessa forma, o uso de actinobactérias nesses sistemas pode ser de grande valia, pois os fungicidas, além de selecionar fungos patogênicos resistentes (SILVA; COELHO 2003), podem ainda afetar negativamente os fungos micorrízicos (FERREIRA, 1989) e, com isso, impedir um bom desenvolvimento das essências florestais.

O método de controle biológico em sistemas florestais foi proposto pela primeira vez por J. Risbeth, em 1963, fazendo o controle de *Heterobasidium* por *Phanerochaete gigantea* em tocos recém podados com intuito de proteger a madeira da biodegradação (GRIGOLETTI Jr et al., 2000). Desde então, estudos vêm apresentando o uso de microrganismos no controle biológico de doenças de espécies arbóreas. Pode-se verificar o uso de *Bacillus* sp. no controle de *Cylindrocladium* sp., causador da mancha foliar em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* (BETTIOL et al., 1986) e também, o uso de *Trichoderma inhamatum* no controle biológico de

Rhizoctonia solani, agente etiológico da mela de estacas para enraizamento de *Eucalyptus* spp. (MAFIA et al., 2003).

Existe, ainda, no mercado, um biofungicida (Mycostop.RTM - Kemira Biotech, Finland) composto por *Streptomyces griseoviridis*, o qual é indicado para a podridão de raízes causada por *Fusarium* spp e por outros fungos, em plantas ornamentais, sendo também indicado para o controle de doenças fúngicas em *Pinus* sp.

No entanto, apesar de existirem estudos comprovando a eficácia das actinobactérias no controle biológico de doenças de plantas (SHEKHAR et al., 2005; LEHR et al., 2008), poucos trabalhos foram feitos envolvendo espécies florestais (LEHR et al., 2008; 2007).

Dessa forma, o uso desses microrganismos pode ser uma alternativa para o controle de doenças de espécies arbóreas de interesse econômico e ambiental, incluindo espécies ameaçadas de extinção, como *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Ktze.

2.2 *Araucaria angustifolia*

A Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como floresta de Araucária, faz parte do bioma da Mata Atlântica (Decreto Lei 750/1993), detentora de alta diversidade apesar de ser intensamente explorada (LIMA; CAPOBIANCO, 1997). A região de ocorrência natural das araucárias estava concentrada nos Estados do Rio Grande do Sul (25%), Santa Catarina (31%), Paraná (40%) e São Paulo, o último concentrando aproximadamente 3% da área total, internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%) (CARVALHO, 1994). As altitudes de preferência da espécie variam entre 500 e 1.500 metros, entre os paralelos 21° e 30° de latitude sul (HUECK, 1972) e com temperatura média anual variando de 13 a 18°C (GOLFARI, 1967).

A principal espécie arbórea, *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. Ktze, ou Pinheiro-do-Paraná pertence à família Araucareaceae e é a única espécie encontrada no Brasil do seu gênero (Araucaria), o qual é composto por 19 espécies. É uma espécie perenifólia, atinge até 50 m de altura e apresenta incremento anual em altura de 1 m (SBS 2006). Quando adulta toma a forma de um candelabro, o que a torna contrastante com as demais espécies do sul do Brasil. A *A. angustifolia* pode viver em média 250 anos e começa a produzir sementes aos 10-15 anos. A espécie é dióica e, portanto, existem árvores femininas e masculinas, sendo polinizada pelo vento, produzindo cerca de 40 pinhas anuais. A semente, conhecida como pinhão, é encontrada no

Brasil entre março e setembro e sua dispersão é feita pela gralha-amarela (*Cyanocorax chrisops*) e outros animais, como camundongos, pacas, cutias, ouriços e esquilos (SANQUETTA; TETTO, 2000).

Sua formação constitui parte especial da floresta pluvial, cujo desenvolvimento está intimamente relacionado com a altitude. No sul do País a *A. angustifolia* é encontrada em altitudes médias de 600 a 800 m. Em São Paulo sua formação tem limite altitudinal entre 700 a 750 m com maiores concentrações nas proximidades de Campos do Jordão – SP, a uma altitude entre 1400 e 1800 m. No Estado do Rio de Janeiro a espécie é encontrada nas florestas do Itatiaia a altitudes entre 1400 e 1800 metros. Já em Minas Gerais as formações de *A. angustifolia* situam-se ao norte da Serra da Mantiqueira em altitudes entre 800 e 1800 metros (SANQUETTA; TETTO, 2000).

No início do século XX a floresta de araucária representava 35 % da cobertura vegetal dos estados do sul. Estima-se que os remanescentes de Floresta Ombrófila Mista, nos estádios primários ou mesmo avançados, não perfazem mais de 0,7% da área original atualmente (MMA, 2002). Atualmente, a espécie figura como vulnerável na lista de espécies ameaçadas de extinção (FARJON, 2006)

Sua extração foi mais intensa a partir de 1934, atingindo o auge no período de 1950 a 1970. Até a década de 70 a araucária foi o principal produto brasileiro de exportação, respondendo por mais de 90% de toda a madeira produzida no país (MATTOS, 1994).

No Estado de São Paulo as suas reservas foram exauridas na década de quarenta e, no Estado do Paraná, em 1977, os remanescentes não passavam de 4,3 % da área original (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1983).

Dessa árvore são obtidos vários produtos madeireiros que podem ser utilizados para produção de móveis, vigamento, palitos de dentes e de fósforo, fabricação de compensados, celulose, papel, instrumentos musicais, dentre outros; e produtos não madeireiros como: o pinhão (semente) o qual é fonte de alimento para o ser humano e para os animais silvestres e a resina que, ao ser destilada, fornece alcatrão, óleos, terebentina, breu, vernizes, acetona e ácido pirolenhoso para várias aplicações industriais (EMBRAPA, 2002). Segundo o Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul (2005), a madeira bruta, com diâmetro à altura do peito superior a 40 cm, é comercializada a R\$ 268 / m³ e os produtores recebem, em média, R\$ 177,00 / m³ de madeira. Entre 1997 e 2004 os preços praticados em núcleos regionais no Estado do

Paraná, das toras de araucária em pé no produtor, com diâmetro acima de 40 cm aumentaram 151,2% (R\$ 57,88 para R\$ 145,42).

Atualmente, as áreas de reflorestamento da espécie são de 24,2 mil hectares do total de 5,56 milhões do total das áreas reflorestadas no Brasil, com produtividade de 10-25 m³/ha ano (SBS 2006). A espécie é a quinta conífera mais plantada, o que, infelizmente, corresponde a menos de 1 % do número do total de coníferas plantadas neste País (BRACELPA, Associação Brasileira de Celulose e Papel, 2006).

Apesar da importância econômica e ecológica da araucária, poucos trabalhos têm focado a biologia desta espécie em formações naturais (SOLÓRZANO FILHO, 2001). E, ainda, poucos trabalhos foram publicados com intuito de aprimorar as técnicas de plantio (CESAR FILHO, 2005) ou o controle de patógenos.

2.3 *Pinus taeda*

O estudo *in vivo* com araucária se mostrou inviável nesta pesquisa devido à época de colheita de semente e tempo necessário para o desenvolvimento do experimento. Desse modo, optamos pela espécie *Pinus taeda*, que é uma Conífera, e que, apesar de ser exótica, é de grande importância para a indústria de madeira do Brasil.

A espécie *Pinus taeda*, pertencente à família Pinacea, é nativa dos Estados Unidos e distribui-se naturalmente em quatorze Estados, sendo: do sul de New Jersey à região central da Flórida e leste do Texas. É a espécie florestal comercialmente mais importante no sul dos Estados Unidos, abrangendo 11,7 milhões de hectares, onde o clima é temperado úmido, com verões quentes e invernos suaves, com precipitações anuais entre 1020 e 1520 mm (Estados Unidos, 2008)

No Brasil, a introdução com sucesso de espécies do gênero *Pinus* ocorreu em meados do século passado, principalmente no sul e sudeste. Destacam-se as espécies *P. taeda* e *P. elliottii* pela facilidade no manejo, rápido crescimento e fácil reprodução (SHIMIZU, 2004).

A partir do final da década de 60 houve o aumento de sua produção, principalmente devido ao retorno econômico mais rápido das espécies do gênero em relação à *Araucaria angustifolia* (SANQUETTA; TETTO, 2000).

Em 2005, o plantio de florestas no Brasil totalizou 553 mil hectares com valor de produção de base florestal de US\$ 27.8 bilhões ou 3,5 % do PIB nacional. A área reflorestada de *Pinus spp.*, que corresponde a 1,8 milhão de hectares, com produtividade anual de 25-30 m³/ha, é responsável por 70 % da produção de compensados e madeira maciça para o setor moveleiro. O consumo nacional de compensados em 2005 foi de 1,07 milhão de m³, sendo exportados 2,8 milhões de m³ dos quais 55 % provenientes de *Pinus*. Nesse mesmo ano, o Brasil ainda produziu 23,5 milhões de m³ de madeira serrada, sendo 8,9 milhões provenientes desse gênero de conífera (SBS 2006). A espécie *P. taeda* destaca-se neste grupo, pois é responsável por aproximadamente 20 % das florestas plantadas de coníferas do Brasil (BRACELPA, Associação Brasileira de Celulose e Papel, 2006).

2.4 Doenças Fúngicas em *Pinus spp.* e *Araucaria angustifolia*

O reflorestamento de *Pinus spp.* e *A. angustifolia* é feito formando-se monoculturas que apresentam maior produtividade, embora proporcionem maior ação de organismos patogênicos.

Desse modo, observam-se em *Pinus spp.* algumas doenças que afetam as raízes e ou o colo, causando tombamento de mudas ou “damping-off” e outras que afetam as acículas, causando a morte das pontas ou galhos. Dentre os fungos patogênicos que causam podridão de raiz, seguida de tombamento da muda, destacam-se: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moliniforme*, *Fusarium centricosum* e *Pythium debaryanum*. Já o fungo *Diplodia pinea* causa seca das pontas, anelamento de hastes de mudas no viveiro e apodrecimento de raízes de árvores adultas (FERREIRA, 1989). Na madeira, este patógeno penetra através da inserção dos galhos e atinge o alburno, causando manchas de coloração cinza claro a cinza escuro (OLIVEIRA, 1980).

Outros fungos que causam doenças nas acículas são as espécies *Cylindrocladium pteridis*, e *Dothistoma septospora*. Este último é considerado o mais importante para a área de reflorestamento de *Pinus spp.* no mundo, sendo uma das poucas doenças com controle químico no campo (Ferreira, 1989). Além desses, *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton, pode causar seca das pontas, podridão de raiz e colo, infecções nos ramos e troncos (AUER, 2000).

Outra doença importante é causada por *Armillaria melea*, cuja ação se baseia no apodrecimento das raízes, reduzindo a área de absorção das mesmas, e apodrecimento de porções basais do tronco. Observam-se como sintomas da armilarirose o crescimento vagaroso das plantas,

exsudação de resina na base do tronco e nas raízes, queda de acículas, os terminais de galhos secam e as plantas morrem (FERREIRA, 1989).

Vários dos fungos que afetam espécies de *Pinus* atacam também a *Araucaria angustifolia*. Os fungos saprófitas, como por exemplo: *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia sp.* e *Pythium sp.* são conhecidos pela sua ação de tombamento de plântulas em canteiro de produção de mudas de araucária. O controle geralmente é feito com fungicidas, porém devem ser utilizados aqueles que não afetam os fungos micorrízicos. Somando-se a esses, o fungo *Armillaria melea*, além de causar a morte da planta, causa podridões de coloração parda na madeira, reduzindo o seu valor final. Este basidiomiceto ataca geralmente plantas que possuem entre 2 e 10 anos de idade e os principais sintomas são amarelecimento e murcha das acículas, placas miceliais esbranquiçadas na região entre-casca com formação de rizomorfás, estruturas filamentosas de 1 a 2 mm de coloração marrom (AUER, 2000). A transmissão de árvore para árvore pode ocorrer pelo contacto raiz-hifa ou pelas rizomorfás. Os principais meios de controle desta doença são por rotação de cultura, plantios mistos e retirada de umidade das toras estocadas. O uso de controle químico é de alto custo e não garante o controle da doença (AUER; GOMES; GRIGOLETTI Jr., 2004).

3 Material e métodos

3.1 Isolamento dos microrganismos

Para o isolamento dos microrganismos foram coletadas raízes de 15 árvores adultas na Floresta Ombrófila Mista no Parque Estadual (Campos do Jordão), que é uma área de preservação da *A. angustifolia*. 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”. Considerou-se como solo rizosférico aquele que se manteve aderido às raízes após agitação manual. Adicionaram-se assepticamente 10 gramas de raiz como solo rizosférico aderido a 90 ml de solução salina 0,85 %, mantidos sob agitação (300 rpm) por 30 minutos, criando-se a suspensão de concentração 10^{-1} .

Para o isolamento foram utilizados dois métodos. O primeiro, pela diluição seriada (10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}), com três repetições por amostra, em dois meios de cultura: WYE composto por: 0,25 g/L de extrato de levedura; 0,5 g/L de K_2HPO_4 ; 15 g/L de ágar; pH 7,2 e YCED composto por: 0,3 g/L de extrato de levedura; 0,3 g/L de casaminoácidos; 0,3 g/L de glicose; 2 g/L de K_2HPO_4 ; 15 g/L de ágar; pH 7,2 (CRAWFORD et al., 1993).

O segundo método consistiu no plaqueamento das alíquotas da diluição 10^{-1} em meio CMS. Este meio é composto por: ácido cítrico 2mM; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1,25mM; KCl, 10mM; Na_2SO_4 , 2 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM; NH_4Cl , 100mM; glicose, 200 mM; tampão MES, pH 7.2, 200 mM; solução de elementos traço 1% v/v e ágar, 2 % w/v. A solução de elementos traço é composta de: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1 mM; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.5 mM; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.2 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mM; H_3BO_3 , 1 mM, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 mM; $ZnCl_2$, 0.5 mM; e $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$, 0.1 mM; essa solução foi preparada em 0,1 N HCl. Para evitar o crescimento de fungos no meio, foram adicionados $100 \mu g \text{ ml}^{-1}$ de cicloheximida. O antibiótico, glicose, cloreto de magnésio e os elementos traço foram esterilizados por filtração através de uma membrana de $0.2 \mu m$ e adicionados separadamente ao meio CMS autoclavado, antes de ser plaqueado. O meio sólido foi coberto por uma membrana de celulose ($0,45 \mu m$ Millipore) em placas de 60 mm (HIRSCH; CHRISTENSEN, 1983, modificado pelo autor). A superfície da membrana foi inoculada com $100 \mu l$ de alíquota da amostra (MAIER et al., 2004).

Em ambos os métodos, as placas contendo diluições da suspensão do solo foram incubadas a 28°C por até 20 dias. Os isolados obtidos foram transferidos para meio ISP2 composto por: 4 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte, pH 7,2 e purificados.

3.1.1 Identificação, manutenção e cultivo dos isolados de actinobactérias

Para a identificação dos isolados considerou-se como prováveis actinobactérias aqueles microrganismos que possuíam características do grupo como: esporulação, colônia pequena, ressecada e aderida ao ágar. Foi feita também a coloração de GRAM, já que uma das características do grupo das actinobactérias é ser GRAM positiva (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1984). Os isolados foram mantidos em meio ISP2, em placas de petri de 60 mm, a 28 °C em BOD. A repicagem foi feita a cada trinta dias em duplicata e os estoques foram mantidos como suspensão de esporos em solução de glicerol 10 % a 20 °C negativos.

3.1.2 Análise fisiológica e morfológica dos principais isolados

Os isolados foram repicados com ajuda de alça de platina para placas de petri contendo meio ISP2. Lamínulas estéreis foram acopladas ao ágar, próximo às estrias, formando um ângulo de 45°. A cultura foi então incubada a 28° C, até ocorrer esporulação. Após este tempo, as lamínulas foram retiradas com ajuda de uma pinça esterilizada, colocadas sobre lâminas com azul de metila. As lamínulas preparadas foram examinadas em microscópio óptico observando-se a cadeia de esporos de cada isolado de actinobactéria. Também foram observados a coloração da massa de esporos e pigmentos solúveis no meio de cultura ISP2.

Para a análise fisiológica, os isolados foram testados quanto à capacidade de produzir: fosfatases, proteases, quitinases, lipases, amilases e celulases. Para testar os isolados quanto à produção de fosfatases foi utilizado meio mínimo sintético (SMM), modificado de Hamdali et al.(2007), composto por: 10 g de glicose; 2,0 g de NaNO₃; 0,5 g de MgSO₄-7H₂O; 0,01 g de KCl; 0,01 g de FeSO₄-7H₂O; 1000 ml de água destilada, 15 g de ágar e 10 ml de CaHPO₄-2H₂O 4,93%, autoclavados separadamente.

O meio MSSC (Mineral Salts Starch Casein Agar), modificado de Crawford et al.(1993), composto por: 1000 ml de água destilada, 2 g de NaCl; 0,05 g de MgSO₄; 0,02 g de CaCO₃; 0,01 g de FeSO₄-7H₂O; 2,0 g de KNO₃ 2 g de KH₂PO₄ e 15 g de ágar, e pH 7,0, foi utilizado para a análise enzimática de lipase, amilase e celulase. Para isso, utilizou-se, respectivamente, como fonte de carbono: 0,1 % de solução de óleo de girassol contendo tween 80 a 10 %, para lipase (KO; WANG; ANN 2005); 5,0 g de celulose em pó em conjunto com 1,0 g de extrato de levedura, para celulase e 4 g de amido solúvel, para amilase.

A identificação de protease foi feita utilizando-se meio de cultura composto por: 10 g de caseína não hidrolisada; 0,1 g de extrato de levedura; 2,64 g de (NH₄)₂SO₄, 2,38 g de KH₂PO₄, 5,64 g de K₂HPO₄-3H₂O, 1,0 g de MgSO₄-7H₂O, pH 7,0 modificado de Wood (1980).

Já a identificação de quitinase foi feita utilizando meio de cultura contendo quitina coloidal. Para sua produção, 60 gramas de quitina foram branqueadas em 400 ml de HCl concentrado, mantendo-se sob agitação por 40 minutos. Essa solução foi adicionada vagarosamente em 2 litros de água resfriada a 5 ° C. A suspensão foi então coletada em filtro de papel comum, com ajuda de uma bomba a vácuo e diluída 3 vezes em 5 litros de água para lavagem e posteriormente seca em estufa a 60 ° C. O meio de cultura então foi preparado com: 1000 ml de água destilada, 4 g de quitina coloidal; 0,7 g de K₂HPO₄; 0,3 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄-5H₂O; 0,01 g de FeSO₄-7H₂O; 0,001 g de ZnSO₄; 0,001 g de MnCl₂; 15 g de ágar; pH 7,2 (HSU; LOCKWOOD, 1975).

Os meios de cultura feitos para analisar a produção de enzimas pelos isolados foram autoclavados e vertidos em placas de petri 90 mm. Com ajuda de um furador de rolha, discos de 6 mm de diâmetro dos isolados crescidos em meio ISP2 foram repicados para as placas de petri, com as colônias em contato com o ágar. Após 10 dias de incubação a 28 °C verificou-se a formação de halos, o que caracteriza a degradação enzimática das substâncias testadas.

3.2 Manutenção e Cultivo dos Fungos *Fusarium spp.*

Foram utilizadas duas estirpes de *Fusarium spp*, uma isolada de sementes cedida pelo laboratório de fitopatologia de sementes (ESALQ-USP) e outra, isolada de *Pinus taeda*, cedida pela EMBRAPA FLORESTAS. Esses patógenos foram cultivados em placa de petri 90 mm contendo o meio de cultura ISP2 e meio BDA (infusão de 200 g de batata; 20 g de dextrose; água

destilada 1000 ml). Os estoques foram mantidos por repicagem a cada 20 dias, sendo as placas vedadas com Parafilm[®]M e incubadas à temperatura de 28 °C. A repicagem, tanto para manutenção da colônia, quanto para os testes de inibição, foi feita utilizando furador de rolha de 6 mm de diâmetro, sendo retirados das extremidades da colônia do fungo em crescimento.

3.2.2 Teste de antagonismo aos fungos patogênicos *Fusarium spp* isolados de sementes de milho e de mudas de *Pinus taeda*

Para avaliar o efeito das actinobactérias sobre os patógenos foi feito teste de contato direto, medindo-se o halo de inibição entre as culturas. Primeiramente cada actinobactéria foi inoculada a 20 mm da extremidade da placa de petri contendo meio ISP2 e incubada por cinco dias para permitir a sua esporulação, pois a formação dos metabólitos secundários está relacionada com a formação de hifas e esporos (CHATER; HORINOUCI, 2003; ELLIOT; TALBOT, 2004). Após este prazo, os patógenos com dez dias de crescimento foram inoculados a uma distância de 30 milímetros da actinobactéria. As placas foram seladas com parafilme e incubadas em estufa a 28 °C. Os halos de inibição foram medidos com régua, após 3, 5, 7 e 10 dias.

Para análise da produção de metabólito volátil, os isolados de actinobactérias (A43, A43b, PNA, A64, A93 e A75) foram inoculados em placa de petri contendo meio ISP2 até esporulação. Posteriormente, discos de 6 mm do isolado de *Fusarium* (isolado de *Pinus*) foram inoculados em placas de petri contendo meio BDA. As partes inferiores, contendo o meio de cultura das respectivas placas de petri (contendo um isolado de actinobactéria e fungo) foram fechadas uma contra a outra e vedadas com Parafilm. O controle foi feito com placa de petri contendo meio ISP2 não inoculado. As placas foram incubadas a 28 °C por 15 dias e o crescimento do fungo (diâmetro) medido diariamente com ajuda de uma régua

A análise estatística foi feita pelo aplicativo estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute Inc), sendo utilizado Tukey (5%) para os testes de médias, utilizando-se quatro repetições por isolado testado.

3.3 Manutenção e Cultivo do fungo *Armillaria sp.*

O fungo *Armillaria sp.*, agente causal de tombamento em *Pinus sp.*, foi cedido pela EMBRAPA FLORESTAS. Esse patógeno foi cultivado a 22 ° C, em placas de petri 90 mm contendo meio BDA. Os estoques foram mantidos por repicagem a cada 60 dias, sendo as placas vedadas com parafilm. A repicagem foi feita com ajuda de bisturi, retirando-se fragmentos de aproximadamente um centímetro de comprimento da rizomorfa formada pelo patógeno.

3.3.1 Teste de antagonismo ao fungo patogênico *Armillaria sp.*

Para os testes de antagonismo a *Armillaria sp.* os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio de cultura ISP2 ágar estéril, em placas de petri 90 mm, até a esporulação, a 28 ° C. Com ajuda de furador de rolha de 6 mm de diâmetro, dois discos contendo os isolados foram repicados para erlenmeyers com capacidade de 250 ml, adicionados de 50 ml de meio ISP2 líquido, e cultivados por 10 dias, a 28 ° C e 150 rpm (rotações por minuto).

Posteriormente o extrato de cada isolado foi centrifugado a 10000 rpm (3200 G) e esterilizado em filtros Millipore 0,22 µm. Aliquotas de 12,5 ml do extrato estéril de cada isolado foram vertidos, em separado, em erlenmeyer com capacidade de 250 ml, acrescidos de 12,5 ml de meio de cultura BDA estéril, duas vezes concentrado. Para o controle, foram utilizados meio de cultura BDA na concentração normal e BDA + ISP2.

A inoculação dos erlenmeyers contendo: Extrato + BDA, BDA e BDA + ISP2 foi feito transferindo dois discos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, de cultura pura do fungo *Armillaria sp.* Após 20 dias de incubação, a produção de biomassa foi analisada filtrando-se o caldo com micélio e rizomorfa em papel de filtro Whatman N°1 e secando-se em estufa por 24 horas a 60 °C. Foi feita a transformação das médias de peso de matéria seca (mg) para crescimento diário médio (mg/dia) da biomassa (GOMES et al., 2007).

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. A análise estatística foi feita pelo aplicativo estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute Inc), sendo utilizado Tukey (5%) para os testes de médias.

3.3.2 Inibição de *Armillaria* sp. em placa de petri

Para o ensaio de inibição do fungo *Armillaria* sp. em placa de petri, os isolados de actinobactérias foram inoculados pelo método de estria simples em meio de cultura ISP2 até a metade da placa contendo meio de cultura. Um disco do fungo de aproximadamente 0,5 centímetros quadrados foi adicionado a uma distância de 2 cm da bactéria, na outra metade do meio de cultura. As placas foram incubadas a 25 °C por 20 dias e o número de rizomorfos foi contado após este período. Como já discutido na revisão, esta estrutura é a forma de propagação do fungo dentro da madeira. Sendo assim, a sua inibição pelas actinobactérias sugere uma forma de combater o patógeno, resultando em controle da doença. O experimento foi feito com quatro repetições por tratamento. O controle foi meio de cultura contendo somente o inóculo de fungo. Considerou-se o controle como 100 % de produção média de rizomorfos. O cálculo de percentagem para os tratamentos contendo os isolados de actinobactérias foi feito dividindo o número médio de rizomorfos produzidas na presença da bactéria pelo o número médio de rizomorfos do controle, multiplicado por 100.

3.4 Identificação molecular dos principais isolados

3.4.1 Extração do DNA

Os isolados selecionados foram cultivados em meio ISP2 líquido, a 28 ° C por cinco dias. Alíquotas de 1 ml foram adicionadas em microtubos com capacidade para 1,5 ml e centrifugadas a 5000 rpm (1400 G) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 1 ml de solução salina 0,85 % estéril duas vezes, centrifugando-se o material a 5000 rpm por 10 minutos e descartando o sobrenadante.

O precipitado de células foi adicionado de 700 µl de tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl pH8,0 100mM; EDTA pH8,0 20 mM; polivinilpirrolidona (PVP-40) 1 %; CTAB 2%; Proteinase K 100 µg/ml; β-Mercaptoetanol 0,2 %; água Milli-Q 4,476 ml), homogeneizado e deixado por 30 minutos em banho-maria 60 ° C, sendo homogeneizado 20 vezes a cada 10 minutos. Adicionaram-se 650 µl de CIA 24:1 (Clorofórmio:Álcool Isoamílico) homogeneizando 20 vezes até formar uma emulsão e centrifugado a 12000 rpm por 7 minutos.

A fase aquosa formada foi transferida para novos microtubos com capacidade para 1,5 ml, adicionando-se 200 µl de tampão de extração sem Proteinase K e 650 µl de CIA. A amostra foi novamente homogeneizada e centrifugada a 12000 rpm (10000 G) por 7 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para microtubos sendo adicionados 650 µl de CIA e centrifugado a 12000 rpm por 7 minutos, procedimento repetido duas vezes. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol à temperatura ambiente, homogeneizado suavemente vinte vezes e centrifugado a 12000 rpm por 7 minutos. O precipitado foi então lavado uma vez com 250 µl de etanol 70 % e centrifugado e deixado sobre o balcão por 30 minutos para secar e ressuspendido em 40 µl de Tris-RNase (10 mM – 10 µg/ml).

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase foi realizada utilizando-se um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de reação (primers) para o gene 16S rRNA de Eubacteria sendo estes: primers externos: 16 S f 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'; 16 S r 5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'; primers internos: 357 f 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'; 357 r 5' CTG CTG CCT CCC GTA GG 3'; 704 f 5' GTA GAG GTG AAA TAC GTA GA 3'; 704 r 5' TCT ACG AAT TTC ACC ACT AC 3'; 1114 f 5' GCA ACG AGC GCA ACC C 3'; 1114 r 5' GGG TTG CGC TCG TTG C 3'.

A reação foi composta de 1 µl da suspensão de DNA, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,25 µl de dNTP's (adenina, guanina, timina, citosina) 10 mM; 1,0 µl de Primer f 5 pmoles/µl; 1,0 µl de Primer r 5 pmoles/µl; 0,2 µl de Taq DNA Polymerase 5U/µl; Buffer 10X PCR 2,5 µl (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂), sendo o volume completado para 25 µl com água ultra-pura estéril. A reação foi conduzida em um termociclador com as seguintes condições: desnaturação inicial 96 ° C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação (96 ° C por 1 minuto), anelamento (55 ° C por 0,5 minutos), extensão (72 ° C por 2 minutos) e uma extensão final a 72 ° C por 10 minutos.

3.4.3 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação, os produtos de PCR foram transferidos para microtubos de 500 µl, sendo adicionados 130 µl de isopropanol 100 % e 45 µl de água ultra-pura estéril, homogeneizado com um pulso em agitador de tubos tipo vortex e incubado por 2 horas a 20 ° C negativo. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 25 minutos e o sobrenadante descartado, 250 µl de etanol 70 % foram adicionados e a suspensão de DNA foi homogeneizada em agitador de tubos tipo vortex por 5 segundos e centrifugada a 10000 rpm (8000 G) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco no concentrador de DNA por 10 minutos a 45 ° C e posteriormente ressuspensionado em 50 µl de água ultra-pura estéril e armazenado a 20 ° C negativo.

3.4.4 Quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TSB, contendo brometo de etídeo 2 %, utilizando-se 5 µl da amostra. Os padrões de comparação utilizados foram: pGEM para verificar a concentração e λ /Hind III para quantificar o tamanho das bandas formadas, modificado de Doyle; Doyle (1990). O gel foi submetido à corrida de 8 V por 40 minutos. O DNA amplificado foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e registrado por câmera digital acoplada. A quantificação de tamanho e concentração de DNA foi feita por comparação visual dos padrões.

3.4.5 Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA obtido pela amplificação por PCR, 5 pmoles de primers (16S f, 16S r, 357 f, 357 r, 704 f, 704 r, 1114 f, 1114 r), Buffer 2,5 x 2,0 µl, Dynamic 2,0 µl e água ultra-pura esterilizada 4,0 µl para completar o volume de 10 µl. A reação foi conduzida em termociclador, com 30 ciclos de: desnaturação (95 ° C por 20 segundos), anelamento (55 ° C por quinze segundos), extensão (72 ° C por sessenta segundos). O produto foi então purificado com acetato de sódio, seguindo as instruções do fabricante (GE Health Care).

Após purificação o precipitado foi re-suspendido em 10 µl de formamida e submetido ao sequenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems), seguindo instruções do fabricante.

3.4.6 Análise das seqüências

O cromatograma obtido pelo sequenciador foi processado pelo aplicativo Phred (EWING; GREEN, 1998) para a formação das seqüências, eliminando-se as extremidades de baixa qualidade.

Estas seqüências foram submetidas à identificação pelo site RDPII 2008 a partir do programa SEQUENCE MATCH. As seqüências retiradas do site, com similaridade superior a 94 %, e as seqüências dos isolados de actinobactérias, foram utilizadas para a criação das árvores filogenéticas. Após o alinhamento das seqüências com ajuda do programa CLUSTALW as árvores foram criadas no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007) mantendo as configurações padrões do programa com adição de 1000 amostras de bootstraps e modelo Kimura 2-Parameter. Os métodos de “*Neighbor-Joining*”, “*Minimum Evolution*” e “*Maximum Parsimony*” foram utilizados para a geração das árvores.

3.5 Efeito das actinobactérias sobre o crescimento de *Pinus taeda*

Sementes de *Pinus taeda*, provenientes de Manasa Madeira Nacional S/A, Fazenda Costa – Pr., foram mantidas em água por 24 horas e posteriormente em câmara fria a 4 ° C por trinta dias para quebra de dormência. As sementes foram desinfestadas com solução de álcool 70 % por vinte minutos e mantidas em vermiculita, sendo transplantadas para os vasos 7 dias após a germinação.

O isolado de fungo ectomicorrízico (EM), *Suillus brevipes*, utilizado neste experimento, foi cedido pela Universidade Federal de Viçosa-MG. Este fungo foi multiplicado em placas de petri 90 mm contendo meio MNM Agar (MARX, 1969). A repicagem foi feita retirando-se discos de 6 mm de diâmetro da cultura estoque, sendo as placas com os fungos seladas com parafilm e incubadas por 20 dias a 28 ° C.

A inoculação no vaso foi feita retirando-se discos de 6 mm de diâmetro das bordas do micélio do fungo EM crescido em placas de Petri, transferido-os para vasos de cultivo no

momento do transplante das mudas (BRUNDRETT *et al.*, 1996 apud SILVA R.; ; ANTONIOLLI; ANDREAZZA, 2003).

Após dez dias do transplante, seis isolados de actinobactérias incubadas em erlenmeyer de 250 ml preenchidos com 50 ml de meio ISP2 líquido por 10 dias, a 28 ° C, 150 rpm e lavadas em solução salina 0,85 % foram transferidos em aliquotas de 2 ml com ajuda de pipeta a uma profundidade aproximada de 2 centímetros da superfície do solo e rente à raiz das plântulas formadas. Após quinze dias da inoculação os vasos foram cobertos por plástico Rolopac, mantendo somente um orifício para a passagem das plântulas. Este procedimento foi desenvolvido para evitar a contaminação das unidades experimentais por esporos de actinobactérias dos tratamentos vizinhos.

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento sendo: controle (plântulas não inoculadas e plântulas com EM) e tratamentos: plântula + actinobactéria, plântula + EM + actinobactéria. Como unidades experimentais foram utilizados vasos de plástico com capacidade para 1 kg de solo. Os vasos foram lavados com solução de hipoclorito de sódio 2,5 % (p.v.), para evitar contaminações. O solo foi autoclavado por uma hora e adubado com os seguintes fertilizantes por quilograma de solo: Sulfato de Amônio (0,63 g), fosfato super-simples (2,92 g), Cloreto de potássio (0,14 g), Fritas (0,16 g). Posteriormente o solo foi adicionado aos vasos, sendo estes mantidos em repouso 5 dias para estabilizar. Após trinta dias do plantio, as plântulas receberam 10 ml de adubação de cobertura quinzenalmente, mesclando sulfato de amônio 10 g/L e cloreto de potássio 3 g/L. O experimento foi feito em casa de vegetação, com duração de 3 meses, sendo realizadas irrigações com 100 ml de água, o que equivale a 60 % da capacidade de campo.

As unidades experimentais contendo o fungo EM tiveram o solo adubado com a metade da concentração normal de fósforo e nitrogênio e a testemunha foi solo com adubação recomendada conforme explicitado acima.

Os parâmetros analisados foram: altura da planta, massa seca da parte aérea e radicular e diâmetro do caule. A altura da planta foi medida utilizando-se régua graduada de sessenta centímetros e o diâmetro do caule com ajuda de paquímetro. Os resultados de massa seca da parte aérea e radicular foram obtidos, cortando as plantas rente ao solo. Em seguida, as partes aéreas e radiculares das plantas foram acomodadas em sacos de papel, identificadas e mantidas em estufa

a 60 ° C por 48 horas, pesando-se então a massa seca. A análise de concentração de fósforo foi feita seguindo os métodos descritos por Malavolta, Vitti e Oliveira (1989)

A análise estatística foi feita pelo aplicativo estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute Inc), sendo utilizado Duncan (5 %) para os testes de médias, sendo que os resultados das variáveis massa seca da parte aérea e massa seca da raiz foram transformados para raiz de x.

3.6 Efeito dos metabólitos sobre a germinação de esporos de *Gigaspora rosea*

Para o ensaio com germinação de esporos de fungos FMA, os isolados de actinobactéria selecionados foram incubados em meio de cultura ISP2 líquido por 7 – 10 dias a 28 ° C. Alíquotas de 100 µl foram espalhadas em placas de petri 90 mm contendo meio ISP2 ágar e as mesmas seladas com Parafilm e incubadas a 28 ° C até ocorrer a esporulação das culturas. As placas foram mantidas na presença de clorofórmio por 15 minutos e posteriormente expostas à luz UV por 20 minutos para eliminação da forma ativa dos isolados, vertendo-se então meio ágar-água 15 g/L nas placas a formar uma sobrecamada. Estas foram mantidas em geladeira por uma hora para dispersão dos metabólitos por toda a placa.

Concomitantemente os esporos de *Gigaspora rosea* foram desinfestados em solução 1:1:1 de cloramina-T 2%, sulfato de estreptomicina 200 mg/L e solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) 200 mg/L por 30 minutos, seguido de três lavagens com água esterilizada durante 30 minutos (REIS; PAULA; DÖBEREINER, 1999).

Posteriormente, os esporos foram adicionados assepticamente às placas, totalizando nove esporos por placa e estas foram vedadas com parafilm e incubadas no escuro à temperatura ambiente. A contagem de germinação foi feita com ajuda de lupa 4, 6, 9 e 11 dias após a incubação. Os esporos contaminados foram retirados e a contagem foi feita mantendo o número mínimo de cinco esporos por placa. Foram feitas placas em excesso para garantir seis repetições sendo descartando-se as placas com mais de cinco esporos contaminados por placa.

Foram feitas seis repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado, sendo a análise estatística desenvolvida com aplicativo estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute Inc), utilizando-se o teste de Tukey (5 %) para a comparação das médias, com transformação dos dados para raiz $x+0,5$.

4 Resultados e Discussão

4.1 Identificação, manutenção e cultivo dos isolados de actinobactérias

Pelos métodos de diluição em placa e separação física pela membrana Millipore, obtiveram-se 176 isolados, sendo que apenas 33 (18,8 % do total) foram considerados prováveis actinobactérias pelas características do grupo, como colônia pequena, ressecada e grudada ao ágar e também pela coloração de GRAM positiva e formação de esporos (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1984)

Pelo método de diluição seriada, utilizando dois meios de cultura, o número de isolados foi semelhante, obtendo-se 15 isolados no meio WYE (8,5 % do total), e 14 isolados no meio YECD (7,9 % do total).

Crawford et al. (1993), ao testarem vários meios de cultura quanto à capacidade de isolar actinobactérias encontraram números semelhantes para a proporção de actinobactérias isoladas em vários solos nesses mesmos dois meios, os quais foram os mais eficientes. No entanto, o método de separação física (HIRSCH; CHRISTENSEN, 1983), em comparação com a diluição seriada não foi eficiente, pois dos cinquenta e nove microrganismos isolados, apenas quatro foram identificados como possíveis actinobactérias e todos os outros apresentaram características típicas de fungos. Possivelmente a utilização dos filtros Millipore 0,45 μm não foi eficiente quanto à capacidade de barrar a passagem dos fungos. Mesmo porque alguns desses podem ser resistentes ao antibiótico, ciclohexemida, desfavorecendo o crescimento das actinobactérias, que possuem crescimento vagaroso em relação aos primeiros.

Figura 1 - Número de isolados, total de actinobactérias e percentagem de actinobactérias encontradas em dois meios de cultura pelo método de diluição seriada (WYE e YCED) e pelo método de separação física por membrana Millipore 0,45 µm

4.2 Análise fisiológica e morfológica dos principais isolados

Os isolados apresentaram esporulação do micélio aéreo, com colônias bem aderidas ao ágar (Figura 2). O gênero *Streptomyces* apresenta geralmente colônias ressecadas, lisas, com formação de micélio aéreo em diferentes colorações (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1984). As colônias também produzem pigmentos solúveis, como visto nos isolados A64 e PNA (Tabela 1) que podem ser observados ao colocar a placa de petri contendo a colônia contra a luz. No entanto, as características da colônia, como coloração micelial e pigmento solúvel, dependem do tipo de meio de cultura utilizado (CROSS, 1989). Contudo, as características fenotípicas encontradas neste trabalho em discussão estão de acordo com aquelas descritas para o gênero *Streptomyces*. Pela análise das colônias crescidas nas lamínulas enterradas no ágar observou-se que os isolados A43, A43b, PNA e A64 apresentaram formação de cadeias de esporos longas e em espiral, em contrapartida o isolado A75 apresentou cadeias de esporos em espiral curtas e o isolado A93, cadeias de esporos longas e retas (Tabela 1; Figura 3). As cadeias de esporos ainda variaram quanto à coloração, sendo, branca-acinzentada para os isolados A93, A43 e A43b, branco-esverdeada para o isolado A75 e marrom para os isolados A64 e PNA (Tabela 1). Além disso, os isolados foram caracterizados pela análise molecular do gene 16S rRNA, somente encontrado em bactérias, assunto a ser discutido no tópico 4.5.

O teste de identificação de produção de enzimas observadas pela formação de halo de degradação teve resultados interessantes. Buscou-se com este teste identificar aqueles isolados que possuem valor industrial e que porventura possuem ação antagônica contra fungos por meio de outras substâncias que não sejam quitinase. Os isolados A75, PNA, A93 e A64 que se agruparam (Grupo 1) na análise molecular são produtoras de quitinase, enquanto os isolados A43 e A43b (Grupo 2) não são. Essa enzima pode ser importante para o controle biológico de fitopatógenos, principalmente pela sua capacidade de degradar a parede celular de fungos superiores, a qual é composta de quitina (polímeros de N-acetil-glicosamina) e β -glucanas (WESSELS, 1990 apud FRÄNDBERG; SCHNÜRER, 1997; EL-TARABILY et al., 2000). Desse modo, a inibição dos fungos patogênicos, pelos quatro isolados citados acima, ocorreria provavelmente pela ação dessa enzima. É importante ressaltar que os isolados A43 e A43b não produziram nenhuma dessas substâncias, indicando que estes possivelmente produzam

antibióticos que inibem o crescimento fúngico, o que os tornaria armas potenciais para o controle biológico de plantas.

Foi verificada, também, em comum aos quatro isolados agrupados, a produção de protease, a qual é muito utilizada pela indústria de produção de couros, processamento de alimentos e de hidrolisados protéicos (BANIK; PRAKASH, 2004).

Em contrapartida, somente os isolados A93 e A75 foram capazes de produzir amilase. Esta enzima, secretada por várias espécies de *Streptomyces*, faz a quebra entre as ligações 1-4 da cadeia de amido, convertendo-a em moléculas de glicose (Mc MAHON; KELLY, FOGARTY, 1997; NGUYEN et al., 1997). Dessa forma, é utilizada para produção de derivados de amido e também na produção de fármacos, de tecido e na produção de detergentes.

Nenhum dos seis isolados foi capaz de produzir as enzimas: celulase, lipase e fosfatase, importantes moléculas catalisadoras de alto valor para a indústria têxtil e para a agroindústria. No entanto, novos estudos são necessários, inclusive com o restante das actinobactérias isoladas, para verificar o potencial industrial e agrícola das mesmas.

Tabela 1 - Características morfológicas dos isolados (A93, A75, A43, A43b, PNA e A64)

Isolados	Cadeia de Esporos			Micélio Aéreo	Produção de Pigmentos
	Formato	Comprimento	Coloração		
A93	Reta	Longa	Branca/Cinza	Presente	Não
A75	Espiral	Curta	Branca / Verde	Presente	Amarelo
A43	Espiral	Longa	Branca/Cinza	Presente	Não
A43b	Espiral	Longa	Branca/Cinza	Presente	Não
PNA	Espiral	Longa	Marrom	Presente	Marrom
A64	Espiral	Longa	Marrom	Presente	Marrom

Tabela 2 - Características fisiológicas dos isolados (A93, A75, A43, A43b, PNA e A64)

Isolados	Amilase	Celulase	Lipase	Fosfatase	Quitinase	Protease
A93	+	-	-	-	+	+
A75	+	-	-	-	+	+
A43	-	-	-	-	-	-
A43b	-	-	-	-	-	-
PNA	-	-	-	-	+	+
A64	-	-	-	-	+	+

Figura 2 - Fotos das colônias dos isolados (A43b, A43, A75, A64, A93 e PNA) incubados em meio ISP2 a 28 ° C

Figura 3 - Fotos em microscópio óptico (400 x) dos isolados, após esporulação (A43b, A43, A75, A64, A93 e PNA) crescidos em lamínulas. As setas indicam a cadeia de esporos dos respectivos isolados. As barras são proporcionais a 20 μm

4.3 Inibição de *Fusarium* spp.

Para a identificação e seleção daqueles isolados de actinobactérias que possuem atividade antagônica utilizamos o método de contato direto entre o fungo e os isolados. Mediu-se o halo de inibição selecionando aqueles que apresentaram maior tempo de inibição sobre o crescimento do fungo.

Foram escolhidos dois isolados do gênero *Fusarium* (um patógeno de *Pinus* e outro patógeno de sementes de milho) para observar a abrangência de ação antagônica das bactérias isoladas. Os trinta e três isolados de actinobactérias foram testados para a inibição dos fungos *Fusarium* sp.. Destes, após 10 dias de contato, dos seis melhores inibidores, cinco mantiveram a inibição contra o fungo isolado de sementes de milho com halos de inibição de aproximadamente 4 mm. E, apenas 3 dos sete selecionados, contra o fungo isolado de mudas de *Pinus*, porém com halos de inibição de 10, 6 e 2 milímetros para os isolados A93, A43 e A66, respectivamente. No entanto, em cinco dias de contato, seis isolados foram capazes de inibir este fungo (Figura 4). Em estudos semelhantes, Landa et al.(1997), Jiménez-Esquilín (2005) e Suárez-Estrella et al. (2007) analisaram a inibição do crescimento dos patógenos na presença de actinobactérias após dois e cinco dias, não determinando, entretanto, os isolados que mantêm essa inibição por mais de cinco dias. Como a formação dos metabólitos está integrada ao desenvolvimento de hifas e também à fase estacionária de crescimento (BIBB, 2005), a manutenção da inibição por período mais longo permite a identificação de microrganismos mais eficientes, e com um ciclo de crescimento maior. Permite ainda, a identificação de metabólitos secundários que se mantenham ativos no ambiente em um maior espaço de tempo.

Os isolados A43 e A93 se destacaram como bons inibidores para ambos os fungos testados, indicando uma capacidade potencial de inibição para o gênero *Fusarium*. Os dois isolados desses patógenos são de diferentes ambientes, o que sugere que se trata de duas espécies adaptadas a diferentes condições ambientais. Todavia, para o patógeno de sementes de milho, outros isolados (A64, A75 e PNA) também apresentaram inibição significativa. Desta forma, a utilização das actinobactérias não somente para o controle biológico em plantas, mas também para o controle de fungos em armazenagem de grãos, se torna uma possibilidade.

Utilizando metodologias semelhantes, Crawford et al. (1993) identificaram apenas uns poucos microrganismos com alta capacidade antifúngica. Ao testarem centenas de actinobactérias

quanto à capacidade de inibição do fungo patogênico de raiz *Pythium ultimum*, encontraram apenas quatro deles formando halos de até 20 mm durante as primeiras 96 horas. Taechowisan et al (2003), ao estudar a inibição de *Fusarium oxysporum* por várias actinobactérias endofíticas, após sete dias de incubação, encontraram percentagem de poucos formando halos de inibição: 1,5 % acima de 20, 5,4 % entre 10-20, 16 % entre 1-10 e 48 % abaixo de 1 mm. Ou seja, de 307 isolados menos de 20 apresentaram boa inibição. Desta forma, a chance de isolar actinobactérias com capacidade de formação de halos de inibição superiores a 20 mm é pequena, o que ressalta o fato de termos encontrado seis isolados antagônicos aos fungos testados.

Após, procurou-se identificar aqueles isolados que tivessem produção de substâncias inibitórias voláteis. Neste teste juntaram-se as bases das placas contendo os isolados de actinobactérias contra as bases das placas contendo o fungo (patógeno de Pinus), fechando uma contra a outra. Nenhum dos seis isolados foi capaz de inibir o fungo *Fusarium* patógeno de Pinus pela produção de compostos orgânicos voláteis (Figura 5). No entanto, foi verificado que estes isolados apresentaram produção de geosmina (*trans*-1,10-dimethyl-*trans*-9-decalol), composto volátil facilmente detectado pelo odor característico de “terra molhada”. Esta substância, apesar de não ter uma função bem conhecida, foi relacionada positivamente com a germinação de esporos de fungos micorrízicos, precisamente *Gigaspora margarita* (CARPENTER-BOGGS; LOYNACHAN; STAHL, 1995). O gênero *Streptomyces* é conhecido por produzir vários tipos de compostos orgânicos voláteis, como alcoóis, ésteres, cetonas, compostos de enxofre e de terpenos (SCHÖLLER et al., 2002). Algumas dessas substâncias produzidas já tiveram sua ação fungistática comprovada, o que determina, em conjunto com outros metabólitos secundários, o papel seletivo das actinobactérias na estrutura de comunidades microbianas do solo (HERRINGTON; CRAIG; SHERIDAN, 1985).

Figura 4 - Tamanho dos halos de inibição formados entre a colônia da actinobactéria e de *Fusarium spp* (A - patógeno isolado de Pinus e B – patógeno isolado de sementes de milho) após 72, 120, 168 e 240 horas de crescimento em meio de cultura ISP2 a 28 °C. As barras representam os erros padrões das médias (4 repetições). Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

Figura 5 - Tamanho das colônias de *Fusarium sp.* (Isolado de Pinus) após 3 e 5 dias de contato com colônias dos isolados de actinobactérias no sistema de placas invertidas. As barras representam os erros padrões das médias (4 repetições)

4.4 Teste de antagonismo ao fungo patogênico *Armillaria sp.*

Após ensaio de antagonismo aos *Fusarium spp*, dentre aqueles melhores inibidores foram selecionados os que possuíam efeito sobre outro fungo patogênico: *Armillaria sp.* Neste teste, os extratos produzidos pelos isolados de actinobactérias foram esterilizados por filtração e adicionados ao meio de cultura em que crescia o fungo, medindo-se o crescimento em mg/dia após 20 dias de incubação.

Dos seis isolados testados, cinco inibiram significativamente ($p=0,05$) o fungo *Armillaria sp.* após 20 dias de crescimento em meio líquido (Figura 6). O valor de pH dos filtrados dos isolados A43b, A43, A75, A93, PNA e A64 foi respectivamente 8,43; 8,46; 7,07; 7,57; 7,09 e 8,00. Após vinte dias, o pH do extrato no qual o fungo cresceu foi novamente medido sendo: 6,42; 6,47; 6,34; 7,1; 5,66; 7,26; 7,12 e 7,37 para os respectivos tratamentos BDA+ISP2, BDA, PNA, A93, A75, A64, A43b, A43 (figura 7). De acordo com Benton e Ehrlich (1941) os valores ótimos de pH para o crescimento desse fungo estão entre 4,5 e 5,0. Mesmo assim, em pH próximo a 6,5, o crescimento deste fungo em meio BDA foi de 6 mg/dia e em meio ISP2 + BDA de 10 mg/dia. Gomes, Auer e Grigoletti-Jr. (2002) encontraram crescimento máximo de 9,27 mg/dia a 20 ° C após 40 dias de incubação, resultados semelhantes ao presente trabalho em discussão.

É importante salientar que mesmo no tratamento A75, em que foi observado menor valor de pH, não houve crescimento do fungo *Armillaria sp.*, indicando efeito antagônico por algum metabólito secundário existente no extrato. No entanto, nos tratamentos A93, A64, A43 e A43b, os extratos apresentaram pH próximo a 7,0 e significativamente diferente do controle, o que pode ter mascarado o efeito antagônico dos metabólitos secundários. Dessa forma, testes em placa de petri foram feitos para avaliar de forma geral o efeito antagônico dos isolados de actinobactérias e para confirmar o efeito dos metabólitos ou do pH deste primeiro experimento. A ausência de trabalhos relacionando à inibição de *Armillaria sp.* por actinobactérias e a necessidade de novas metodologias de controle torna os microrganismos isolados neste trabalho como potenciais armas do controle biológico desse patógeno.

Figura 6 - Valores de crescimento do micélio e rizomorfos do fungo *Armillaria sp.* em extratos dos respectivos isolados após vinte dias de incubação a 22 ° C e do controle em BDA em sua composição normal e BDA + ISP2. As barras representam os erros padrões das médias (4 repetições)

Figura 7 - Valores de pH dos extratos após filtração do micélio e rizomorfos do fungo *Armillaria sp.* e do controle em BDA em sua composição normal e BDA + ISP2. As barras representam os erros padrões das médias (4 repetições)

4.4.1 Inibição *Armillaria sp.* em placa de petri

Devido ao crescimento lento e irregular do isolado de *Armillaria*, resolveu-se contar o número de rizomorfos formados em placa de petri. Este experimento foi feito com todos os isolados disponíveis para avaliar a percentagem daqueles capazes de inibir esse patógeno. Com isso, verificou-se que, dos vinte e oito isolados testados, vinte e quatro foram capazes de inibir o fungo e curiosamente quatro estimularam o desenvolvimento do fungo (Figura 8). Apesar de ter sido utilizada apenas uma linhagem de *Armillaria sp.*, verificou-se que grande parte das actinobactérias foram capazes de inibir este patógeno. Com isso, a utilização desses microrganismos contra fungos patogênicos de espécies arbóreas torna-se uma realidade que deve ser aprimorada.

Devido à boa quantidade de inibidores dessa espécie de fungo no solo, uma possibilidade de combater a *Armillaria* seria enriquecendo o solo para o plantio com substâncias que estimulem o desenvolvimento de actinobactérias. Assim, utiliza-se a própria riqueza de espécies do local sem, contudo, afetar a comunidade microbiana nativa com microrganismos introduzidos. Vale a pena destacar, que solos que possuem maior quantidade de actinobactérias, podem garantir a proteção e conseqüentemente a saúde das plantas (POLYANSKAYA et al., 2003). Já foi verificado também que solos enriquecidos com quitina podem favorecer o desenvolvimento de actinobactérias e proteger a planta contra patógenos como *Fusarium moniliforme* Sh (TOLEDO; CARDOSO, 1975).

Dessa forma, a manipulação do solo para favorecer o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos é possível. Porém, mais estudos são necessários neste caminho para avaliar sua eficiência no controle de doenças de espécies arbóreas de interesse ambiental e comercial. É importante salientar que dos isolados testados em meio líquido, apenas o A43, A43b, A75 e PNA foram capazes de inibir entre 90 a 100 % da produção de rizomorfos, indicando que o pH pode ter sido um fator importante na inibição do patógeno em meio líquido para os isolados A93 e A64, no experimento anterior. Porém, destaca-se que o isolado PNA não diferiu do controle quando testado seu efeito antagônico em meio líquido; possivelmente a produção de metabólito não tenha sido suficiente para inibir o patógeno. Assim, novos estudos, principalmente em campo e em casa de vegetação, são necessários para avaliar a potencial utilização desses microrganismos, em especial o isolado A43 que teve efeito antagônico aos

isolados de *Fusarium* quanto para o isolado de *Armillaria*. Vale lembrar que as actinobactérias que estimularam o desenvolvimento das rizomorfos também merecem destaque principalmente em relação a estudos de interação microbiológica no solo.

Figura 8 - Efeito, medido em percentagem, de 28 isolados de actinobactérias na inibição ou no estímulo da produção de rizomorfás pelo fungo *Armillaria sp.* em meio ISP2, a 25 °C, com quatro repetições

4.5 Identificação molecular dos principais isolados

O seqüenciamento parcial (aprox. 1400 pb) do gene 16S rRNA foi utilizado para a formação das três árvores filogenéticas Neighbor-joining , Minimum evolution e Maximum parcimony (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). É possível perceber a divisão entre dois grupos filogenéticos: Grupo 1, formado pelos isolados A64, PNA, A93 e A75 e Grupo 2, pelos isolados A43b e A43 (Figura 8). Destaca-se que aqueles que produzem quitinase e protease formaram o Grupo 1 e aqueles que não produzem nenhuma dessas enzimas formaram o Grupo 2. É importante salientar ainda que todos os isolados se alocaram dentro do gênero *Streptomyces*, sendo os isolados A43 e A43b os que tiveram, dentro dos três métodos (Neighbor-joining, Minimum evolution e Maximum parcimony), valores de bootstrap maiores que noventa e nove por cento de relação com a seqüência padrão da espécie *S. platensis* e bem próxima a *S. kasugaensis*.

Atualmente, são conhecidos dois antibióticos, “Platensimycin” e “platencin”, produzidos por várias linhagens de *S. platensis*, os quais inibem proteínas relacionadas à síntese de lipídeos em bactérias (WANG et al., 2006, 2007). Além disso, esta espécie produz outras substâncias que inibem fungos, como o antibiótico TAN-950A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES). Da mesma forma, a espécie *S. kasugaensis* produz um conhecido antibiótico (Kasugamicina) o qual é conhecido pela sua ação contra bactérias gram-negativas (LEVITAN, 1967).

O isolado A75 ficou próximo genotipicamente às espécies *S. setonensis* e *S. pulveraceus* nas três árvores filogenéticas criadas. No entanto, o isolado A93 não teve uma relação definida, variando sua posição filogenética nas árvores de Neighbor-joining , Minimum evolution (Figura 9 e 10) e Maximum parcimony (Figura 11). No Grupo 1 os isolados A64 e PNA, além de terem apresentado características morfológicas semelhantes (Figura 9, 10 e 11), foram agrupados como mais próximos filogeneticamente.

O gênero *Streptomyces* inclui o maior número de espécies e linhagens dentre as Actinobactérias. Portanto, a análise de homologia molecular se tornou uma forma de ajudar na identificação taxonômica, principalmente pelo uso de seqüências do gene 16S rRNA. Contudo, esta análise é insuficiente para classificar as espécies dentro do gênero *Streptomcyes* devido à grande complexidade deste táxon (ZHAO et al., 2006). Desse modo, outros métodos complementares, tais como caracterização morfológica, fisiológica e a estrutura química dos

ácidos diaminopimélicos na membrana, auxiliam na taxonomia, tornando a identificação mais precisa (PRAUSER et al., 1997).

Assim, pode-se concluir que apesar dos isolados formarem grupos distintos dentro do gênero *Streptomyces*, não é confiável a definição de espécies para os mesmos, sendo possível apenas garantir uma maior proximidade em relação às espécies já conhecidas. Aqueles isolados que não formaram uma relação concisa com nenhuma espécie conhecida como ocorreu no Grupo 2, sugerem a existência de novas espécies, porém, estudos complementares são necessários para tal afirmação.

Curiosamente, para os isolados que formaram o Grupo 2, houve para a inibição de ambos os isolados de *Fusarium* uma melhor resposta do isolado A43 em relação ao isolado A43b, embora identificados pela análise da árvore filogenética como pertencentes à mesma espécie. Segundo Bibb (2005), a produção dos metabólitos secundários é muito influenciada pelas condições do substrato e da fase de desenvolvimento de cada cultura. Portanto, existe uma grande variação dentro do grupo, mesmo sendo espécies próximas, o que explica a diferença de comportamento dos isolados A43 e A43b na inibição contra o fungo *Fusarium*.

Figura 9 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* spp. seguidos do grupo genotípico e número de acesso no GenBank. Construída pelo método de Neighbor-Joining, árvore consenso de bootstraps utilizando 1000 replicações no método Kimura 2-P

Figura 10 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* spp. seguidos do grupo genotípico e número de acesso no GenBank. Construída pelo método de Minimum Evolution, árvore consenso de bootstraps utilizando 1000 replicações pelo método Kimura 2-P

Figura 11 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* spp. seguidos do grupo genotípico e número de acesso no GenBank. Construída pelo método de Maximum Parsimony, árvore consenso de bootstraps utilizando 1000 replicações pelo método Kimura 2-P

4.6 Efeito dos principais isolados sobre o crescimento de *Pinus taeda* em casa de vegetação

No experimento em casa de vegetação, ao avaliar o efeito de diferentes isolados de *Streptomyces* spp. (A93, A75, A43, A43b, PNA e A64) com e/ou sem ectomicorriza (*Suillus brevipes*) sobre *Pinus taeda*, não foi observada significância estatística sobre altura e diâmetro da planta após três meses de experimento. Porém, verificou-se efeito significativo, pelo teste F, sobre a massa seca da parte aérea ($p < 0,05$) e sobre a massa seca da raiz ($p < 0,01$) (Tabela2).

Tabela 3 - Valores calculados do Teste F e coeficientes de variação (CV) para as variáveis analisadas, obtidas por delineamento inteiramente casualizado, em experimento em casa de vegetação com *Pinus taeda*, na presença ou ausência de ectomicorriza (*Suillus brevipes*) e actinobactérias (A93, A75, A43, A43b, PNA e A64)

Variáveis	Tratamentos	CV %
Diâmetro	1,46	26,53
Altura	1,49	16,17
Massa Seca Parte Aérea	2,24**	22,65
Massa Seca da Raiz	2,55***	24,38

*** significativo ($p < 0,01$) pelo Teste F; **significativo ($p < 0,05$) pelo Teste F

A análise do teste de média pelo método de Duncan ($p < 0,05$) para massa seca da parte aérea mostrou efeito do tratamento com o isolado A43 na ausência de micorriza quando comparado com o controle, também sem micorriza, indicando o efeito positivo deste isolado sobre o desenvolvimento da plântula. Porém, os isolados não tiveram efeito significativo quando na presença de ectomicorriza. No entanto, observa-se uma tendência de aumento da massa seca da parte aérea para estes tratamentos quando comparado aos sem ectomicorriza. A exceção fica ao tratamento com isolado A43 que teve efeito contrário ao observado para os outros isolados (Figura 12A). Este fato é importante, pois se verifica que os tratamentos com micorriza, mesmo recebendo metade da adubação de fósforo e nitrogênio, favoreceram o desenvolvimento da parte aérea das plântulas. Frisa-se, no entanto, que este aumento fica apenas para comparação empírica, pois não houve diferença estatística para o teste de médias.

Para massa seca da raiz verificou efeito semelhante ao encontrado na matéria seca da parte aérea. O tratamento com isolado A43, na ausência de ectomicorriza, teve efeito significativo sobre a massa seca da raiz quando comparado ao controle sem ectomicorriza, destacando-se que seu efeito sobre a raiz foi semelhante ao ocorrido na planta controle com ectomicorriza. Os tratamentos com isolados de *Streptomyces* na presença de ectomicorriza não diferiram significativamente do controle sem ectomicorriza. Mas, verificou-se que na presença dessa simbiose, a massa seca da raiz foi superior ao encontrado nos tratamentos ou no controle sem ectomicorriza para os isolados A93 e A75. (Figura 12B). Como já demonstrado por outros autores (SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2008; MAFIA et al., 2007; MERZAEVA; SHIROKIKH, 2006; POLYANSKAYA et al., 2003; TOKALA et al., 2002; FAYAD et al., 2001; GOMES et al., 2000), verificou-se que os estreptomicetos podem desempenhar papel importante sobre o crescimento das plântulas, seja criando um ambiente favorável ao desenvolvimento e absorção radicular seja por produzir metabólitos que estimulem o desenvolvimento das mesmas. Assim, no presente trabalho, verificou-se que estes microrganismos podem desenvolver um efeito benéfico sobre as plantas, o que as enquadraria como RPCP (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas) e, com isso, podem ser somados a outras técnicas de manejo garantindo a saúde das mudas e reduzindo os custos de produção e manejo.

A concentração de fósforo da parte aérea também nos indica um efeito positivo importante do isolado A43 sobre o desenvolvimento da planta. Porém, devido ao pouco material, a análise de fósforo foi feita juntando as repetições dentro de cada tratamento e, portanto, não foi possível fazer uma comparação estatística para as médias. Porém, é possível concluir que o tratamento com isolado A43 sem ectomicorriza teve o dobro de concentração de fósforo (1,3mg / planta) em relação ao encontrado no controle sem ectomicorriza (0,6 mg / planta) (Figura 13).

Os *Streptomyces* spp. são conhecidos pela sua capacidade de produzir antibióticos, sendo extremamente “territorialistas” (POLYANSKAYA et al., 2003) e, devido a este fato, inibem patógenos assim como outros fungos que por ventura podem atacar as plantas (CRAWFORD et al., 1993; YUAN; CRAWFORD, 1995; EL-TARABILY et al., 1997; GOMES et al., 2000; SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2008). Além disso, estudos recentes vêm demonstrando que estes microrganismos podem ainda ter efeito benéfico sobre o crescimento *in vitro* de ectomicorriza, como demonstrado por MAIER et al.,(2004). Apesar de não ter sido comprovado este fato no presente trabalho, observou-se que alguns isolados parecem não ter inibido o fungo

micorrízico, como os isolados A93 e A75, o que é corroborado pela composição de fósforo por planta e pela massa seca da raiz. Já o isolado A43 garantiu fósforo na planta na ausência de fungo, mas aparentemente inibiu a formação da simbiose micorrízica. Ainda podemos questionar que, se a inibição ocorreu, deveria ter ocorrido também aumento da concentração de fósforo, já que a bactéria iria “dominar” o ambiente. Porém, é possível que tenha ocorrido uma competição entre o fungo micorrízico e o isolado A43 pelo ambiente rizosférico ou pelo fósforo disponível no solo, acarretando uma imobilização e não disponibilização para a planta. Esta relação é bem discutida por Moreira e Siqueira (2006), sendo a imobilização e a mineralização eventos naturais do solo. O primeiro ocorre quando da alta atividade microbiana ou crescimento, sendo necessária a retirada dos nutrientes do solo; já o segundo, pela morte celular e redução da atividade microbiana que disponibiliza o fósforo ou os nutrientes no solo.

Figura 12 - Efeito da presença de actinobactéria (A93, A75, A43, A43b, PNA e A64) e ou ectomicorriza sobre a (A) massa seca da parte aérea e sobre (B) massa seca da raiz de *Pinus taeda* (médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Duncan. $P < 0.05$)

Figura 13 - Efeito da presença de actinobactéria (A93, A75, A43, A43b, PNA e A64) e ou ectomicorriza (*Suillus brevipes*) sobre a concentração de fósforo da parte aérea

4.7 Efeito dos metabólitos sobre a germinação de esporos de *Gigaspora rosea*

No teste de germinação do fungo micorrízico arbuscular foi utilizado o método de dupla camada de ágar, sendo a primeira e inferior com os isolados de *Streptomyces* spp. e a segunda, ou superior com os esporos de *Gigaspora rosea*. O controle utilizado foi meio ISP2 sem bactéria, recoberto por Ágar-água. Os seis isolados de *Streptomyces* spp., selecionados pela inibição ao *Fusarium* sp., foram capazes de estimular a germinação dos esporos de *Gigaspora rosea*. Em quatro dias de incubação não houve diferença entre os tratamentos, no entanto, em seis dias e onze dias, houve aumento significativo na germinação dos esporos, na presença de actinobactérias. Como o número de esporos germinados em cada dia é a somatória dos dias anteriores, para os isolados PNA e A64, não ocorreu germinação entre o sexto e o décimo primeiro dia (Figura 14).

Os isolados A75 e PNA, em 11 dias de contato, não mostraram diferença significativa quando comparados com o controle. Efeito semelhante sobre a germinação de esporos de fungos micorrízicos foi encontrado por Carpenter-Boggs, Loynachan e Stahl (1995), ao testarem a ação dos metabólitos voláteis de actinobactérias sobre a germinação de *Gigaspora margarita*, os quais observaram a germinação de 73 % dos esporos quando em contato com o metabólito volátil das actinobactérias, em detrimento de 23 % de germinação no controle, na ausência de metabólito volátil. No presente trabalho, não foi possível identificar se a substância que estimula os esporos é volátil ou não. Isto ocorreu principalmente devido à dificuldade de separá-los a partir de um experimento em placas de Petri. Contudo, as substâncias produzidas, apesar de inibirem os fungos patogênicos *Fusarium* sp. e *Armillaria* sp., estimularam a germinação de *Gigaspora rosea*. No entanto, o tubo germinativo não se desenvolve após a germinação. Apesar disso, novos experimentos são necessários para verificar o efeito dessas bactérias sobre a percentagem de

micorrização e sobre a estimulação da germinação dos esporos de fungos micorrízicos.

Figura 14 - Taxa de germinação do fungo micorrízico *Gigaspora rosea* na presença de metabólitos produzidos pelos isolados de *Streptomyces* spp. em placas de petri, incubadas no escuro e à temperatura ambiente. O controle foi meio de cultura ISP2 com uma camada de Ágar-água. As barras de mesma cor seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Os coeficientes de variação (%) são 36,82; 14,41 e 13,66 para os dias de incubação 4, 6 e 11, respectivamente

Figura 15 - Aspecto das raízes de *Pinus taeda*: (A) sem actinobactéria e sem ectomicorriza, (B) *Pinus taeda* mais Ectomicorriza (*Suillus brevipes*) e (C) *Pinus taeda* mais isolado A43

5 CONCLUSÕES

- A rizosfera de *Araucaria angustifolia* possui actinobactérias com potencial biotecnológico;
- Os isolados tiveram efeitos antagônicos aos fungos patogênicos testados e poderão futuramente ser utilizados como agentes de controle biológico;
- O isolado A43 atua como inibidor de fungos fitopatogênicos a partir de algum antibiótico ainda não identificado;
- Alguns isolados produzem enzimas de valor industrial como quitinase, protease e amilase;
- As actinobactérias podem estimular o desenvolvimento de plantas como observado em *Pinus taeda*;
- As actinobactérias são capazes de estimular a germinação de esporos de *Gigaspora rosea*, porém inibem o desenvolvimento do tubo germinativo.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, A.; KÄMPFER, P. Growth and morphological appearance of thermotolerant and thermophilic actinomycetes. **Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft**, Düsseldorf, v. 60 n. 4, p. 139-145, 2000.
- AMES, B.N. Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin-decomposing actinomycetes. **New Phytologist**, Oxford, v. 112, n. 3, p. 423-427, 1989.
- AUER, C.G. **Doenças em Pinus no Brasil**. Piracicaba: IPEF; 2000. 10 p. SÉRIE TÉCNICA. v. 13, n. 33, p. 67-74. Disponível em <<http://www.ipef.br/publicacoes/tecnica/nr33/cap07.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2008.
- AUER, C.G.; GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI Jr., A. **A armilariose em pinus no Brasil**. Colombo: EMBRAPA, 2004. 5 p. Comunicado técnico, 117. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/comuntec/edicoes/com_tec117.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2008.
- BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; ABUBAKER, J.; JUN, J.; ALLEN, J.W.; BROUILLETTE, J.; DOUDS, D.D.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 1-11, Mar. 2003.
- BAIS, P.H.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, June 2006.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.
- BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Cultivo da *Araucaria angustifolia***: análise de viabilidade econômico-financeira. Agência de Florianópolis. Gerência de Planejamento. Florianópolis: BRDE, 53 p. 2005. Disponível em: <<http://www.brde.com.br/>>. Acesso em: 18 Mar. 2008.
- BANIK R.M.; PRAKASH M. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, p. 135-140. 2004.
- BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCON, R.; AZCON-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.
- 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, n. 6, p. 396-402, 2000.

BENIZRI, E.; BAUDOUIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.

BENTON, V.L.; EHRLICH, J. Variation in culture of several isolates of *Armillaria mellea* from western white pine. **Phytopathology**, St Paul, v. 31, p. 803-811. 1941

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 1-26, 2005.

BERTIN, C.; YANG, X.H.; WESTON, L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 256, n. 1, p. 67-83., 2003.

BETTIOL, W.; AUER, C.G.; CAMARGO, L.E.A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* causada por *Cylindrocladium sp.* com *Bacillus sp.* In Reuniao sobre Controle Biologico de Doencas de Plantas, 1986, Piracicaba. **Anais...** Campinas : Fundação Cargill, 1986. 60 p.

BIBB M. J., Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 208-215, 2005.

Bracelpa – Associação Brasileira de Celulose e Papel, 2006. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/pdf/booklet/booklet_coletiva_dez07.pdf>. Acesso em: 04 Mar. 2008.

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J.E.F.. **Controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho por actinomicetos**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2003. 4 p. Comunicado Técnico 65 ISSN1679-0162. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/comuni65.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. 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 41-57.

CARPENTER-BOGGS, L.; LOYNACHAN, T.E.; STAHL, P.D. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 1445-1451, 1995.

CARRER, R.F. **Actinomicetos como agentes de bioncontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro**. 2002. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

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

CHATER, K.F.; HORINOUCI, S. Signalling early developmental events in two highly diverged Streptomyces species. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 9-15, 2003.

CHAUDHARY, A.; KHOKHAR, N. S.; ZAFAR, Y.; HAFIEZ, F. Actinomycetous root nodules in angiosperms of Pakistan. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 341-348, 1981.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 232-238, 2005.

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

CRAWFORD, D.L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1041-1045, 1978.

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, n. 11, p. 3899-3905, 1993.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes: some guidelines. In: WILLIAMS, S. T., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 2340-2343.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 3-19, 1990.

ELLIOT, M.A.; TALBOT, N.J. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 594-601, Oct. 2004.

EL-TARABILY K.A.; SOLIMAN M.H.; NASSAR A.H.; AL-HASSANI H.A.; SIVASITHAMPARAM K.; MCKENNA F.; HARDY G.E.ST.J. Biological control of *Sclerotinia* minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, p. 573-583. 2000.

EL-TARABILY, K.A.; HARDY, G.E.S.J.; SIVASITHAMPARAM, K.; HUSSEIN, A.M.; IPEK KURTBÖKE, D. The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. **New Phytologist**, Oxford, v. 137, n. 3, p. 495-507, 1997.

EMBRAPA. **Cultivo do pinheiro-do-paraná**. 2001. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-Parana/CultivodoPinheirodoParana/sistema/08_solos.htm. Acesso em: 21 jul. 2007.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA forest science**. Disponível em: <http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/Volume_1/pinus/taeda.htm>. Acesso em: 15 Fev. 2008.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FAN, W-M. T.; LANE, A.N.; SHENKER, M.; BARTLEY, J.P.; CROWLEY, D.; HIGASHI, R.M. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 209-221, 2001.

FARJON, A. *Araucaria angustifolia*. 2006. In: IUCN 2007. **Red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/search/details.php/32975/summ>>. Acesso em: 17 Mar. 2008.

FAYAD, K.P.; SIMÃO-BEAUNOIR, A.-M.; GAUTHIER, A.; LECLERC, C.; MAMADY, H.; BEAULIEU, C.; BRZEZINSKI, R. Purification and properties of a β -1,6-glucanase from *Streptomyces* sp. EF-14, an actinomycete antagonistic to *Phytophthora* spp. **Applied Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 57, p. 117-123, Oct. 2001.

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal - principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FRÄNDBERG E.; SCHNÜRER J. Antifungal activity of chitinolytic bacteria isolated from airtight stored cereal grain. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 121-127. 1988.

GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M. N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 3-16, 1997.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of technique for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, p. 489-500, 1980

GOLFARI, L. Coníferas aptas para repoblaciones florestales en el Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 6, p. 7-62, 1967.

GOMES, N.S.B.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI Jr., G. Crescimento *in vitro* de isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* sob várias temperaturas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, 2007.

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, n. 2, p. 146-150, 2000.

GOODFELLOW, M.M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, Oct. 1983. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>>. Acesso em: 16 Mar. 2008.

GRIGOLETTI Jr., A.; SANTOS, A.F. dos; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Colombo, v. 30, p. 155-165, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/viewFile/2362/1974>> . Acesso em: 15 mar. 2008.

GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIZ- JIMENEZ, C. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 115–122, 1999.

HAMDALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 12-19, 2008.

HAYASHI, H.; TAKIUCHI, K.; MURAO, S.; ARAJ, M. Identification of the microorganism which produces insecticidal indole alkaloids, okaramines A and B. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, n. 8, p. 2177-2178, 1991.

HERRINGTON P.R.; CRAIG J.T.; SHERIDAN J.E. Methyl vinyl ketone: a volatile fungistatic inhibitor from *Streptomyces griseoruber*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 5, p.509-512. 1987.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P. H. A.; STALE, J. T.; WILLIAMS, S.T. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787 p.

HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin ágar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 422-426, 1975.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo: Polígono. 1972. 466p.

JENSEN, P.R.; MINCER, T.J.; WILLIAMS, P.G.; FENICAL, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 87, n. 1, p. 43-48, 2005.

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 & Biotechnology**, Heidelberg, v. 32, p. 378–381. 2005.

KLEIN, D.A.; FREDERICK, B.A.; BIONDINI, M.; TRLICA, M.J. Rhizosphere microorganism effects on soluble amino acids, sugars and organic acids in the root zone of *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 110, n. 1, p. 19-25, 1988. Abstract.

KO, W.H.; WANG, I.T.; ANN, P.J. A simple method for detection of lipolytic microorganismos in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 597-599, 2005.

KRESGE, N.; SIMONI, R.D.; HILL, R.L. Selman Waksman: the Father of Antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 48, p. e7, 2004.

LANDA B. B.; HERVÁS A.; BETTIOL W.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Antagonistic Activity of Bacteria from the Chickpea Rhizosphere Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 25, n. 4, p. 305-318. 1997.

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Biology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 21, p. 71-100, Oct. 1967. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.21.100167.000443>>. Acesso em: 16 Mar. 2008.

LEE, J.L.; HWANG, B.K. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 407-417, May 2002.

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.

LEVITAN A. A. In Vitro Antibacterial Activity of Kasugamycin. **Applied Microbiology**, Washington, V. 15, N. 4, p. 750-753. 1967.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L. Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 813-821, 2007.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; VENTURA G.M.; SANFENTES, E.A.; Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 101-105, 2003.

MAIER, A.; RIEDLINGER, J.; FIEDLER, H.-P.; HAMPP, R. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi in dual culture. **Mycological Progress**, Berlin, v. 3, n. 2, p. 129-136, 2004.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: POTAFOS, 1989. 201p

MANN, J. Natural products as immunosuppressive agents. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, n. 4, p.417-430, 2001. Disponível em: <<http://www.rsc.org/ej/NP/2001/b001720p.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

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

MATTOS, J.R. **O Pinheiro brasileiro**. 2. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. 223 p.

Mc MAHON H.E.M.; KELLY C.T.; FOGARTY W.M. 1997. Effect of growth rate on α -amylase production by *Streptomyces* sp. IMD 2679. **Applied Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 48, p. 504-509.

MERZAEVA, O.V.; SHIROKIKH, I.G. Colonization of Plant Rhizosphere by Actinomycetes of Different Genera. **Microbiology**, New York, v. 75, n. 2, p. 226-230, 2006.

MIYADOH, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. **Actinomycetologica**, Tokyo, v. 7, n. 2, p. 100– 6, 1993.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORGAN, J.A.; BENDING, G.D.; WHITE, P.J. Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1729–1739, 2005

NEUMANN, G.; RÖMHELD, V. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In: PINTON R.; VARANINI Z.; NANNIPIERI Z. **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. New York: CRC Press, 2000. Chap. 2, p. 23-72. Disponível em: <<http://www.mykopat.slu.se/Newwebsite/kurser/SUMMER05/READING/Roemheld/NeumannRoemheld2.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

NGUYEN J.; FRANCOU F.; VIROLLE M-J.; GUÉRINEAU M. Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *regI*, a pleiotropic regulatory gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 20, p 6383–6390. 1997.

NOROVSUREN, Z.H.; OBOOTOV, G.V.; ZENOVA, G.M.; ALIEV, R.A.; ZVYAGINTSEV, D.G. Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes. **Biological Bulletin**, New York, v. 34, n. 4, p. 505-507, 2007.

OLIVEIRA, O. dos S. O. Fungos causadores de danos em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 4., 1980, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata, 1980. p. 147-152.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; SIMÕES-BENTO, J.M. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 635p.

POLYANSKAYA, L.M.; OZERSKAYA, S.M.; KOCHKINA, G.A.; IVANUSHKINA, N.E.; GOLOVCHENKO, A.V.; ZVYAGINTSEV, D.G. The Abundance and structure of the root-associated microbial complexes of two greenhouse rose cultivars. **Microbiology**, New York, v. 72, n. 4, p. 554–562, 2003.

PRAUSER H.; SCHUMANN P.; RAINEY F.A.; KROPPESTEDT R.M.; STACKEBRANDT E. *Terracoccus luteus* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from Soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 42, n. 4, p. 1218-1224. 1997.

PRISCU, J.C.; ADAMS, E.E.; LYONS, W.B.; VOYTEK, M.A.; MOGK, D.W.; BROWN, R.L.; MCKAY, C.P.; TAKACS, C.D.; WELCH, K.A.; WOLF, C.F.; KIRSHTEN, J.D.; AVCI, R. Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica. **Science**, New York, v 286, p. 2141–2144, Dec. 1999.

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.

REIS, V.M.; PAULA, M.A. de.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34 n. 10, p. 1933-1941, 1999.

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

SANQUETTA, C.R.; TETTO, A.F. **Pinheiro-do-paraná: lendas & realidades**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 2000. 112 p.

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.
SBS, 2006. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 16 Fev. 2008.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p.339-358, Sept. 1987.

SCHÖLLER C.E. G.; GÜRTLER H.; PEDERSEN R.; MOLIN S.; WILKINS K. 2002. Volatile metabolites from actinomycetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 2615-2621.

SCHREY, S.D.; SCHELLHAMMER, M.; ECKE, M.; HAMPP, R.; TARKKA, M.T. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **New Phytologist**, Oxford, v. 168, n. 1, p. 205–216, 2005.

SELYAN, V.V.; OBOROTOV, G.E.; ZENOVA, G.M.; ZVYAGINTSEV, D.G. Alkaliphilic soil actinomycetes. **Microbiology**, New York, v. 74, n. 6, p. 729-734, 2005.

SHEKHAR, N.; BHATTACHARYA, D.; KUMAR, D.; GULTA, K. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, n. 9, p. 805–808, 2006.

SHIMIZU, J.Y. Pinus na silvicultura brasileira. **Revista Madeira**, Curitiba, v. 16, n. 99, p. 4-14, 2004.

SHIMIZU, J.Y.; OLIVEIRA, Y.M.M. Distribution, variation and uses of Araucaria gene resources in southern Brazil. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 30, p. 287-90.1983.

SHIROKIKH, I.G.; SHIROKIKH, A.A.; RODINA, N.A.; POLYANSKAYA, L.M.; BURKANNOVA, O.A. Effects of soil acidity and aluminum on the structure of microbial biomass in the Rhizosphere of Barley. **Eurasian Soil Science**, New York, v. 37, n. 8, p. 839-843. 2004. Abstract.

SILVA, F.A.M. **Seleção de microrganismos com potencial de produção de compostos alelopáticos para controle de plantas daninhas**. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SILVA, J.C.M. da; COELHO, L. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* Person ex Fries, fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus sp.* em viveiros florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 27-36, 2003.

SILVA, R.F. da; ANTONIOLLI, Z.I.; ANDREAZZA R. Produção de mudas de *Pinus elliottii* ENGELM. micorrizadas em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p 57-65, Dez. 2003.

SOLÓRZANO FILHO, J. A. **Demografia, fenologia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucária 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.

SOUSA, C. da S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M. da S. Characterization of streptomycetes with potencial to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 1, p. 50-55, 2008.

STACKEBRANDT, E.; RAINEYF, A.; WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov.. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 2, p. 479–491, 1997.

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

SUÁREZ-ESTRELLA F.; VARGAS-GARCÍA C.; LÓPEZ M.J.; CAPEL C.; MORENO J. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, p. 46 – 53. 2007.

SUZUKI, K.; NAGAI, K.; SUZUKI, Y. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. **Actinomycetologica**, Tokyo, v. 8, n. 2, p. 122–127, 1994.

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.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 19, n. 4, p. 381–385, 2003.

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD (Japan). Takashi Iwasa; Shigetoshi Tsubotani; Setsuo Harada. **Antibiotic TAN-950A, its production and use EP19880303950**. 04 abr. 1988. 29 nov. 1988

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TANAKA, Y.T.; MURA, S.O. Agroactive compounds of microbial origin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 47, p. 57–87, Oct. 1993.

TOKALA, R.K.; STRAP, J.L.; JUNG, C.M.; CRAWFORD, D.L.; SALOVE, M.H.; DEOBALD, L.A.; BAILEY, J.F.; MORRA, M.J. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2161–2171, 2002.

TOLEDO A.C.D; CARDOSO, E.J.B.N. Effect of the natural soil microflora and soil supplementations on the biological control of “Bakanae” disease fo rice. **Summa Phytophatologica**, v. 1, n. 2, p. 81-86, 1975.

WANG J.; KODALI S.; LEE HO S.; GALGOCI A.; PAINTER R.; DORSO K.; RACINE F.; MOTYL M.; HERNANDEZ L.; TINNEY E.; COLLETTI S.L.; HERATH K.; CUMMINGS R.; SALAZAR O.; GONZÁLEZ I.; BASILIO A.; VICENTE F.; GENILLOU O.; PELAEZ F.; JAYASURIYA H.; YOUNG K.; CULLY D. F.; SINGH S.B. Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with *in vivo* antibiotic properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n.104, v.18, p. 7612-7616. 2007.

WANG, J.; SOISSON, S.M.; YOUNG, K.; SHOOP, W.; KODALI, S.; GALGOCI, A.; PAINTER, R.; PARTHASARATHY, G.; TANG, Y.; CUMMINGS, R.; HA, S.; DORSO, K.; MOTYL, M.; JAYASURIYA, H.; ONDEYKA, J.; HERATH, K.; ZHANG, C.; HERNANDEZ, L.; ALLOCO, J.; BASILIO, Á.; TORMO, J.R.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; COLWELL, L.; LEE, S.H.; MICHAEL, B.; FELCETTO, T.; GILL, C.; SILVER, L.L.; HERMES, J.; BARTIZAL, K.; BARRETT, J.; SCHMATZ, D.; BECKER, J.W.; CULLY, D.; SINGH, S.B. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. **Nature**, London, n. 441, p. 358- 361, 2006

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487–511, Mar. 2001.

WOOD, P.J. Specify in the interactions of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 271–287, 1980

YUAN, W.; CRAWFORD, D.L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a Potential Biocontrol Agent against Fungal Root and Seed Rots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 8, p. 3119–3128, 1995.

ZAKALYUKINA, YU. V.; ZENOVA, G.M.; ZVYAGINTSEV, D.G. Acidophilic soil actinomycetes. **Microbiology**, New York, v. 71, n. 3, p. 342-345, 2002.