

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUIZA ZARDIN MISSAU

AVALIAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS *Streptomyces* PARA O CONTROLE DO
FITOPATÓGENO *Sclerotinia sclerotiorum*

Porto Alegre

2022

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUIZA ZARDIN MISSAU

AVALIAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS *Streptomyces* PARA O CONTROLE DO
FITOPATÓGENO *Sclerotinia sclerotiorum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO VIEIRA ASTARITA

Porto Alegre

2022

Ficha Catalográfica

M678a Missau, Luiza Zardin

Avaliação de rizobactérias *Streptomyces* para o controle do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* / Luiza Zardin Missau. – 2022.

63 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita.

1. Controle Biológico. 2. Mofo Branco. 3. Actinobacteria. 4. Exsudatos. I. Astarita, Leandro Vieira. II. Título.

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

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita, pela orientação, incentivo e apoio na realização deste trabalho. Agradeço os preciosos ensinamentos profissionais e pessoais que tive durante estes anos de convivência.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Romanato Santarém, agradeço pelas inúmeras e importantes contribuições.

À amiga Luisa Ramos pela cumplicidade, companheirismo e milhões de mensagens trocadas ao longo desse período.

Ao estudante de Iniciação Científica Thiago Pianetti, pela ajuda e apoio ao longo desse período, foi de extrema importância.

Aos colegas de laboratório, muito obrigada pelos conselhos, e principalmente por auxiliarem a conduzir os experimentos em momentos que eu não podia estar no laboratório.

Ao Agrônoma - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, pelas doações de isolados, pelo apoio e por acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas de trabalho pelos conselhos e por serem ótimos ouvintes quando precisa desabafar.

À minha família, muito obrigada. A cada um, à sua maneira, peças fundamentais na minha existência. Sempre me incentivando, dando amor, lidando com as minhas inseguranças, sendo meu exemplo de perseverança, integridade, honestidade e humildade.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

A todas as pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador no mundo de uma das principais commodities mundiais – a soja. Há diversos fatores que podem prejudicar o potencial de rendimento da soja, entre os quais é possível destacar os danos causados por doenças fúngicas, como o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Este patógeno pode provocar perdas de até 80% na produtividade de uma lavoura. O manejo do mofo branco deve ser realizado através da adoção de várias medidas de controle que visam reduzir a taxa de incidência do mesmo. Dessa forma o controle biológico entra como uma alternativa ao uso de agroquímicos por manter o equilíbrio ecológico do ambiente. O gênero *Streptomyces*, pertence ao filo Actinobacteria, e possui grande potencial como agente de controle biológico de fitopatógenos devido a produção de compostos bioativos oriundos do seu metabolismo secundário, resultando em moléculas com diversidade química e ação biológica variada, como antibióticos, anti-inflamatórios, além da produção de vitaminas e enzimas, as quais interferem no ciclo celular de fungos. Pretendeu-se neste trabalho avaliar quatro isolados (CLV16, CLV100, CLV103 e CLV115) do gênero *Streptomyces* para controlar o fungo *S. sclerotiorum*. Os resultados mostram que os isolados são eficientes em inibir o crescimento do fitopatógeno, ocorrendo a redução no crescimento em 60% (CLV16), 53,2% (CLV103), 30,4% (CLV100) e 31,7% (CLV115). Os resultados indicam que a inibição promovida pelos CLVs não pode ser atribuída a presença de compostos orgânicos voláteis ($P=0,18$). O crescimento do fungo *S. sclerotiorum* não foi inibido pelos exsudatos extraídos de culturas líquidas e sólidas de *Streptomyces*. A ausência de atividade antimicrobiana nos exsudatos dos CLVs sugere que os compostos inibidores podem ser instáveis e terem sido degradados no processo de obtenção das frações semi-purificadas. Análises dos exsudatos produzidos pelos CLVs cultivados em meio sólido indicaram que o CLV16 possuía os maiores níveis de proteínas solúveis. Não foram detectadas proteínas nos CLV100 e CLV103. Os CLVs produzem mais fenazinas quando cultivados em meio sólido, destacando-se o CLV16 como o mais produtivo. Os CLVs produziram fenazinas com reconhecida capacidade antimicrobiana. Contudo, os exsudatos com estas moléculas não foram eficientes no controle de *S. sclerotiorum*. Os CLVs produziram compostos indólicos relacionados a síntese de auxina (AIA). O AIC (Indole-3-carboxylic acid) foi produzido em todas as condições de cultivo (líquido e sólido) e por todos os isolados. O isolado CLV103 apresentou os menores níveis de síntese de compostos indólicos no meio líquido. Não foi possível determinar o mecanismo utilizado pelas CLVs na inibição de *S. sclerotiorum*. Contudo, sugere-se que esta inibição possa ocorrer de forma indireta, através de competição por nutrientes. Possivelmente devido a síntese de sideróforos. São necessários experimentos

adicionais visando determinar o mecanismo pelo qual os CLVs inibem o crescimento de *S. sclerotiorum*.

Palavras-chaves: Controle Biológico, Mofo Branco, Actinobacteria, Exsudatos.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer and exporter in the world of one of the main world commodities – soybean. There are several factors that can impair the yield potential of soybeans, among which it is possible to highlight the damage caused by fungal diseases, such as white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). This pathogen can cause losses of up to 80% in the productivity of a crop. The management of white mold must be carried out through the adoption of several control measures aimed at reducing its incidence rate. In this way, biological control comes as an alternative to the use of agrochemicals for maintaining the ecological balance of the environment. The genus *Streptomyces*, belongs to the Actinobacteria phylum, and has great potential as a biological control agent for phytopathogens due to the production of bioactive compounds from its secondary metabolism, resulting in molecules with chemical diversity and varied biological action, such as antibiotics, anti-inflammatory drugs, in addition to production of vitamins and enzymes, which interfere with the fungal cell cycle. The aim of this work was to evaluate four isolates (CLV16, CLV100, CLV103 and CLV115) of the genus *Streptomyces* to control the fungus *S. sclerotiorum*. The results show that the isolates are efficient in inhibiting the growth of the phytopathogen, with a reduction in growth of 60% (CLV16), 53.2% (CLV103), 30.4% (CLV100) and 31.7% (CLV115). CLV results cannot be attributed to the presence of organic volatiles ($P=0.18$). The growth of the fungus *S. sclerotiorum* was not inhibited by exudates extracted from liquid and solid cultures of *Streptomyces*. The absence of antimicrobial activity in CLV exudates suggests that the inhibitors may be unstable and degraded in the process of obtaining semi-purified fractions. Analysis of exudates, CLVs cultured in solid medium indicate that CLV16 had the highest levels of soluble proteins. No proteins were identified in CLV103. The CLVs are stronger when cultivated in solid medium, highlighting the CLV16 as the most productive. CLVs produce phenazines that recognized antimicrobial capacity. However, there was no control. CLVs produce indole compounds related to auxin synthesis (IAA). ICA (Indole-3-carboxylic acid) was produced under all culture conditions (liquid and solid) and by all isolates. The isolate CLV103 showed the lowest levels of synthesis of indole compounds in the liquid medium. It was not possible to determine the mechanism used by CLVs in the inhibition of *S. sclerotiorum*. It is suggested that this may occur indirectly, through competition for nutrients. Possibly due to a synthesis of siderophores. Additional experiments are required to determine the mechanism by which CLVs inhibit the growth of *S. sclerotiorum*.

Key words: Biological Control, White Mold, Actinobacteria, Exudates.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 9 |
| 1.1 Soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) | 9 |
| 1.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Mofo-branco) | 10 |
| 1.3 Controle Biológico | 12 |
| 1.4 <i>Streptomyces</i> | 14 |
| 1.5 Metabólitos Secundários | 16 |
| 2. Justificativa | 20 |
| 3. Hipóteses..... | 21 |
| 4. Objetivos | 21 |
| 4.1 Objetivo Geral | 21 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 21 |
| Referências:..... | 22 |
| CAPÍTULO II - Artigo | 28 |
| 1. Introdução | 28 |
| 2. Metodologia | 31 |
| 2.1 Cultivo dos Microrganismos | 31 |
| 2.2 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> | 31 |
| 2.3 Ensaio de antagonismo de Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs)..... | 32 |
| 2.4 Extração de exsudatos de <i>Streptomyces</i> | 32 |
| 2.5 Atividade antimicrobiana de exsudatos de <i>Streptomyces</i> | 33 |
| 2.6 Determinação de fenazinas em <i>Streptomyces</i> | 34 |
| 2.7 Determinação de compostos indólicos em <i>Streptomyces</i> | 34 |
| 2.8 Identificação e análise filogenética dos isolados de <i>Streptomyces</i> | 34 |
| 2.9 Análise Estatística..... | 35 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 36 |
| 3.1 Caracterização dos isolados de <i>Streptomyces</i> | 36 |
| 3.2 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.3 Ensaio de antagonismo de Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs)..... | 43 |
| 3.4 Atividade antimicrobiana de exsudatos de <i>Streptomyces</i> | 43 |
| 3.5 Determinação de fenazinas em <i>Streptomyces</i> | 46 |
| 3.6 Determinação de compostos indólicos em <i>Streptomyces</i> | 50 |
| Referências:..... | 55 |
| CAPÍTULO III | 63 |
| 1. Conclusões..... | 63 |
| 2. Perspectivas..... | 64 |

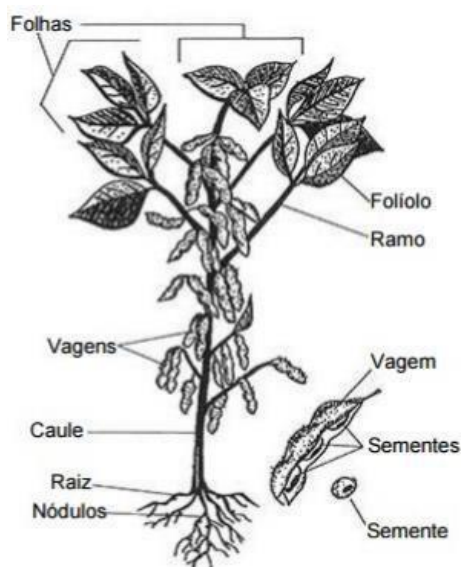
CAPÍTULO I

1. Introdução

1.1 Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

Glycine max, conhecida popularmente como soja, pertence à família Leguminosae, a subfamília Papilionoidae e ao gênero *Glycine* (Miyasaka & Medina, 1981). A soja é uma planta anual, herbácea, ereta, que apresenta variações em relação às características morfológicas das cultivares (Figura 1). Fatores como o fotoperíodo e a temperatura são determinantes para o desenvolvimento da soja, exercendo influência sobre o número de primórdios reprodutivos e a taxa de desenvolvimento, com reflexos sobre a estatura da planta, o ciclo e o potencial de produtividade da cultura (Braccini et al., 2004; Jiang et al., 2011; Rodrigues et al., 2006). Quanto ao ciclo, pode variar de 75 a 200 dias, sendo que plantios tardios, bem como os precoces, normalmente originam plantas com porte mais baixo do que na época considerada ideal de plantio (Sediyama, 2009).

Figura 1 - Morfologia da planta de soja.



Fonte: (Souza Neto, 2015)

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de soja (CONAB, 2021). A produção brasileira de soja em 2021/22 deverá totalizar 122,3 milhões de toneladas, com recuo de 11,4%

sobre a safra da temporada anterior, que ficou em 138,1 milhões de toneladas, devido aos problemas climáticos ocorridos principalmente no Sul e em Mato Grosso do Sul. Apesar da redução da produtividade nesta safra, a área semeada alcançou os 40.988,5 milhões de hectares, aumento de 4,6% em relação à safra passada (CONAB, 2022). Com isso vários desafios devem ser vencidos para melhorar a produtividade, principalmente aqueles relacionados a doenças fúngicas, como o manejo do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Este patógeno pode provocar perdas de até 80% na produtividade de uma lavoura (Xia et al., 2020).

1.2 *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo-branco)

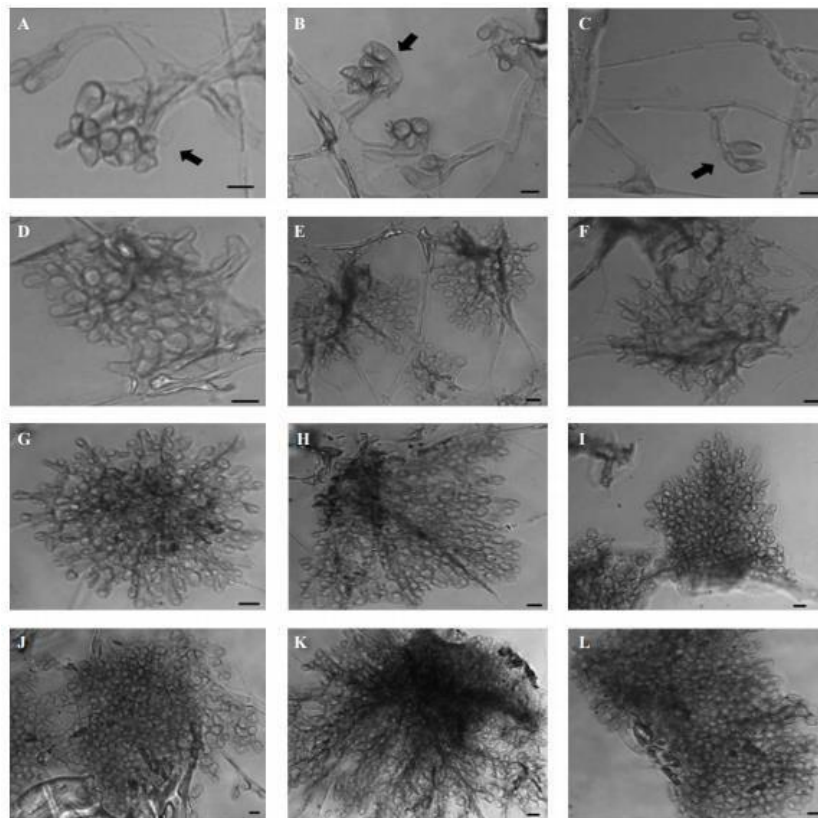
A doença mofo-branco é causada por um fungo pertencente ao filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerontiaceae e ao gênero e espécie *Sclerotinia sclerotiorum* (Cassetari et al., 2010). Além de mofo branco, esta doença recebe outras denominações populares como podridão branca da haste ou esclerocinose (Reis et al., 2011). *S. sclerotiorum* afeta mais de 400 espécies vegetais, entre elas: soja, girassol, canola, ervilha, feijão, alfafa, fumo, tomate e batata (Leite, 2005). Este fitopatógeno possui micélio hialino, septado e ramificado (Figura 2), formando uma massa em forma de algodão na superfície dos órgãos atacados (Abawi, 1979; Purdy, 1979). A partir deste micélio são formados os escleródios (Hartman et al., 1999) tanto na superfície quanto no interior da haste da planta (Kimati et al., 2005) (Figura 3). Os escleródios representam estruturas de resistência do patógeno, permanecendo viáveis no solo por longos períodos, garantindo sua sobrevivência (Figura 4).

A doença causada por *S. sclerotiorum* se caracteriza por manchas amarelas que progridem para uma coloração castanho clara e em seguida, ocorre a formação de micélio-branco e denso (Figura 3), o qual origina os escleródios (Canteri et al., 1999). O sintoma de podridão branca da haste, o qual confere nome a doença, é caracterizado pela degradação da medula do vegetal resultando em um aspecto murcho e seco (Cassetari et al., 2010). Dependendo da extensão dos sintomas a planta pode amarelecer e morrer (Canteri et al., 1999).

O primeiro relato do patógeno no Brasil ocorreu em 1921, na cultura da batata, em São Paulo e, posteriormente, em outros estados em diferentes hospedeiros (Chaves, 1964). Na cultura da soja, o primeiro caso descrito de epidemia do mofo-branco foi em 1976 no Paraná (Henning, 2004). A doença desenvolve-se numa faixa de temperatura entre 5-30°C, principalmente ao redor dos 25°C, condições encontradas nas regiões sul, sudeste e em áreas elevadas do centro oeste e nordeste, onde ocorrem temperaturas noturnas mais baixas (Cassetari et al., 2010). Atualmente, o mofo branco é considerado uma doença emergente, de

grande interesse econômico, principalmente em culturas de soja, pois ocasiona perdas de até 80% na produtividade, dessa forma causando extensos prejuízos econômicos e ambientais (Meyer, 2019).

Figura 2 - Formação de estruturas microscópicas observadas durante a formação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* após sete dias de crescimento do fungo *in vitro*. Ramificação das hifas, apontado pelas setas (A-C); Ramificação profusa de hifas (D-F); Agrupamento de hifas (G-I); Agrupamento massivo de hifas que formam escleródios no processo inicial (J-L).



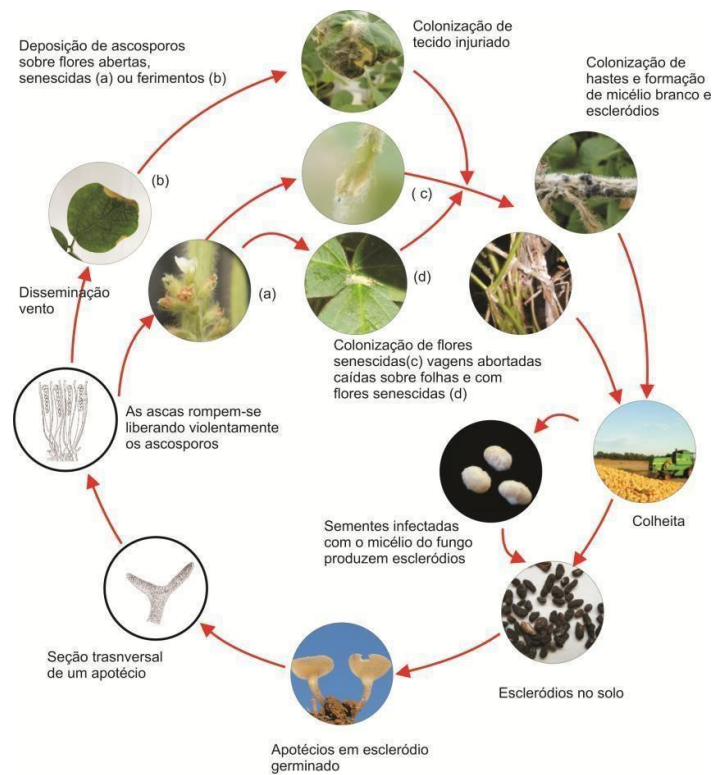
Fonte: (Ordóñez-Valencia et al., 2018)

Figura 3 - Micélios do fungo atacando vagens e hastes das plantas de soja.



Fonte: Mariana Harumi Sukessada Fujivara (Alencar Julio, 2019).

Figura 4 - Ciclo do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (*Glycine max*).



Fonte: (Brustolin, 2012)

1.3 Controle Biológico

O controle biológico é um processo natural que combina fatores bióticos e abióticos, com o intuito de regular uma espécie dentro de certos limites e durante um intervalo de tempo (Diehl et al., 2012). Estratégias de controle biológico no Brasil estão crescendo, mas o progresso

é lento devido à falta de produtos biológicos no mercado. Em uma pesquisa recente, foi constatado que dos 109 produtos biológicos vendidos mundialmente para o controle de doenças de plantas, 87 (80%) são recomendados para o controle de fungos. Dos 87 produtos, 52% (45 produtos) são recomendados para patógenos de solo, 28% (24 produtos) para patógenos associados à parte aérea ou pós-colheita e 20% (18 produtos) para patógenos da parte aérea e de solo. O controle biológico de fitopatógenos de solo pode ocorrer pela introdução de antagonistas diretamente no ambiente ou em estruturas de propagação das plantas (Bettiol & Morandi, 2009).

Frequentemente, as culturas agrícolas no Brasil são acometidas por inúmeras doenças de origem bacteriana, fúngica, viral ou causadas por nematoides. Essas doenças provocam reduções na produção agrícola, podendo ocasionar a perda total de lavouras, levando a prejuízos econômicos aos produtores. Patologias causadas por fungos são as que mais necessitam de atenção, causando doenças desde o início até o final do cultivo. O controle fúngico, através do antagonismo, pode ser exercido por bactérias através da síntese de sideróforos, competição por nutrientes ou espaço, bem como pela produção e liberação no ambiente de enzimas hidrolíticas ou outras substâncias antimicrobianas (Gerhardson, 2002). As actinobactérias apresentam um destacado potencial para o controle de fungos fitopatogênicos, podendo ser utilizado para auxiliar no controle químico de patógenos, como no caso de *Actinoplanes campanulatus*, *Micromonospora chalcone* e *Streptomyces spiralis* no controle do patógeno *Pythium aphanidermatum* (El-Tarabily et al., 2009). Outros estudos demonstraram que a linhagem de actinobactéria, *Streptomyces* CMAA 1647, inibiu o desenvolvimento do fungo *Pyricularia grisea* (Ventura et al., 2018), assim como *Streptomyces setonii* inibiu a germinação de conídios dos fungos *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium solani* (Carrer Filho et al., 2009). Além disso foi constatado que fungos do gênero *Trichoderma* (*T. koningiopsis* e *T. asperellum*) também são utilizados em controles biológicos no combate a outros fungos (*S. sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* e *F. proliferatum*) (Milanesi et al., 2013).

No campo da Biotecnologia, os Actinomicetos, especialmente espécies do gênero *Streptomyces*, produzem mais de 70% dos antibióticos utilizados comercialmente (Bérdy, 2005), o que confere grande potencial dessas bactérias como fonte de metabólitos de interesse industrial, particularmente de antibióticos (Mansour, 2003). Devido a estas características, este gênero possui grande potencial como agente de biocontrole agrícola (Crawford et al., 1993; Jiménez-Esquilín & Roane, 2005; Lehr et al., 2007), como a *Streptomyces* sp. cepa 5406 (*S. jingyangensis*), utilizada há mais de 30 anos para proteger lavouras de algodão contra os patógenos *R. solani* e *V. alboatrum* (Sterling, 1989). Atualmente, alguns produtos para o

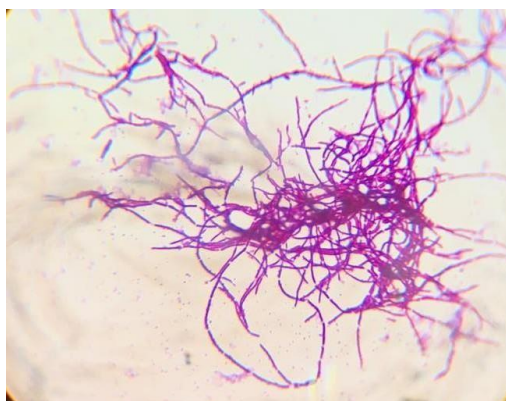
biocontrole de doenças de plantas estão disponíveis comercialmente, como Actinovate e o Mycostop, os quais utilizam moléculas naturais com ação herbicida e fungicida, derivadas de *Streptomyces*. Estes produtos apresentam amplo espectro de alvos fúngicos como *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytium*, entre outros. Produtos comerciais utilizando fungos do gênero *Trichoderma spp.* também são comercializados como, Agroguard WG, elaborado com *Trichoderma harzianum*, no controle de *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* e *Phoma* em diversas culturas; e o Bio-cure-F à base de *Trichoderma viride* indicado para manejo de *Pythium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia homoeocarpa* e *Ustilago tritici* (Bettiol et al., 2012).

O uso de defensivos agrícolas vem aumentando como consequência do incremento da produtividade agrícola, tanto para consumo humano quanto para animal (Alves, 2002). Paralelamente a isto, muitos patógenos fúngicos vêm adquirindo resistência a vários agroquímicos comerciais (Hahn, 2014). Novas estratégias para o manejo de lavouras têm sido utilizadas, empregando microrganismos no controle biológico (Parra, 2014). O uso de microrganismos para o controle natural de doenças pode substituir parcialmente o emprego de produtos químicos, colaborando para a sustentabilidade nos ecossistemas agrícolas (Guimarães, 2007).

1.4 *Streptomyces*

A classe Actinomycetia é um dos maiores grupos taxonômicos atualmente reconhecidos dentro do Domínio Bacteria. Dentre os inúmeros gêneros da ordem *Streptomyetales* que pertencem à classe Actinomycetia, encontra-se o gênero *Streptomyces*. Estas actinobactérias são Gram positivas, filamentosas (Figura 5), aeróbias, apresentam grande parte do conteúdo genômico composto por guanina e citosina, e crescem em pH neutro ou mediantemente alcalino. Entretanto, algumas cepas podem crescer em pH ácido (3,5) ou muito alcalino (8,0 a 11,5) (Salamoni, 2009; Schrempf, 1999). Outra característica importante do gênero *Streptomyces* é a capacidade de degradar adenina, esculina, caseína, gelatina, hipoxantina, amido, e L – tirosina (Smaoui et al., 2011). Algumas espécies deste gênero são classificadas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) devido principalmente à produção de hormônios, como a auxina (ácido indol-3-acético, AIA) (Salla et al., 2014), síntese de proteases extracelulares, antibióticos (Palaniyandi et al., 2013), compostos orgânicos voláteis (VOC) (Li et al., 2012), e sideróforos.

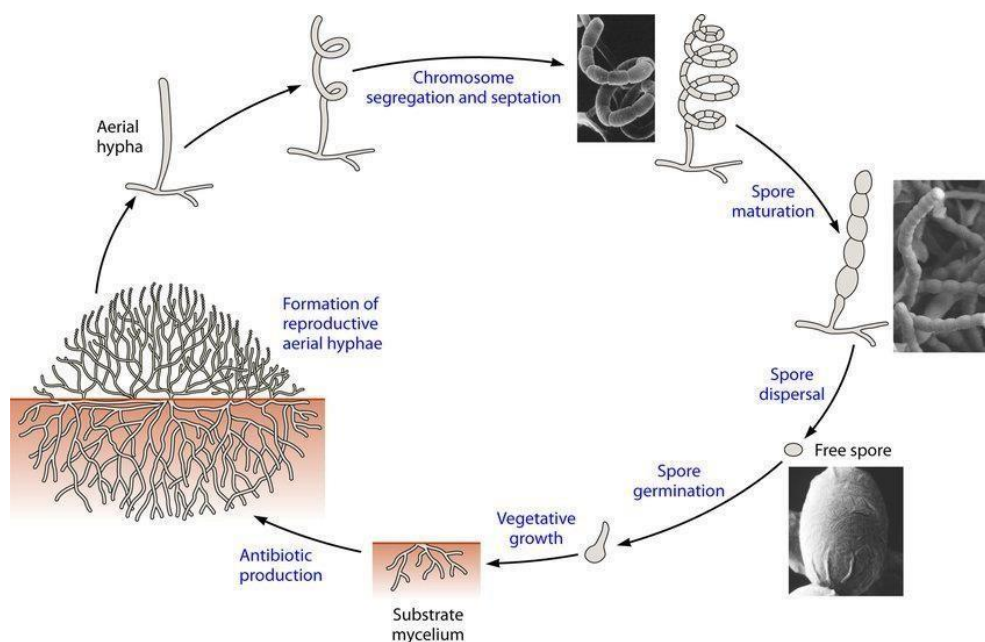
Figura 5 - Aspecto geral de *Streptomyces*. Hifas de *Streptomyces*.



Fonte: Luísa Ramos (2020).

Quando cultivados em condições adequadas, o ciclo de vida de *Streptomyces* inicia com a germinação do esporo, seguido do crescimento apical do tubo germinativo que se ramifica, dando origem ao micélio vegetativo (hifas), fortemente aderido ao substrato sólido. Estas estruturas, através de processos de diferenciação celular, dividem-se para formar esporos e assim originam o micélio aéreo. Nesta etapa do ciclo de vida (fase estacionária) geralmente é quando se ativam as vias metabólicas associadas a produção de metabólitos secundários (Figura 6) (Chandra & Chater, 2014; Hopwood, 2006). Estas bactérias filamentosas constituem 10% da microbiota do solo, sendo amplamente distribuídas devido ao hábito saprofítico e a habilidade de colonizar raízes de plantas (Tarkka et al., 2008). Graças à diversidade de metabólitos produzidos pelas actinobactérias, esses microrganismos são capazes de inibir o crescimento de patógenos utilizando simultaneamente diferentes moléculas, sem promover o desenvolvimento de uma resistência específica (Roberts & Crawford, 2000).

Figura 6 - Ciclo de vida de *Streptomyces*.



Fonte: (Barka et al., 2016).

1.5 Metabólitos Secundários

Actinobactérias, especialmente as do gênero *Streptomyces*, podem promover o crescimento e induzir a defesa vegetal, através da síntese de metabólitos secundários, como o hormônio auxina, antibióticos e enzimas (Palacios et al., 2014). A produção destes metabólitos secundários, em particular os antibióticos, ocorre após a fase exponencial de crescimento celular ou durante a fase estacionária (fase de escassez de nutrientes no meio de cultura), pois esses compostos não são essenciais ao crescimento do microrganismo (Yu et al., 1999). Um processo interessante relativo à produção de antibióticos é a simbiose entre plantas e *Streptomyces*, visto que o antibiótico auxilia na proteção da planta contra patógenos, e a planta disponibiliza exsudatos para o crescimento de *Streptomyces*.

As fenazinas são compostos heterocíclicos nitrogenados, com síntese mediada pela via do corimato, e tendo como produto final a fenazina 1-ácido carboxílico (PCA) e a fenazina 1,6-ácido dicarboxílico (PDC), que darão origem a uma vasta diversidade de outras fenazinas (Figura 7) (Seeger et al., 2011). Estes compostos possuem propriedades de oxidação-redução e desempenham um importante papel em vários processos fisiológicos nas bactérias, incluindo a formação de biofilme e a redução de ferro (Biessy & Filion, 2018). Sabe-se que dentro da mesma espécie pode haver variações na síntese de fenazinas devido a alterações ambientais, nutricionais e populacionais, indicando uma sensibilidade a variações ambientais e dos tipos de

hospedeiros (Pierson & Pierson, 2010). Estudos demonstram que quantidades consideráveis destas substâncias são excretadas durante o processo controlado de crescimento bacteriano em biorreatores, viabilizando a produção comercial destas moléculas com atividade antimicrobiana (Van Dissel et al., 2014).

Atualmente, os antibióticos fenazinas mais pesquisados em bactérias são: piroluteorina, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol e fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), pois bactérias produtoras desses antibióticos apresentaram características supressivas contra patógenos (Bagnasco et al., 1998; Mavrodi et al., 2007). Entre os microrganismos que produzem fenazinas, com uma ampla atividade antimicrobiana, destacam-se as bactérias *Pseudomonas spp.*, *Streptomyces spp.*, *Pelagibacter variabilis*, *Pantoea agglomerans*, e *Vibrio sp.* (Abdelfattah et al., 2010).

Figura 7 – Estrutura química da fenazina 1-ácido carboxílico (PCA) e da fenazina 1,6-ácido dicarboxílico (PDC).



Fonte: (Mentel et al., 2009).

Além dos antibióticos, a produção do hormônio auxina (AIA) por rizobactérias é uma característica de extrema importância por estar relacionado a muitos processos de desenvolvimento vegetal. O aumento de AIA na rizosfera promove o alongamento da raiz, que amplia a superfície de contato da raiz com o solo, e dessa forma aumenta indiretamente a capacidade de absorção de minerais e de exsudação (Ahemad & Kibret, 2014). O AIA produzido por bactérias dos gêneros *Azospirillum spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium spp.* e *Bradyrhizobium spp.* beneficia o crescimento vegetal (Patten & Glick, 1996). Entretanto, estudos recentes relacionam negativamente o hormônio auxina com a resistência a patógenos, devido ao grande nível de interações entre as auxinas e as diversas rotas de sinalização hormonal, como o ácido salicílico, o jasmonato e o etileno (Deganello, 2012). A sinalização por auxinas pode contribuir para a infecção em virtude de seu efeito de afrouxamento da parede celular e pela abertura dos

estômatos, dessa forma colaborando para entrada de patógenos, ou ainda, pela inibição da sinalização de defesa do salicilato (Fu et al., 2015). Pesquisas demonstram que perturbações nos níveis de auxina são consideradas frequentes estratégias de virulência entre vários patógenos como *Alternaria*, *Fusarium*, *Plasmodiophora*, *Colletotrichum*, *Lentinus* e *Sclerotium* (Tsavkelova et al., 2006). Desta forma, as interações bactéria-raiz modificam o crescimento e a capacidade adaptativa das plantas em condições de estresse.

Os sideróforos são metabólitos secundários que têm como função se ligar ao Fe(III), em condições de baixo ferro livre (Neilands, 1995). Diferentes tipos de microrganismos sintetizam sideróforos como: bactérias entéricas; bactérias patogênicas de humanos, animais, fungos e de plantas; microrganismos do solo; espécies Gram-positivas e negativas; cianobactérias e algas superiores; bactérias fixadoras de nitrogênio; alguns tipos de leveduras (Benite et al., 2002). O ferro é fundamental para o desenvolvimento da planta, sendo parte da enzima nitrogenase, e dessa forma contribuindo para o controle da quantidade de oxigênio dentro dos nódulos contaminados pela bactéria. As bactérias produzem metabólitos secundários que conseguem se ligar ao Fe e transportá-lo para dentro da célula, como uma estratégia para obter ferro (Patriarca et al., 2002). Sabe-se que algumas espécies do gênero *Pseudomonas*, produtoras de sideróforos quelantes de ferro na rizosfera, são capazes de inibir o desenvolvimento de alguns microrganismos fitopatogênicos que dependem do ferro para sua sobrevivência (Hohnadel et al., 1988).

Já as quitinases, enzimas capazes de degradar a quitina, um biopolímero de N-acetil-β-D-glucosamina bastante insolúvel, são de grande interesse biotecnológico. Várias pesquisas relatam a potencial utilização biotecnológica das quitinases na agricultura, visto que são microrganismos que podem atuarem no controle de fitopatógenos como fungos e nematoides pois muitos deles possuem quitina na sua estrutura (Campanhola e Bettiol, 2003). Alguns dos principais microrganismos produtores de quitinases incluem *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Streptomyces spp.* (Ueno et al., 1990), *Cellulomonas flavigena* (Chen et al., 1997) e *Enterobacter sp G-1* (Matsuo et al., 1999). Um estudo realizado com o extrato bruto de quitinase coletado de *Streptomyces griseus* foi eficaz para inibição de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternate*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e dois isolados de *Aspergillus flavus* (Anitha e Rabeeth, 2010).

As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) quando colonizam o sistema radicular de plantas são capazes de induzir a resistência contra fitopatógenos, como fungos, bactérias, nematoides e insetos. Isso ocorre devido a síntese de moléculas bacterianas que atuam como eliciadores. Esses eliciadores acionam os mecanismos de defesa da planta, induzindo a resistência sistêmica (Barbosa, 2009). Os principais sinais endógenos que instigam

a respostas de defesa nas plantas são o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e o etileno (Bernardes, 2006). Sabe-se que ao utilizar uma PGPR como agente de controle biológico, aspergindo-a na rizosfera, ocorre o controle de doenças da parte aérea deixando toda a planta mais resistente a patógenos. Como exemplos temos um estudo realizado em *Arabidopsis*, utilizando a estirpe não patogênica da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* WCS41r como agente indutor (Pieterse et al., 1996).

2. Justificativa

No Brasil, a soja é uma das principais *commodities* do agronegócio, sendo o maior produtor e exportador global deste produto agrícola (CONAB, 2021). Embora sejam grandes os avanços tecnológicos no setor agrícola, o controle de muitas pragas como plantas invasoras, insetos e fitopatógenos, continuam representando enormes desafios para a agricultura. Neste cenário os agroquímicos se destacam como importantes ferramentas para garantir a produção de grãos, controlando diversos patógenos. Contudo, o uso excessivo desses produtos pode causar sérios problemas a saúde humana e impactos ecológicos (Magali et al., 2008). Dessa forma, o controle biológico se enquadra como uma alternativa agroecológica para o manejo de fitopatógenos, principalmente de fungos patogênicos, reduzindo o uso de agentes químicos de controle. Existe uma ampla diversidade de microrganismos nativos associados a plantas que apresentam graus diferentes de antagonismo com microrganismos patogênicos, podendo ser utilizados no controle biológico (Silva, 2016). Neste contexto, as actinobactérias, em particular pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentam grande potencial como agentes de controle de doenças em plantas, devido a produção de inúmeros metabólitos secundários com ação biológica, principalmente moléculas antimicrobiana com amplo espectro de ação (Sanglier et al., 1993). Desta forma, pretende-se avaliar a capacidade de rizobactérias do gênero *Streptomyces* para controlar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno que ataca plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill].

3. Hipóteses

- Isolados de *Streptomyces* são capazes de inibir o desenvolvimento do micélio do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Os isolados de *Streptomyces* sintetizam fenazinas antimicrobianas com ação contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de rizobactérias *Streptomyces* para controlar o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar *in vitro* a antibiose entre isolados de *Streptomyces* e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.
2. Avaliar a atividade antimicrobiana de exsudatos bacterianos (fenazinas e compostos indólicos) de *Streptomyces* no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*.
3. Avaliar a ação de VOCs (compostos orgânicos voláteis) produzidos por *Streptomyces* sobre o desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*.
4. Avaliar a síntese de metabólitos secundários (fenazinas e compostos indólicos) em *Streptomyces*.

Referências:

- Abawi, G. S. (1979). Epidemiology of Diseases Caused by Sclerotinia Species . *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-899>
- Abdelfattah, M. S., Kazufumi, T., & Ishibashi, M. (2010). Izumiphenazines A-C: Isolation and structure elucidation of phenazine derivatives from Streptomyces sp. IFM 11204. *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/np100400t>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. In *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alencar Julio, V. (2019). Manejo de mofo branco na cultura da soja. Pioneer Sementes.
- Alves Filho, J. P. (2002). Uso de agrotóxico no Brasil: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume, 188p.
- Anitha, A.; Rabeeth, M. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of Streptomyces griseus. *Afr J Plant Sci*. v. 4, n. 3, p. 61- 66, 2010.
- Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gualtieri, G., Noya, F., & Arias, A. (1998). Fluorescent Pseudomonas spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10–11), 1317–1322. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00003-0)
- Barbosa, R. N. T. Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (Solanum lycopersicum L.). Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista. 44 p. 2009.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00019-15>
- Benite, A. M. C., Machado, S. de P. & Machado, B. da C. (2002). Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. *Química Nova*, 25(6b), 1155–1164. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700016>
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bernardes, F. S. Rizobactérias na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas. 58f. 2006.
- Bettiol, W., & Morandi, M. A. B. (2009). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. In *SpringerReference*. https://doi.org/10.1007/springerreference_34560
- Bettiol, W., Morandi, M., Pinto, Z., Paula Júnior, T., Corrêa, É., Moura, A., Lucon, C., Costa, J., & Bezerra, J. (2012). *Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas*.
- Biessy, A., & Filion, M. (2018). Phenazines in plant-beneficial Pseudomonas spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. In *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14395>
- Braccini, A. D. L. E., De Sá Motta, I., Scapim, C. A., Braccini, M. D. C. L., Ávila, M. R., & Meschede,

- D. K. (2004). Características agronômicas e rendimento de sementes de soja na semeadura realizada no período de safrinha. *Bragantia*. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052004000100009>
- Brustolin, R. (2012). Produção de inóculo e sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Dissertação de Mestrado*, 611.
- Campanhola, C.; Bettiol, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 279 p, 2003.
- Canteri, M.G.; Dalla Pria, M.; Silva, O.C. (1999). Principais doenças fúngicas do feijoeiro. Ponta Grossa. Editora UEPG, 178 p.
- Chaves GM. (1964). Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Experientiae*. Viçosa v.4, n.2.
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Amaral, L. S., & Garcia, F. A. (2009). Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. *Horticultura Brasileira*. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362009000300014>
- Cassetari Neto, D.; Machado, A. M.; Silva, R. A. (2010). Manual de doenças da soja. São Paulo: Cheminova Brasil.
- Chandra, G., & Chater, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. In *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12047>
- Chen, H.; HSU, M.; Jiang, S. Purification and characterization of an exo-N, N'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 191-197, 1997.
- CONAB. (2022). Acompanhamento da Safra Brasileira. *Boletim Da Safra 2021*, 9(Terceiro levantamento), 60. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>
- CONAB. (2021). *Soja Resumo do Quadro de Oferta e Demanda Mundial do Departamento de Agricultura dos Soja*. <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuaria-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-soja/item/15750-soja-analise-mensal-maio-2021>
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., & Ousley, M. A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3899-3905.1993>
- Deganello, J. (2012). Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na interação *Monilophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum*. *Dissertação de Mestrado*.
- Diehl, M., Ferla, N. J., & Johann, L. (2012). Plantas associadas à videiras: uma estratégia para o controle biológico no Rio Grande do Sul. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 79(4), 579–586. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000400015>
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. E. S. J., & Sivasithamparam, K. (2009). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03926.x>
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A

- widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. In *Plant Signaling and Behavior*. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. In *Trends in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02021-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02021-8)
- Guimarães, A. M. (2007). Desenvolvimento participativo de controle biológico da Mancha Preta dos Citros na Região do Vale do Caí, RS, Brasil. *Rev. Bras. de Agroecologia*, 2(2), 799–802.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hartman, G. L., Sinclair, J. B., & Rupe, J. C. (1999). Compendium of soybean diseases. In *Disease compendium series*.
- Henning, A. A. (2004). Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. *Documentos 235*, 1–54.
- Hohnadel, D.; Meyer, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 170, n. 10, p. 4865-4873, 1988.
- Hopwood, D. A. (2006). Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome . *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090639>
- Jiang, Y., Wu, C., Zhang, L., Hu, P., Hou, W., Zu, W., & Han, T. (2011). Long-day effects on the terminal inflorescence development of a photoperiod-sensitive soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] variety. *Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.006>
- Jiménez-Esquilín, A. E., & Roane, T. M. (2005). Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0007-x>
- Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamim Filho, A., & Camargo, L. E. A. (2005). Manual de Fitopatologia, Vol II. In *Doenças das plantas cultivadas*.
- Lehr, N. A., Schrey, S. D., Bauer, R., Hampp, R., & Tarkka, M. T. (2007). Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02021.x>
- Leite, R. M. V. B. D. C. (2005). Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. *Comunicado Técnico, No 76 - Embrapa*, 1–3.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., & Hsiang, T. (2012). Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.014>
- Magali, J., Calazans, G. M. aria T., & Melo, I. S. de. (2008). *Importância de actinobactérias para a agricultura*.
- Mansour, S. R. (2003). The occurrence and distribution of soil actinomycetes in saint Catherine area, south Sinai, Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.
- Matsuo, Y.; Kurita, M.; Park, J. K.; Tanaka, K.; Nakagawa, T.; Kawamukai, M.; Matsuda, H. Purification, characterization and gene analysis of N-acetylglucosaminidase from *Enterobacter* sp. G-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, n.7, p. 1261-1268, 1999

- Mavrodi, O. V., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2007). Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00925-07>
- Mentel, M., Ahuja, E. G., Mavrodi, D. V., Breinbauer, R., Thomashow, L. S., & Blankenfeldt, W. (2009). Of two make one: The biosynthesis of phenazines. In *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>
- Meyer, M. C. (2019). *Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (Sclerotinia sclerotiorum) resultados sumarizados dos experimentos cooperativos*. August. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17083.77607>
- Milanesi, P. M., Blume, E., Antonioli, Z. I., Muniz, M. F. B., Ricardo, Santos, F. dos, Finger, G., & Durigon, M. R. (2013). Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. *Revista de Ciências Agrárias*.
- Miyasaka, S., & Medina, J. C. (1981). Introdução e evolução da soja no Brasil. 5. No Estado de São Paulo. In *A soja no Brasil*.
- Neilands J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of biological chemistry*, 270(45), 26723–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Ordóñez-Valencia, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L. V., & Larsen, J. (2018). Desarrollo morfológico temprano de esclerocios por *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de bicarbonato de potasio. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1803-4>
- Palacios, O. A., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2014). Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria-an overview. In *Biology and Fertility of Soils*. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0894-3>
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2013). Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.12212>
- Parra, J. R. P. (2014). Biological control in Brazil: An overview. *Scientia Agricola*, 71(5), 420–429. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167>
- Patriarca, E. J., Tatè, R., & Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial NH₄(+)⁺ metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(2), 203–222. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.203-222.200>
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. In *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Pierson, L. S., & Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3>
- Pieterse, C. M. J.; Van Wees, S. C. M.; Hoffland, E.; Van Pelt, J. A.; Van Loon, L.C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell, Rockville*, v. 8, p. 1225-37, 1996

- Purdy, L. H. (1979). Sclerotinia sclerotiorum : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact . *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-875>
- Reis, E.M.; Brustolin, R.; Danelli, A.D.; Casa, R.T. (2011). Ciclo do mofo-branco. *Revista Plantio Direto*, v. 122, p. 24-27.
- Roberts, M. A., & Crawford, D. L. (2000). Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2555-2564.2000>
- Rodrigues, O., Didonet, A. D., Lhamby, J. C. B., Teixeira, M. C. C., & Guareschi, R. (2006). Efeito da temperatura e do fotoperíodo na duração e na taxa de crescimento de grãos de soja. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento EMBRAPA TRIGO*, 35, 1–22.
- Salamoni, S. P. (2009). Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas. *Tese de Doutorado*.
- Salla, T. D., Ramos da Silva, T., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2014). *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.10.008>
- Sanglier, J. J., Wellington, E. M. H., Behal, V., Fiedler, H. P., Ellouz Ghorbel, R., Finance, C., Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D. K., Prinzi, S., & Trigo, C. (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90071-9](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90071-9)
- Schrempf, H. (1999). Characteristics of chitin-binding proteins from *Streptomyces*. In *EXS* (pp. 87, 99–108.). https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8757-1_7
- Sediyama, T. (2009). Tecnologias de produção e usos da soja. In *Embrapa Soja (CNPQSO)*.
- Seeger, K., Flinspach, K., Haug-Schifferdecker, E., Kulik, A., Gust, B., Fiedler, H. P., & Heide, L. (2011). The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00234.x>
- Silva, V. M. da. (2016). *Potencial antagônico de actinobactérias, visando o biocontrole de Botrytis Cinerea patógeno de Eucalyptus sp.*
- Smaoui, S., Mathieu, F., Fguira, L. F. Ben, Merlina, G., & Mellouli, L. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of a new streptomyces sp. TN17 isolated in the soil from an oasis in tunis. *Archives of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.2298/ABS1104047S>
- Souza Neto, J. D. de. (2015). ESTUDO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO X AMBIENTE E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ASSOCIADOS A QTLs PARA CONTEÚDO DE ÓLEO E PROTEÍNA EM SOJA. *Dissertação de Mestrado*.
- Sterling, W. L. (1989). *Biological Control Of Pest Populations*.
- Tarkka, M. T., Lehr, N. A., Hampp, R., & Schrey, S. D. (2008). Plant behavior upon contact with *Streptomyces*. In *Plant Signaling and Behavior*. <https://doi.org/10.4161/psb.5996>
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. In *Applied Biochemistry and Microbiology*. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Ueno, H.; Miyashita, K.; Sawada, Y., Oba, Y. Purification and some properties of extracellular

chitinases from *Streptomyces* species S-84. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 36, p. 377-392, 1990.

Van Dissel, D., Claessen, D., & van Wezel, G. P. (2014). Morphogenesis of streptomyces in submerged cultures. In *Advances in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00001-9>

Ventura, J. P., Casteliani, A. G. B., Vargas, H. A. H. S., Nobre, S., Melo, & Soares, I. (2018). *Actinobactérias Como Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos de Trigo*. 1–12.

Xia, S., Xu, Y., Hoy, R., Zhang, J., Qin, L., & Li, X. (2020). The notorious soilborne pathogenic fungus *sclerotinia sclerotiorum*: An update on genes studied with mutant analysis. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010027>

Yu, T. W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B. S., Hutchinson, C. R., & Floss, H. G. (1999). Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyke1. Yu TW, Shen Y, Doi-Katayama Y, Tang L, Park C, Moore BS, et al. processively. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9051>

Caracterização de rizobactérias *Streptomyces* para o controle do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*

1. Introdução

Actinobactérias, em particular rizobactérias do gênero *Streptomyces*, podem estimular o crescimento e induzir a defesa de plantas, através da produção de metabólitos secundários, como o hormônio auxina, antibióticos, sideróforos e enzimas (Palacios et al., 2014). A síntese destes metabólitos secundários geralmente inicia quando ocorre escassez de nutrientes no meio de cultura, após a fase exponencial de crescimento celular, visto que esses compostos não são essenciais ao crescimento do microrganismo (Yu et al., 1999).

Entre os anos de 1988 e 1992, cerca de 75% de todas as novas moléculas descobertas em actinobactérias, eram provenientes de *Streptomyces*, chegando a aproximadamente 5.000 compostos com atividade biológica neste gênero (Demain, 1999). Moléculas antimicrobianas, como as celastramicinas, com atividade contra *Mycobacterium vaccae* e *Bacillus subtilis*, foram descobertos em *Streptomyces* sp. que ocorrem em troncos de Celastraceae (Pullen et al., 2002), bem como os compostos cacadumicinas, com atividade contra bactérias *B. Anthracis* e *Plasmodium falciparum*, descobertos em folhas de *Grevillea pteridifolia* (U. Castillo et al., 2003). Da mesma forma, diversas espécies de *Streptomyces*, com hábitos de vida distintos produzem antimicrobianos. *Streptomyces galbus*, isolados de Rhododendron, possuem atividade contra *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* (Shimizu et al. 2004), *Streptomyces* spp. isolados das plantas medicinais *Conyssia bonarienses* e *Momordica charantia*, apresentam atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida* spp. e *Malassezia* spp. (Areias da Silva, 2006). Além do amplo uso de metabólitos na medicina, os compostos secundários produzidos por *Streptomyces* apresentam grande potencial para o controle de microrganismos fitopatogênicos, sendo utilizados como ferramenta para auxiliar no controle químico de patógenos (El-Tarabily et al., 2009). *Streptomyces* endofíticos isolados de *Kennedia nigriscans*, apresentam atividade no controle dos fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Pseudomonas infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erwinia carotovora*, *Cochliobolus carbonum* e *Penicillium* sp. (U. F. Castillo et al., 2002). A inoculação de sementes de milho com isolados de *Streptomyces* spp. reduziu a incidência de *Fusarium moniliforme* nas sementes (Bressan & Figueiredo, 2003). Da mesma forma, isolados de *Streptomyces* spp. endófitos de plantas medicinais foram capazes de produzir metabólitos com ação contra *Phytophthora erythroseptica*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Rhizoctonia solani* (Zin et al., 2007).

Atualmente, um dos antimicrobianos mais pesquisados com características supressivas contra patógenos vegetais, são as fenazinas (Bagnasco et al., 1998; Mavrodi et al., 2007). Fenazinas são compostos nitrogenados heterocíclicos sintetizados por diversos grupos de bactérias, como *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Burkholderia* (Kennedy et al., 2015). O efeito supressivo da rizobactéria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* PCL1391 sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*, causador da podridão da raiz do tomate, é atribuída à produção da phenazine-1-carboxamide (Chin-A-Woeng et al., 2001). Fenazinas produzidas por *Pseudomonas synxantha* LBUM223 reduzem a expressão de genes chave relacionados à patogenicidade na sarna da batata causada por *Streptomyces*, sob condições controladas e em campo (Arseneault et al., 2013, 2015). A síntese de fenazina-1-ácido carboxílico por *Burkholderia* sp. HQB-1, isolada da rizosfera da bananeira, apresenta atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* e *Curvularia fallax* (Xu et al., 2020). Foi observado também que as fenazinas ativam a resistência sistêmica induzida (ISR) em tabaco (Kang et al., 2007), no feijão e no arroz (Ma & Ma, 2016). Neste sentido, concentrações de phenazine-1-carboxamide, variando de 0,1 a 1 µM foi suficiente para desencadear ISR no arroz contra *Magnaporthe oryzae* (Ma & Ma, 2016). Salla et al. (2014) observaram que rizobactérias *Streptomyces* spp. com características de promoção do crescimento vegetal foram capazes de induzir resposta sistêmica na modulação de enzimas relacionadas à defesa vegetal, modulando o metabolismo secundário de *Eucalyptus* spp.

Além de ser conhecido por sua ampla capacidade de síntese de antibióticos, o gênero *Streptomyces* produz uma grande diversidade de compostos orgânicos voláteis (VOCs) com ação biológica (Pollak, F. C., & Berger, 1996; Salwan & Sharma, 2020). A incubação de maçãs infectadas com *Colletotrichum acutatum*, juntamente com *Streptomyces coelicolor*, *S. diastatochromogenes* e *Streptomyces* cepa 2R, produtoras de VOCs, promoveu a redução de áreas de podridão das maçãs em até 66% (Jepsen et al., 2022). Wang et al., 2013, investigou a atividade antifúngica de VOCs de *Streptomyces alboflavus* TD-1. Os resultados indicaram que os voláteis inibiram os fungos de armazenamento *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* *in vitro*.

Do mesmo modo que a produção de antimicrobianos e VOCs são importantes para a adaptação competitiva de *Streptomyces*, a produção de hormônios vegetais, como a auxina (AIA, ácido indo-3-acético), representa uma vantagem para aquelas que ocorrem na rizosfera, agindo na modulação do crescimento vegetal. O aumento dos níveis do AIA na rizosfera promove o alongamento das raízes, ampliando a superfície de contato da raiz com o solo, aumentando indiretamente a capacidade de absorção de nutrientes (Ahemad & Kibret, 2014). Diversas *Streptomyces* que ocorrem naturalmente em raízes de *Araucaria angustifolia*, são

capazes de produzir auxina (Dalmas et al. 2011). Cerca de 86,25% das actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da Caatinga foram capazes de produzir auxina, destacando-se o gênero *Streptomyces* (Lins, 2014).

A produção de auxinas por bactérias serve de estímulo para o desenvolvimento de raízes, resultando em uma melhor absorção de nutrientes e de água (Egamberdiyeva & Höflich, 2003). A auxina exsudada por bactérias promoveu o crescimento de *Vigna hirsuta* através da diminuição da senescência vegetal e dos rizóbios durante o processo de desenvolvimento de nódulos (Camerini et al., 2008). Auxinas produzidas por isolados de *Sinorhizobium meliloti* induziram a resistência a salinidade em *Medicago trunculata*, promovendo o crescimento vegetal (Bianco & Defez, 2009).

Entretanto, estudos recentes relacionam negativamente o hormônio auxina com a resistência vegetal a patógenos, devido ao grande nível de interações entre as auxinas e as diversas rotas de sinalização hormonal, como o ácido salicílico, o jasmonato e o etileno (Deganello, 2012). A sinalização por auxinas pode contribuir para a infecção do patógeno devido a promoção tanto do afrouxamento da parede celular quanto da abertura dos estômatos, facilitando a entrada de patógenos, ou ainda, pela inibição da sinalização de defesa via salicilato (Fu et al., 2015). A perturbação nos níveis de auxina da planta é considerada uma estratégia frequente de virulência entre vários patógenos, como *Alternaria*, *Fusarium*, *Plasmodiophora*, *Colletotrichum*, *Lentinus* e *Sclerotium* (Tsavkelova et al., 2006). *Pseudomonas savastanoi* utiliza a auxina para bloquear a reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco (Robinette & Matthyse, 1990). Desta forma, as interações bactéria-raiz modificam o crescimento e a capacidade adaptativa das plantas em condições de estresse. Outro metabólito de grande interesse econômico são os sideróforos, que tem como função o transporte do ferro através da membrana celular bacteriana. Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* produzem sideróforos capazes de quelar o ferro na rizosfera, e dessa forma inibindo o desenvolvimento de alguns microrganismos que dependem do ferro para sua sobrevivência, entre eles fitopatógenos, que têm menor capacidade de competição por ferro (Hohnadel et al., 1988). Além dos sideróforos, as quitinases também vem se destacando para o controle de fitopatógenos. Quitinases são enzimas que catalisam a quebra da quitina. Na agricultura podem ser utilizadas como controle biológico contra insetos uma vez que possuem quitina na carapaça e também contra fungos, os quais possuem quitina na parede da célula (Fleuri et al., 2005). Em um estudo realizado com *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Streptomyces*, observou-se a capacidade destes em produtores de quitinase, que inibir o crescimento dos fungos *Fusarium culmorum*, *Mucor hiemalis* e *Phoma exigua*, através da produção de quitinase (Boer et al., 1998).

O metabolismo secundário de *Streptomyces* representa uma ampla diversidade de moléculas, como antibióticos, fungicidas, agentes quelantes, inibidores de enzimas, entre outros, desperta um grande interesse na busca de novas moléculas com atividades biológicas (Vining, 1986). Desta forma, pretende-se avaliar diferentes cepas *Streptomyces* (CLV16, CLV100, CLV103 e CLV115) isolados de rizosferas, quanto à capacidade para controlar o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e determinar o perfil metabólico (fenazinas e compostos indólicos).

2. Metodologia

2.1 Cultivo dos Microrganismos

Os isolados de *Streptomyces* utilizados neste trabalho (CLV 16, CLV 100, CLV 103 e CLV 115) foram selecionados em estudos prévios por apresentarem potencial para o controle de fungos patogênicos. Estas bactérias foram obtidas de amostras de rizosfera de plantas das famílias Poaceae (CLV16 e 100), Fabaceae (CLV103) e Solanaceae (CLV 115). Após a etapa de isolamento e cultivo utilizando meios seletivos, os isolados foram morfológicamente caracterizados e armazenados em tubos criogênicos (glicerol:meio; 1:1 v/v) a -80 °C. A recuperação dos microrganismos, foi realizada através de cultivos em meio sólido ISP2 (extrato de levedura, extrato de malte, glicose e ágar) ou ISP4 (amido solúvel, K₂HPO₄, MgSO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, CaCO₃, FeSO₄, MnCl₂, ZnSO₄ e ágar) (*International Streptomyces Project* - ISP) a 28 ± 2 °C; e em meio líquido ISP2 ou ISP4, sob agitação (100 rpm) a 26 ± 2 °C (Shirling & Gottlieb, 1966).

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* foi gentilmente cedido pela empresa Agronômica, Laboratório de Diagnóstico, Fitossanitário e Consultoria Ltda (Porto Alegre, RS). Este patógeno foi mantido na forma de escleródios, armazenados a -20 °C. A reativação do patógeno foi feita através do cultivo de escleródios em meio de cultura BDA (Batata:Dextrose:Ágar) sólido em câmara de crescimento tipo BOD, no escuro, à temperatura de 25 ± 2 °C (Salgado et al., 2003).

2.2 Ensaio de antagonismo *in vitro*

O antagonismo dos isolados de *Streptomyces* contra *Sclerotinia sclerotiorum* foi avaliado pelo teste de pareamento direto em placa. Para isto, os isolados de *Streptomyces* foram cultivados em meio líquido ISP2 ou ISP4 por cinco dias sob agitação (100 rpm). O patógeno foi cultivado em meio sólido BDA (batata-dextrose-ágar) por sete dias. O teste de pareamento foi realizado depositando em linha, com alça de Drigalsky, 50 µL do isolado de *Streptomyces* a 1 cm da borda da placa. Após cinco dias de cultivo, foi depositado um *plug* (1 cm diâmetro) com hifas de *S. sclerotiorum*. O tratamento controle consistiu em placas inoculadas apenas com *plugs* de

S. sclerotiorum. O *plug* foi removido de uma cultura com hifas crescidas por 7 dias, com auxílio de um furador de rolhas estéril. O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi acompanhado diariamente através de registro fotográfico. Encerrou-se o acompanhamento do crescimento quando as hifas do tratamento controle cobriram toda a superfície do meio. Após, as imagens foram analisadas com o auxílio do programa AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging, versão 4.8.2), determinando a área de crescimento do fungo (cm²). Cada cultivo pareado foi repetido três vezes, cada placa representou uma repetição (Melo & Valarini, 1995).

2.3 Ensaio de antagonismo de Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs)

O efeito de compostos voláteis produzidos por *Streptomyces* sobre o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, foi avaliado utilizando placas de Petri bipartidas. Para isto, os isolados de *Streptomyces* foram cultivados em meio líquido ISP2 ou ISP4 por cinco dias sob agitação (100 rpm). O patógeno foi cultivado em meio sólido BDA por sete dias. O teste consistiu na inoculação de 50 µL do isolado de *Streptomyces*, com auxílio de alça de Drigalsky, em um dos lados da placa bipartida. Após cinco dias de cultivo, foi depositado no outro lado da placa um *plug* (1 cm diâmetro) com hifas de *S. sclerotiorum*. O tratamento controle consistiu em placas inoculadas apenas com *plugs* de *S. sclerotiorum* em um dos lados da placa bipartida. O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi acompanhado diariamente através de registro fotográfico. Encerrou-se o acompanhamento quando as hifas do tratamento controle cobriram toda a superfície do meio. Após, as imagens foram analisadas com auxílio do programa AxioVision, conforme acima descrito (Raza et al., 2016).

2.4 Extração de exsudatos de *Streptomyces*

Extração de exsudatos de culturas em suspensão: os isolados de *Streptomyces* foram cultivados em meio líquido ISP2 ou ISP4 por cinco dias sob agitação (100 rpm) a 27°C. Após este período, as culturas foram filtradas e o filtrado foi particionado (extração líquido-líquido) com diferentes solventes: Diclorometano, Acetato de etila ou n-Butanol (Lopes, 2011; L. A. da Silva, 2017). As frações orgânicas, contendo exsudatos, foram suplementadas com lactose (4 g/L), e secas sob jato de ar em temperatura ambiente. Após serem concentradas, o produto resultante (pó-solúvel) foi armazenado em frasco âmbar e mantidos a temperatura ambiente até ser utilizado nos experimentos de atividade antimicrobiana e análises cromatográficas.

Extração de exsudatos de *Streptomyces* cultivados em ágar: Isolados de *Streptomyces* foram cultivados em meio de cultura líquido ISP2 ou ISP4, sob agitação (100 rpm) e $28 \pm 1^\circ\text{C}$, por cinco dias. Após este período, alíquotas destes cultivos (100 μL) foram superficialmente espalhadas em meio sólido (ISP2 ou ISP4) com auxílio de alça de Drigalski, e incubados por 6 dias a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, o meio sólido apresentando culturas crescidas na forma de tapete foi extraído pelo método adaptado de Webster et al. 2020. Brevemente, a superfície do meio de cultura, contendo hifas aéreas e esporos, foi removida por raspagem utilizando um bisturi. Posteriormente, o ágar (2,15 g) foi seccionado em pequenos pedaços e homogeneizado (extração líquido-Ágar) com 25 mL do solvente de extração Acetato de etila ou tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*; pH 7,2). Posteriormente, foram centrifugados a 4.000 rpm por 5 min a 25°C e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes contendo exsudatos foram suplementados com 4g/L de lactose (agente adsorvente) e concentrados. O sobrenadante tampão PBS foi liofilizado e o sobrenadante acetato de etila foi concentrado sob jato de ar em temperatura ambiente. Após serem concentrados, o produto resultante (pó-solúvel) foi armazenado, conforme já descrito.

2.5 Atividade antimicrobiana de exsudatos de *Streptomyces*.

A atividade antimicrobiana dos exsudatos foi avaliada contra o patógeno *S. sclerotiorum*. O produto pó-solúvel, contendo exsudatos concentrados, foram resuspenso em água na diluição 1:10 (massa:volume) e filtroesterilizados (0,45 μm). Alíquotas de 100 μL foram dispensadas em poços no meio de cultura. As placas de Petri contendo meio ISP2 ou ISP4 possuíam três perfurações de 1 cm de diâmetro (poços) dispostas equidistantes do fitopatógeno. O fungo *S. sclerotiorum* foi colocado no centro da placa como um *plug*, contendo hifas, 24 h após a aplicação dos exsudatos nos poços. Para tanto, foi utilizado um *plug* (1 cm diâmetro) removido de uma cultura de *S. sclerotiorum* com auxílio de um furador de rolhas estéril. As placas foram incubadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. O tratamento controle constituiu de placas inoculadas apenas com *plugs* de *S. sclerotiorum* e alíquotas de 100 μL de água estéril foram dispensadas nos poços. O crescimento do fungo foi avaliado diariamente ao longo de cinco dias de cultivo. Após, as imagens foram analisadas com o auxílio do programa AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging, versão 4.8.2), determinando a área de crescimento do fungo (cm^2). Cada teste de avaliação foi repetido três vezes, cada placa representando uma repetição (Miranda et al., 2015). A concentração de proteína total foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford 1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

2.6 Determinação de fenazinas em *Streptomyces*

Os níveis de fenazinas, presentes nos exsudatos concentrados de *Streptomyces*, foram determinadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Para isto, pó-solúvel contendo exsudatos foram resuspenso em água (1:10 massa:volume). Após, as soluções foram filtradas em membrana (0,45 µm) e analisadas. A detecção das fenazinas foi realizada utilizando uma coluna MetaSil ODS C₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm), com uma pré-coluna C₁₈, fluxo de 1 ml/min e comprimento de onda de 365 nm. A temperatura da coluna foi ajustada para 40 °C. Os dados cromatográficos foram processados pelo Clarity Chromatography Software. A fase móvel A constituiu de água e a fase móvel B, acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados por ácido fórmico a 2,5%. O gradiente linear constituiu de 90-55% do eluente A (0 a 3 min); 55-40% de A (3 a 15 min); 40-0% de A (15 a 16 min); 0% de A (16 a 20 min); 0-90% de A até 22 min (Kern & Newman, 2014). A quantificação foi determinada a partir de curvas de calibração utilizando os padrões comerciais: PCA (ácido fenazina-1-carboxílico), OH-Phe (1- hidroxil-fenazina), Phe (Fenazina) e PYO (Pyocyanin).

2.7 Determinação de compostos indólicos em *Streptomyces*

Os níveis de compostos indólicos (auxina), presentes nos exsudatos concentrados de *Streptomyces*, foram determinados utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Para isto, pó-solúvel contendo exsudatos foram resuspenso em água (1:10 massa:volume). Após, as soluções foram filtradas em membrana (0,45 µm) e analisadas. A detecção da auxina foi realizada utilizando uma coluna MetaSil ODS C₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm), com uma pré-coluna C₁₈. A temperatura da coluna foi ajustada para 30 °C. Os dados cromatográficos foram processados pelo Clarity Chromatography Software. A fase móvel A constituiu de água e a fase móvel B, acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados por ácido fórmico a 0,1%. O gradiente linear constituiu de 70%-5% do eluente A (0 a 2,5 min); 5% de A (2,5 a 4,5 min); 5%-70% de A (4,5 a 4,6 min); 70% de A até 8 min, sob fluxo de 1 ml/min e comprimento de onda de 254 nm (Kern & Newman, 2014). A quantificação foi determinada a partir de curvas de calibração dos padrões comerciais para AIL (DL-indole-3-lactic acid), AIC (Indole-3-carboxylic acid), AIAD (Indole-3-acetaldehyde) e AIA (Indole-3-acetic acid).

2.8 Identificação e análise filogenética dos isolados de *Streptomyces*

Os isolados bacterianos foram identificados através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Para tanto, os isolados foram cultivados em meio sólido ISP2 ou ISP4, incubados a 26 ± 2°C, no escuro por 3 dias. O DNA genômico bacteriano foi extraído utilizando o kit Wizard® seguindo

as instruções do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para amplificação por PCR da sequência completa do gene 16S rRNA, usando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: 9F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1542R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC), que resultam em um fragmento de aproximadamente 1.500 pb. As condições de PCR envolveram a desnaturação a 94 ° C por 2 minutos, seguidas de 30 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 45 s e 72°C por 60 s, e um último ciclo a 72 °C por 6 minutos usando o kit Taq Platinum Enzyme (Invitrogen™). O produto de PCR foi sequenciado utilizando os primers 9F, 1542R, MG3F (5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC) e 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC) (Isik et al., 2014), pela empresa MACROGEN Inc (Seoul, Korea). As seqüências nucleotídicas obtidas foram editadas (Unipro UGENE v42.0) e a sequência consenso foi comparada com seqüências depositadas no banco de dados GenBank do NCBI usando a ferramenta de análise Nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As seqüências foram alinhadas com o auxílio do software ClustalW e as análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As árvores filogenéticas foram construídas com base no método Neighbor Joining (NJ) com bootstrap de 1000 repetições e a matriz de distância foi gerada usando o modelo de dois parâmetros de Kimura utilizando o Programa MEGA-X (L. C. N. Silva et al., 2012). A linhagem de *Bacillus subtilis* (NR_112116.2) foi utilizada como grupo externo e, seqüências de espécies conhecidas usadas como referências, foram obtidas no Genbank.

2.9 Análise Estatística

Os resultados foram analisados quanto à homogeneidade das variâncias, segundo o teste de Levene e, quando necessário, os dados foram transformados para se ajustar à distribuição normal. A ocorrência de outliers foi determinada pelo BoxPlot e os valores extremos foram removidos. As médias foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Duncan, com $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do software IBM SPSS v17 (LEITE, 2017).

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos isolados de *Streptomyces*

Os isolados CLV16, 100, 103 e 115 apresentaram morfologia típica de *Streptomyces*, produzindo hifas vegetativas e hifas aéreas com esporos (Figura 13). Os isolados podem ser facilmente distinguidos em cultura pela coloração dos esporos, apresentando cadeias de esporos flexuosas de coloração branco (CLV16) e cinza (CLV115) ou cadeias espiraladas de esporos de coloração rosa (CLV100) e bege (CLV103).

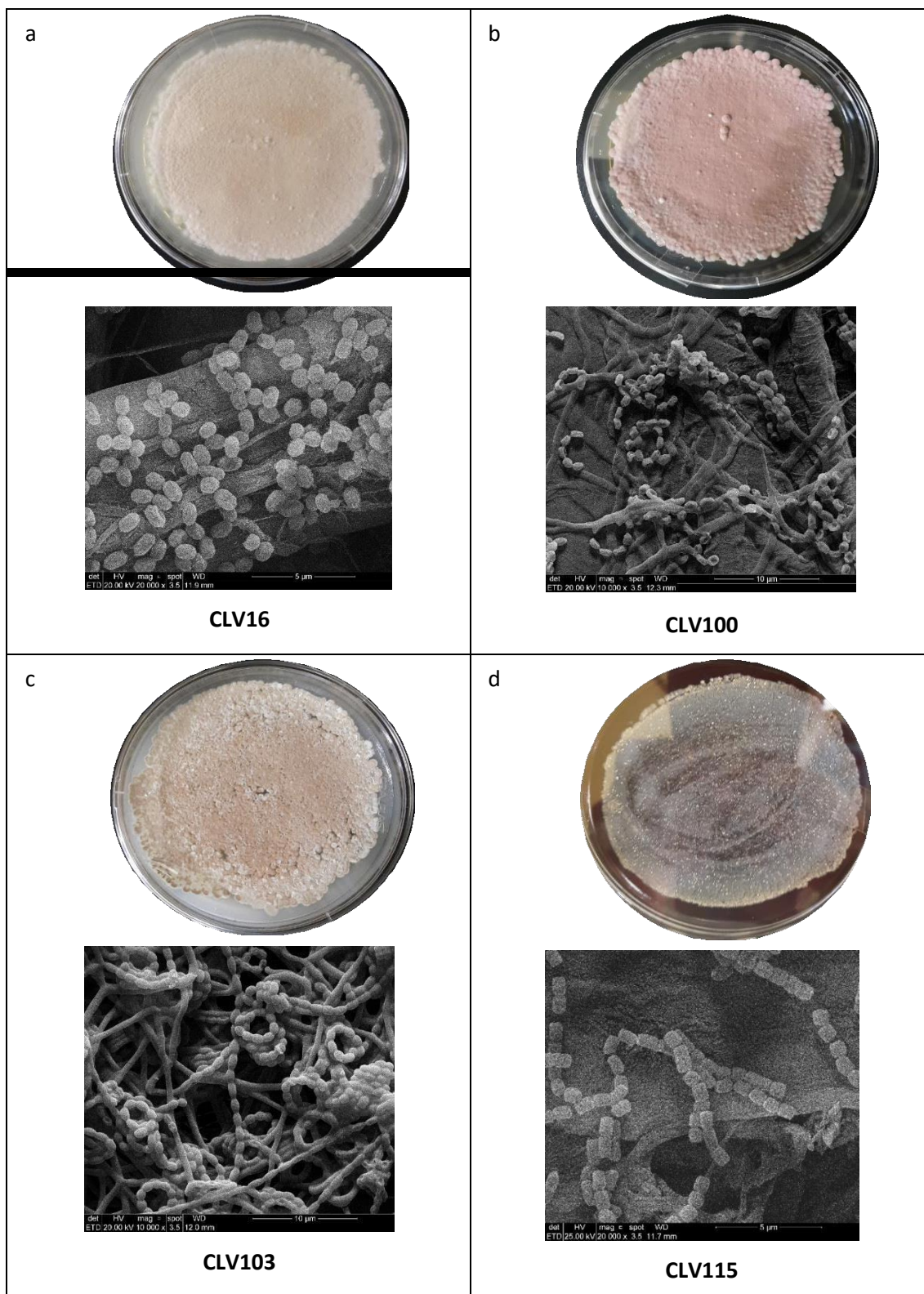


Figura 13 – Aspecto morfológico de *Streptomyces sp.* cultivado em meio sólido e detalhe de hifas aéreas apresentando cadeias de esporos. Fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Barra = 4,5 cm.

As sequências nucleotídicas 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* foram sequenciadas e alinhadas contra o banco de dados do NCBI. As sequências do gene 16S rRNA foram depositadas no banco de dados Genbank, gerando os acessos ON723945 (*Streptomyces* sp. cepa CLV16), ON723948 (*Streptomyces* sp. cepa CLV100), ON723949 (*Streptomyces* sp. cepa CLV103) e ON723951 (*Streptomyces* sp. cepa CLV115). As sequências nucleotídicas foram utilizadas para montar a árvore filogenética (Figura 14).

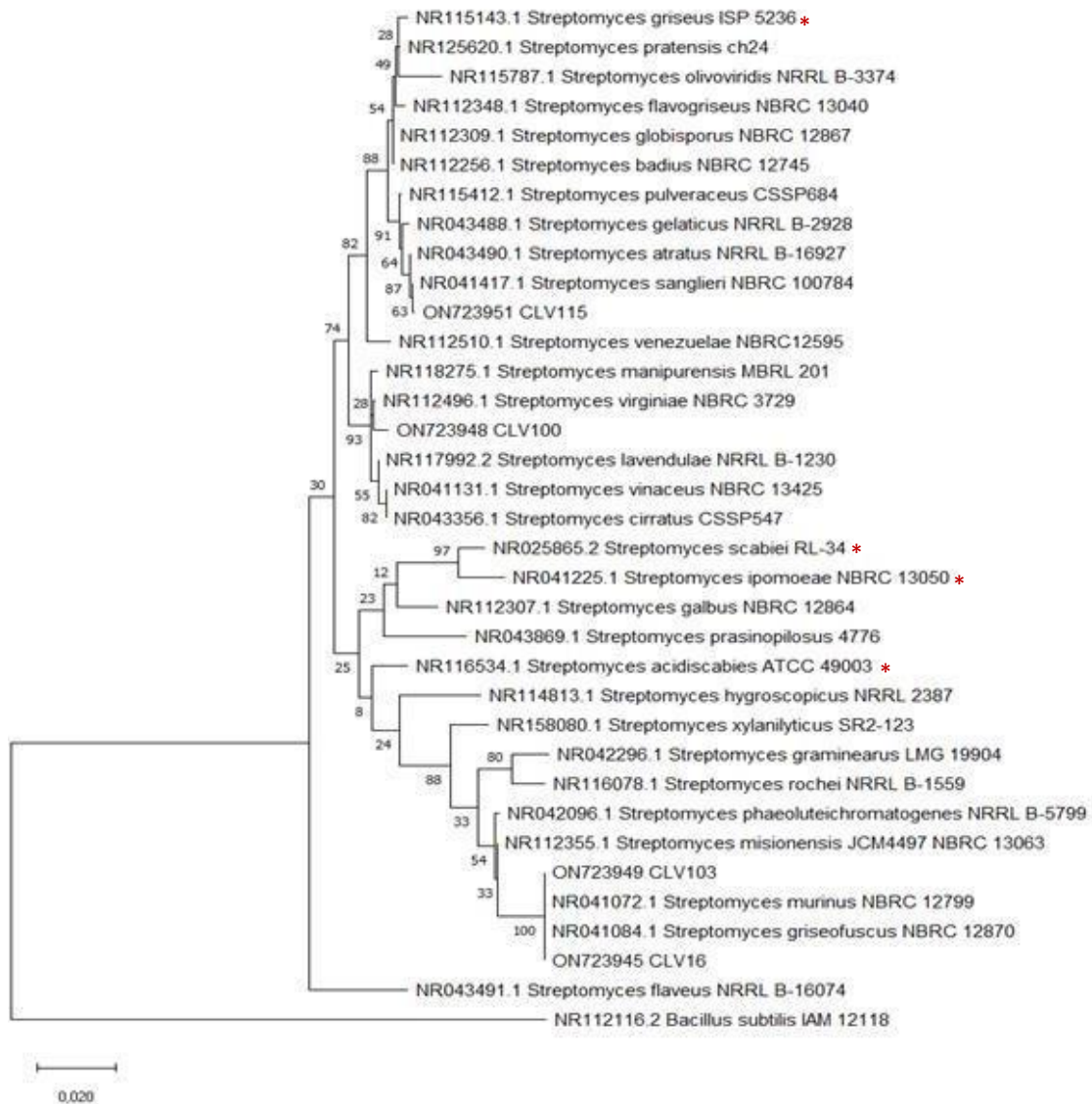


Figura 14 – Relações filogenéticas de 30 *Streptomyces* baseadas em sequências do gene 16S rRNA incluindo os isolados deste estudo. A filogenia foi construída utilizando o método *Maximum Likelihood* e o modelo Tamura-Nei. *Bacillus subtilis* foi utilizado como grupo externo. O número nos nós representa a porcentagem de associação dos táxons pelo teste *Bootstrap* (1.000 réplicas). Asterisco indica que a espécie é fitopatogênica. A barra indica a divergência estimada de 1%.

Os isolados de *Streptomyces* estão separados em três grupos distintos. Os isolados CLV103 e CLV16, coletados de rizosfera de plantas de duas famílias distintas Poaceae e Fabaceae, respectivamente, agruparam em um mesmo clado. Os demais isolados CLV100, coletado de rizosfera de Poaceae e o isolado CLV115, obtido de Solanaceae, formaram cladogramas distintos. O isolado CLV103 apresenta 100% de associação com o clado que agrupa a CLV16 e as espécies *S. murinus* e *S. griseofuscus* (Figura 14). Da mesma forma, a espécie *S. atratus* apresenta 87% de associação com o clado que agrupa CLV115 e *S. sanglieri*. Contudo, o CLV100 apresentou baixa associação com as espécies de *Streptomyces* incluídas na filogenia. Considerando a capacidade de inibição dos CLVs contra *S. sclerotiorum* (Figura 1), observa-se que os isolados CLV16 e 103 apresentam a mesma capacidade. Linhagens de *Streptomyces* agrupadas pelo gene 16S rRNA apresentam um mesmo “core” de moléculas do metabolismo secundário (Vicente et al., 2018). Contudo, apesar de linhagens de *Streptomyces* apresentarem elevada similaridade do gene 16S rRNA e um mesmo “core” de moléculas, elas possuem diferenças marcantes quanto a morfologia e perfil dos metabólitos secundários acessórios, tornando cada linhagem única (Antony-Babu et al., 2017; Sottorff et al., 2019).

As espécies fitopatogênicas *S. griseus*, *S. scabiei*, *S. ipomoeae* e *S. acidiscabies* apresentaram distribuição em cladogramas não associados com os CLVs (Figura 14 - asteriscos). A ocorrência de espécies patogênicas no gênero *Streptomyces* é bastante rara, contudo, alguns organismos se destacam por causarem doenças, como as espécies *S. scabiei*, *S. acidiscabies* e *S. griseus*, patógenos comuns em plantas de batata e tomate, bem como a *S. ipomoeae* que causa doença em batata-doce (Loria et al., 1997). Os resultados indicam que os isolados CLVs não estão relacionados a espécies de *Streptomyces* patogênicas, sendo seguros para o uso em plantas cultivadas. O gene 16S rRNA não foi robusto para a identificação dos isolados CLVs ao nível de espécie. Análises da diversidade em isolados de *Streptomyces* que apresentam 100% de similaridade do gene 16S rRNA, indicaram que avaliações morfológicas e bioquímicas devem preceder as comparações genômicas, visando evitar subestimativas da diversidade neste gênero devido a grande diferença nas moléculas do metabolismo secundário (Antony-Babu et al., 2017). O gênero *Streptomyces* representa um dos grupos taxonomicamente mais complexos (Harrison & Studholme, 2014). Neste sentido, o uso do gene 23S rRNA ou o sequenciamento completo do genoma de *Streptomyces*, representam abordagens alternativas para identificar as relações filogenéticas neste gênero (Chaves et al., 2017).

3.2 Ensaio de antagonismo *in vitro*.

Os isolados de *Streptomyces* foram eficientes ($P=0,001$) na redução do crescimento do fitopatógeno *S. sclerotiorum* (Figura 1). Todos os isolados apresentaram efeito inibidor, sendo o CLV16 (60,4%) e CLV103 (53,2%) com maior inibição, comparados aos CLV100 (30,4%) e CLV115 (31,7%).

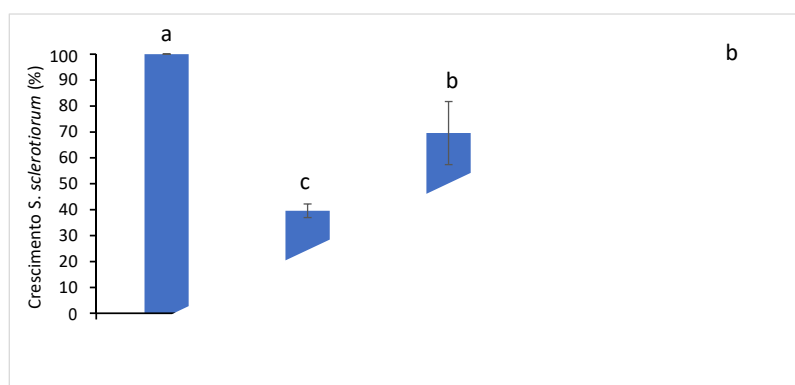


Figura 1 – Crescimento de *S. sclerotiorum* cultivado em meio BDA na presença de isolados de *Streptomyces* (CLV16, 100, 103 e 115). Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias (ANOVA, Tukey $p \leq 5\%$).

A inibição do crescimento das hifas de *S. sclerotiorum* ocorreu devido a exsudatos produzidos por *Streptomyces* e difundidos no meio de cultura (Figura 2). A inibição promovida pelos *Streptomyces* pode ocorrer de forma direta, através da produção de moléculas antimicrobianas (como fenazinas) e enzimas líticas difusíveis (como quitinases) no meio sólido e da síntese de compostos voláteis, bem como de forma indireta, através de competição por nutrientes (produção de sideróforos) (Pacios-Michelena et al., 2021). As actinobactérias apresentam um destacado potencial para o controle de fungos fitopatogênicos, como no caso de *Actinoplanes campanulatus*, *Micromonospora chalcea* e *Streptomyces spiralis* no controle do patógeno *P. aphanidermatum* (El-Tarabily et al., 2009). A cepa *Streptomyces sanglieri* AUM 00500 inibe o crescimento de *Ganoderma boninense in vitro*, produzindo compostos antifúngicos como cicloheximida e actifenol, aumentando o crescimento das plantas e colonizando as raízes de dendê tratado (Azura et al., 2016). Em um estudo feito com *Streptomyces griseofuscus*, 55% dos isolados apresentaram antagonismo contra patógenos do arroz como *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. e *Fusarium moniliforme* (Tian et al., 2004). A *Streptomyces* CMAA 1647 inibe o desenvolvimento do fungo *Pyricularia grisea* (Ventura et al., 2018), assim como *Streptomyces setonii* inibe a germinação de

conídios de *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassicola*, *Stemphylium solani* (Carrer Filho et al., 2009). A rizobactéria *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2 produz glucanases hidrolíticas, celulasas e metabólitos secundários responsáveis pela inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Liu et al., 2019).

A inibição por competição foi descrita primeiramente por Kloepper et al. (1980b). Eles descreveram o mecanismo de antagonismo de *Pseudomonas fluorescens*, através da produção de sideróforos, inibindo o fitopatógeno *Erwinia carotovora* em plantas de tomate. Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular secretados por muitas espécies de *Streptomyces* que promovem o sequestro de íons ferro do solo e inibem o crescimento de fitopatógenos na rizosfera por competição (Zamoum et al., 2017). A síntese de sideróforos em *Streptomyces* S96 é mais importante que a produção de moléculas antimicrobianas no controle do crescimento de *F. oxysporum* f. sp. cubense em bananeiras (Cao et al., 2005). *Streptomyces* produtores de sideróforos podem promover a supressividade do solo quando os níveis de Fe³⁺ são baixos. A inibição da germinação de esporos do fungo *Moniliophthora perniciosa* foi promovida por sideróforos produzidos por *Streptomyces* sp. (Macagnan et al., 2008). Streptomycetes estão entre os microrganismos industriais mais importantes devido à sua capacidade de produzir vários metabólitos secundários, principalmente antibióticos, e sintetizar grandes quantidades de enzimas (M. Gilbert et al., 1995). Devido a estas características, juntamente com a capacidade de produzir uma grande diversidade de sideróforos, torna a seleção de rizobactérias *Streptomyces* uma abordagem estratégica na busca de organismos para o biocontrole de patógenos.

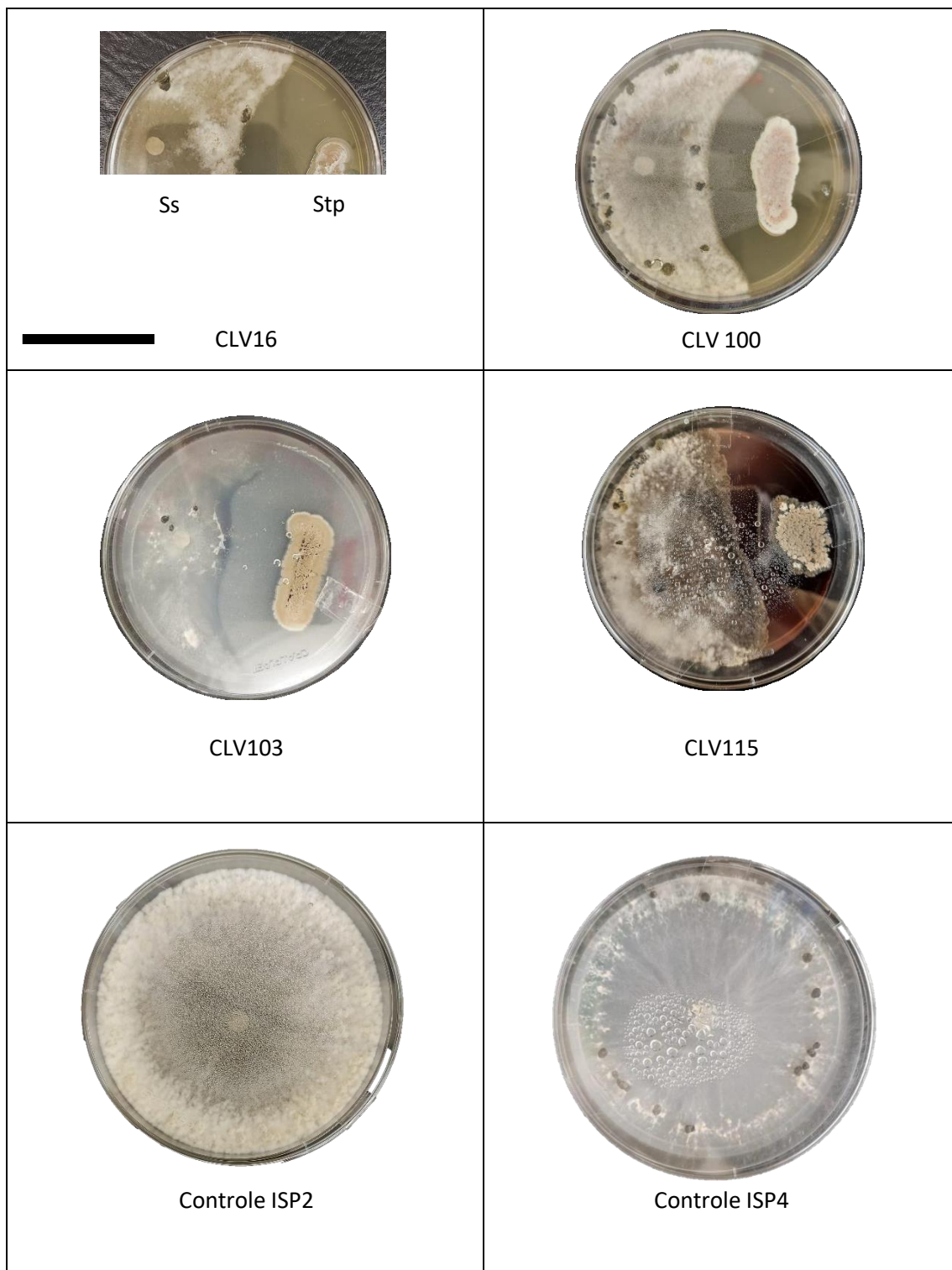


Figura 2 – Crescimento do micélio de *S. sclerotiorum* (Ss) em meio sólido na presença dos isolados CLV16, 100, 103 e 115 de *Streptomyces* (Stp). Culturas em cocultivo por 5 dias. Meio ISP2 (isolados CLV16, 100 e 115); meio ISP4 (isolado CLV103). Barra = 4,5 cm.

3.3 Ensaio de antagonismo de Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs)

O cultivo de *S. sclerotiorum* e *Streptomyces* realizado em placas com barreira (placa bipartida), possibilita verificar a presença de compostos voláteis que possam afetar o crescimento dos organismos. Após 5 dias de cultivo, não foram observadas diferenças significativas ($P=0,18$) entre o crescimento das hifas de *S. sclerotiorum* cultivadas na presença de *Streptomyces*, em relação ao controle (Figura 3). Sabendo da associação dos CLV 16 e 103 no clado com a espécie de *Streptomyces griseofuscus*, um estudo feito com VOCs dessa bactéria apresentou propriedades antifúngicas contra *Fusarium moniliforme*, sendo capaz de produzir 2-MIB (terpenóide) (Cheng et al., 2020).

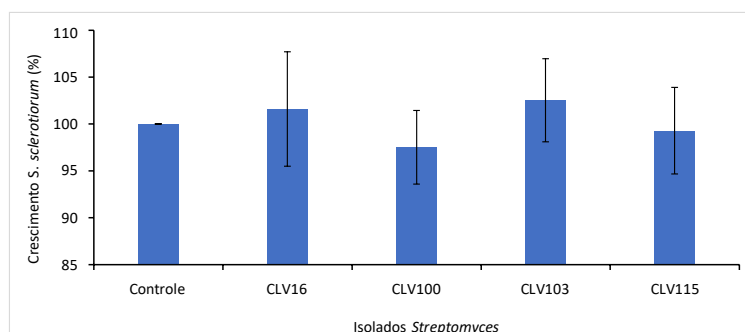


Figura 3 – Antagonismo de compostos orgânicos voláteis no crescimento do micélio de *S. sclerotiorum* em placas com barreira, na presença de isolados (CLV16, 100, 103 e 115) de *Streptomyces*. Controle, sem *Streptomyces*. Culturas em cocultivo por 5 dias.

3.4 Atividade antimicrobiana de exsudatos de *Streptomyces*

A atividade antimicrobiana dos exsudatos foi avaliada em frações semi-purificadas com os solventes Acetato de etila, n-Butanol ou Diclorometano. As soluções com exsudatos não apresentaram efeito inibidor sobre o crescimento do fungo *S. sclerotiorum*, comparado ao controle (Tabela 1), independentemente do isolado CLV16 ($P=0,088$); CLV100 ($P=0,22$); CLV103 ($P=0,078$) e CLV115 ($P=0,067$). Os resultados indicam que os exsudatos extraídos não apresentam compostos inibidores ou estes encontram-se em baixos níveis devido a condição de cultivo dos microrganismos ou a degradação dos compostos durante as etapas de extração.

Tabela 1 - Crescimento do micélio (cm²) de *S. sclerotiorum* na presença de exsudatos de *Streptomyces* extraídos com os solventes orgânicos. Médias do crescimento do micélio (±SD).

| Isolado de <i>Streptomyces</i> | Controle <i>S. sclerotiorum</i> | Solventes na extração | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------|---------------|
| | | Acetato de Etila | n-Butanol | Diclorometano |
| CLV16 | 52,94(±3,71) | 57,9(±2,73) | 57,99(±2,99) | 58,79(±2,69) |
| CLV100 | 52,94(±3,71) | 45,08(±7,85) | 54,35(±5,06) | 51,96(±3,29) |
| CLV103 | 52,94(±3,71) | 50,20(±3,96) | 56,11(±3,01) | 52,30(±4,61) |
| CLV115 | 52,94(±3,71) | 56,82(±4,31) | 61,62(±2,27) | 56,51(±3,58) |

Devido à ausência de atividade antimicrobiana em extratos obtidos de culturas líquidas de *Streptomyces*, procedeu-se a extração dos metabólitos diretamente do ágar utilizado no cultivo dos isolados de *Streptomyces* em placas de Petri (Tabela 2). As soluções preparadas com exsudatos extraídos do ágar não apresentaram efeito inibidor sobre o crescimento do fungo *S. sclerotiorum*, comparado ao controle ($P \geq 0,05$). Os resultados sugerem que os inibidores difusíveis, presentes no meio de cultura, tenham provavelmente sido degradados no processo de extração.

Tabela 2 - Crescimento do micélio (cm²) de *S. sclerotiorum* na presença de exsudatos de *Streptomyces* extraídos do meio de cultura sólido. O meio foi extraído com Acetato de etila ou tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Médias do crescimento do micélio (±SD).

| Isolado de <i>Streptomyces</i> | Controle <i>S. sclerotiorum</i> | Solventes na extração | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------|
| | | Acetato-Ágar | PBS-Ágar |
| CLV16 | 60,9(±0,94) | 56,34 (±2,3) | 55,43(±2,3) |
| CLV100 | 60,9(±0,94) | 59,57(±0,63) | 59,41(±1,66) |
| CLV103 | 60,9(±0,94) | 58,8(±0,34) | 59,9(±0,37) |
| CLV115 | 60,9(±0,94) | 60,5(±0,99) | 60,03(±1,3) |

Os *Streptomyces* são excelentes produtores de enzimas exsudadas no meio de cultivo (Chin-A-Woeng et al., 2001). Estas, são capazes de degradar diferentes substratos como o polissacarídeo xilano, quitina, queratina e celulose (Pacios-Michelena et al., 2021). Neste

sentido, determinou-se a presença de proteínas no extrato PBS-Ágar obtido do meio sólido (Figura 4).

O CLV16 apresentou os maiores níveis de proteínas solúveis no meio ágar (0,45 µg/mL), seguido do CLV115 (0,13 µg/mL) e do CLV100 (0,01 µg/mL). Não foram detectadas proteínas nos exsudatos de CLV103 no meio ágar. A ausência de proteínas extracelulares no CLV103 e os baixos níveis detectados no CLV100, sugerem que tenha ocorrido degradação das proteínas extracelulares nestes CLVs. Cerca de 90% dos microrganismos quitinolíticos no solo são actinobactérias, destacando-se os *Streptomyces* (Pacios-Michelena et al., 2021). Esta característica torna as espécies deste gênero potenciais agentes para o biocontrole de patógenos (Vurukonda et al., 2018). Neste trabalho não foram avaliadas a presença de quitinases nos exsudatos bacterianos. Contudo, é esperado que os CLVs produzam quitinases no meio de cultura. Havendo quitinases nos exsudatos do CLV16, estas não apresentaram atividade contra *S. sclerotiorum*. O tipo de solvente utilizado nas extrações afeta diretamente a atividade enzimática. Solventes como butanol, clorofórmio, DMSO, etanol e metanol, reduzem a atividade de quitinases fungicidas, enquanto o butanol e o hexano aumentam a atividade enzimática devido as interações hidrofóbicas com as quitinases (Karthik et al., 2015). Por outro lado, quitinases extraídas de *Bacillus licheniformis* MB-2 são instáveis em butanol (Toharisman et al., 2005). O procedimento de extração dos exsudatos do meio sólido, utilizando PBS como solvente e liofilizando a solução, é rotineiramente adotado para preservar atividades enzimáticas. Contudo, estes exsudatos obtidos do CLV16 cultivado no meio ágar, não apresentaram efeito fungicida. Quitinases produzidas por *Streptomyces* spp. apresentam elevada estabilidade, mantendo atividade em pH 2-6, temperaturas de até 50°C e elevada concentração de sais, além de poderem ser armazenadas por longos períodos a temperatura ambiente (Karthik et al., 2015).

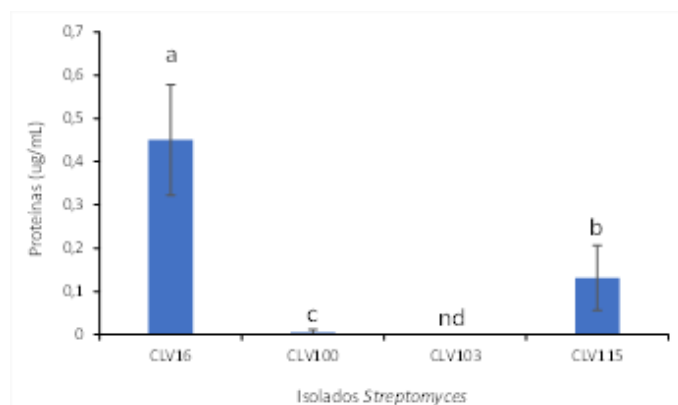


Figura 4 – Níveis de proteínas solúveis presentes em exsudatos extraídos com tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) do meio sólido. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias (ANOVA, Tukey $p \leq 5\%$).

3.5 Determinação de fenazinas em *Streptomyces*

A produção de Fenazinas antimicrobianas foi avaliada a partir de pó-solúvel (diluição 1:10; m:v) dos exsudatos de *Streptomyces*, extraídos do meio de cultura líquido e do meio sólido. Os resultados indicam interação significativa entre os isolados de *Streptomyces* e o tipo de solvente utilizado no processo de extração das fenazinas ($p=0,001$). Os maiores níveis de produção de fenazinas foram obtidos quando os isolados bacterianos foram cultivados no meio sólido (Tabela 3). O isolado CLV16 e CLV103 apresentaram os níveis mais elevados de fenazinas totais extraídas em PBS (329,34 $\mu\text{g/mL}$ e 52,38 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), comparado ao CLV100.

Tabela 3 – Fenazinas totais extraídas de exsudatos de *Streptomyces* (CLV16, CLV100, CLV103 e CLV115), cultivados em meio de cultura líquido e meio sólido, utilizando diferentes solventes. O meio sólido foi extraído com Acetato de etila ou tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Médias (\pm SD) seguidas por letras distintas na coluna, diferem significativamente (Anova One Way, Tukey $p \leq 0,05$).

| Meio de cultura | Solventes | CLV16 | CLV100 | CLV103 | CLV115 |
|-----------------|---------------|---------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
| | | Fenazinas totais ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
| Líquido | Acetato | 3,25 (0,88) b | 6,96 (0,28) b | 0 b | 4,46 (0,31) b |
| | Butanol | 3,38 (0,59) b | 2,09 (0,49) c | 0 b | 4,02 (0,13) b |
| | Diclorometano | 3,02 (0,57) b | 0,78 (0,01) c | 0 b | 6,72 (0,81) a |
| Sólido | PBS-Agar | 329,34 (0,34) a | 0 d | 52,38 (1,13) a | 1,69 (0,01) c |
| | Acetato-Agar | 13,75 (0,31) b | 35,91 (6,85) a | 0 b | 8,37 (1,33) a |

As condições de cultivo e a densidade celular podem determinar a síntese de diferentes fenazinas pelos isolados de *Streptomyces* (Mentel et al., 2009). Neste sentido, os maiores níveis de PYO foram encontrados no isolado CLV16 (Figura 5) cultivado no meio sólido extraído com PBS (216,03 $\mu\text{g/mL}$) e extraído com Acetato de etila (6,11 $\mu\text{g/mL}$). Contudo, quando o CLV16 foi cultivado em meio líquido, os maiores níveis de PYO (2,16 $\mu\text{g/mL}$) foram detectados na extração com Acetato de etila. A síntese da PCA, conhecida como a molécula “core” das fenazinas, foi semelhante tanto no meio líquido (0,6 $\mu\text{g/mL}$) quanto no meio sólido (0,89 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, os maiores níveis de OH-Phe ocorreram no meio sólido extraídos com PBS-Agar (1,45 $\mu\text{g/mL}$) e Acetato-Agar (0,89 $\mu\text{g/mL}$), comparado ao cultivo líquido extraído com Acetato e

Diclorometano (0,61 a 0,7 µg/mL, respectivamente). Em diversas espécies de *Pseudomonas*, a PCA pode agir como molécula fungicida secretada pela bactéria no meio (Chin-A-Woeng et al., 2001) ou ser modificada e transformada pelo metabolismo em outras fenazinas, como a 1-hydroxyphenazine (1-OH-Phe), PYO e phenazine-1-carboxamide (PCN), através da ação de enzimas específicas (Hadla & Halabi, 2018).

De forma geral, o cultivo do isolado CLV100 em meio de cultura sólido, representou a maior síntese de fenazinas (Tabela 3), sendo a única condição em que foi possível obter a Phe (10,72 µg/mL) (Figura 6). Nestas condições, ocorreram também os maiores níveis de OH-Phe (9,08 µg/mL). Comparativamente, o solvente PBS representou a pior estratégia para extração do meio sólido. Segundo estes resultados, o cultivo em meio Ágar e a extração com Acetato de etila, representam as melhores estratégias para se obter fenazinas do isolado CLV 100.

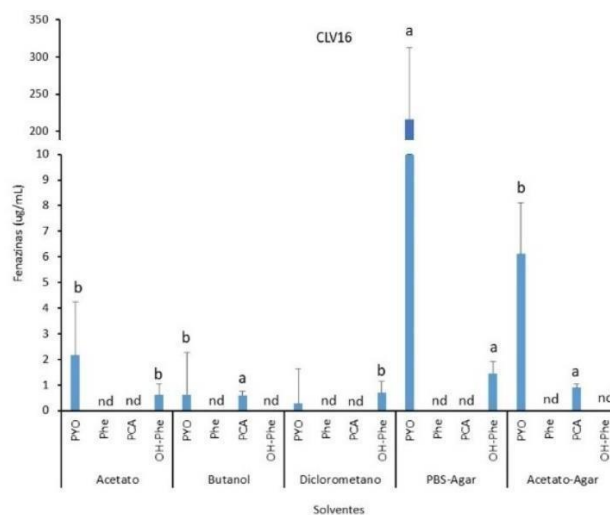


Figura 5 – Fenazinas presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV16 cultivado em meio líquido e sólido. PYO, Pyocyanin; Phe, Fenazina; PCA, ácido fenazina-1-carboxílico; OH-Phe, 1-hidroxil-fenazina. PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias da mesma fenazina nos diferentes solventes (ANOVA, Tukey $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

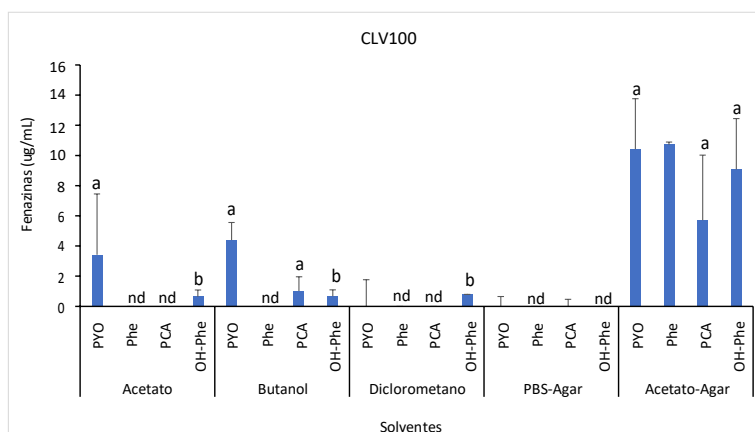


Figura 6 – Fenazinas presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV100 cultivado em meio líquido e sólido. PYO, Pyocyanin; Phe, Fenazina; PCA, ácido fenazina-1-carboxílico; OH-Phe, 1-hidroxil-fenazina. PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias da mesma fenazina nos diferentes solventes (ANOVA, Tukey $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

Os valores mais baixos de extração de fenazinas foi observado no isolado CLV 103 (Figura 7). Apenas a PYO (32,46 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi extraída quando utilizado o solvente PBS-Ágar. Da mesma forma, somente as fenazinas OH-Phe (1,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Phe (7,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram extraídas na condição Acetato-Ágar. As diferentes extrações das culturas líquidas não resultaram em níveis detectáveis de fenazinas. A ausência de detecção da PCA e PYO nas culturas líquidas chama atenção, pois a espera-se que ocorra a conversão em duas etapas da PCA em PYO através das enzimas PhzM (N-metilação) e PhzS (hidroxilação), segundo o modelo descrito para *Pseudomonas* (Huang et al., 2009). A conversão de PCA em PYO é sensível a condições ambientais e de cultivo. A produção de PCA e PYO em linhagens de *Pseudomonas* é fortemente afetada pela temperatura, produzindo maiores quantidades de PYO a 37°C, enquanto os maiores níveis de PCA são obtidos cultivando-se a 28°C (semelhante a temperatura do solo). Da mesma forma, a atividade de síntese pode ser controlada pela disponibilidade de oxigênio. A enzima PhzS necessita de oxigênio para sua atividade, enquanto as demais enzimas da via de síntese funcionam em condições de anoxia (Chincholkar & Thomashow, 2013). A PYO esteve sempre presente nos extratos obtidos do isolado CLV115 cultivado tanto no meio líquido quanto no sólido (Figura 8). A PCA (0,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi detectada somente no meio de cultura sólido. Da mesma forma, a OH-Phe ocorreu no meio sólido em concentrações que variaram de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PBS-Ágar) a 1,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Acetato-Ágar). Os resultados indicam que o Acetato de etila é o melhor solvente para extração de fenazinas do meio sólido.

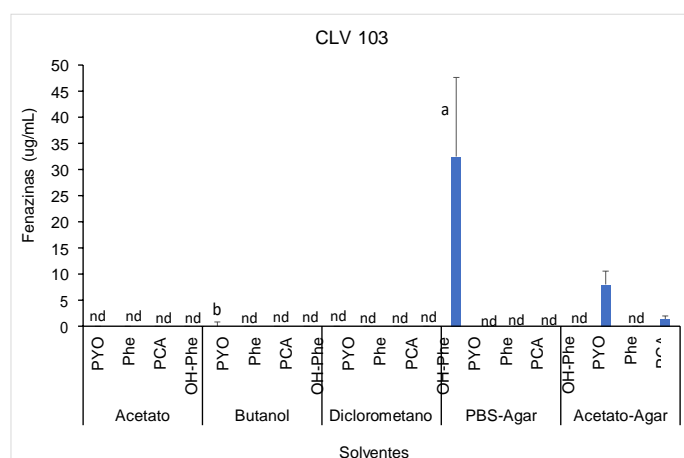


Figura 7 – Fenazinas presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV103 cultivado em meio líquido e sólido. PYO, Pyocyanin; Phe, Fenazina; PCA, ácido fenazina-1-carboxílico; OH-Phe, 1-

hidroxil-fenazina. PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias da mesma fenazina nos diferentes solventes (ANOVA, Tukey $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

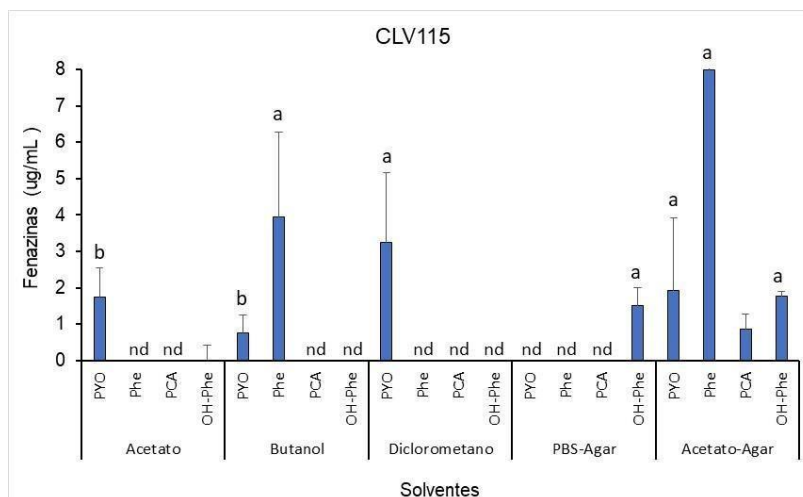


Figura 8 – Fenazinas presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV115 cultivado em meio líquido e sólido. PYO, Pyocyanin; Phe, Fenazina; PCA, ácido fenazina-1-carboxílico; OH-Phe, 1-hidroxil-fenazina. PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias da mesma fenazina nos diferentes solventes (ANOVA, Tukey $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

Fenazinas naturais são produzidas por uma variedade de bactérias, tais como as *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, *Burkholderia* e *Brevibacterium*. Apesar da diversidade de organismos produtores, as fenazinas não apresentam função direta no crescimento e no metabolismo energético da bactéria, atuando na adaptação e sobrevivência do organismo no ambiente (Laursen & Nielsen, 2004).

A regulação da síntese de metabólitos secundários é complexa. Frequentemente os microrganismos modificam o padrão de expressão de genes relacionados a produção de metabólitos em resposta a modificações do ambiente. Limitações nutricionais (fonte de C e N), temperatura, pH e outras condições estressantes são exemplos de estímulos externos que podem influenciar positivamente ou negativamente a produção destes compostos (Bibb, 2005). Em *Streptomyces lividans*, a produção do antibiótico actinorhodin é inibida quando o meio de cultura é suplementado com glicose acima de 0,1%. Contudo, em *Streptomyces coelicolor*, a síntese do metabólito actinorhodin é promovida na concentração de 2,5% glicose, e inibida quando os valores de glicose são superiores a 3,6% (Wohlleben et al., 2017). De forma semelhante, o pH do meio de cultura é capaz de modular a síntese de biocompostos em

Streptomyces albidoflavus, inibindo a síntese de compostos e o crescimento em pH 5 e 9 Narayana e Vijayalakshmi (2008).

3.6 Determinação de compostos indólicos em *Streptomyces*

A produção dos compostos indólicos: *Indole-3-acetaldehyde* (AIAD), *DL-indole-3-latic acid* (AIL), *Indole-3-carboxylic acid* (AIC) e *Indole-3-acetic acid* (AIA) foi determinada a partir de extrações dos exsudatos de *Streptomyces*. O CLV 16 produziu compostos indólicos nos exsudatos extraídos tanto de culturas líquidas quanto semissólidas (Figura 9). Os exsudatos apresentaram baixos níveis de AIL, variando de 0,008 µg/mL (Acetato-Agar) a 0,01 µg/mL (Butanol). Os maiores níveis de AIAD (1,94 µg/mL) ocorreram no meio sólido extraído com PBS. Os níveis de AIA foram semelhantes tanto no cultivo líquido quanto no sólido, apresentando concentrações que variaram de 0,09 µg/mL a 0,032 µg/mL no solvente Acetato-Agar e Butanol, respectivamente. Em *Pseudomonas syringae* DC3000, a síntese do AIA é limitada pela concentração do AIAD, indicando que o AIAD é o principal precursor da via de síntese desta auxina (McClerklin et al., 2018). O AIA é o composto indólico mais frequente na natureza, sendo que aproximadamente 80% das bactérias da rizosfera produzem esta molécula (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Dentre os diversos indólicos, a auxina é a mais conhecida. Ela age como molécula sinalizadora na interação planta-bactéria, promovendo a formação de raízes e tricomas, resultando no aumento da produção de exsudatos pela planta (Mohite, 2013).

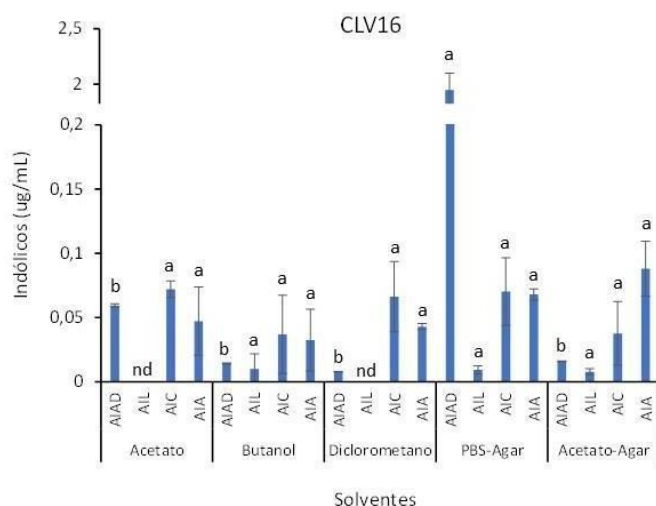


Figura 9 – Compostos indólicos presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV16 cultivado em meio líquido e sólido. AIAD (*Indole-3-acetaldehyde*), AIL (*DL-indole-3-latic acid*), AIC (*Indole-3-carboxylic acid*) e AIA (*Indole-3-acetic acid*). PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias do mesmo composto indólico, nos diferentes solventes (ANOVA, Duncan $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

De forma semelhante, os exsudatos do CLV100 apresentaram baixos níveis de AIL (Figura 10), variando de 0,007 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Acetato-Agar) a 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Acetato). Os níveis de AIAD foram extremamente baixos, tanto no meio líquido (0,027 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Diclorometano) quanto no sólido (0,017 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Acetato-Agar). O AIA estava presente de forma semelhante nos exsudatos extraídos tanto do meio líquido (0,073 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Butanol) quanto sólido (0,087 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Acetato-Agar). Alguns intermediários das vias biossintéticas do AIA podem ser reversivelmente convertidos em compostos de armazenamento, como a redução do AIAD em AIL, embora a função exata desses compostos não seja conhecida (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Os baixos níveis do composto intermediário AIAD, nos exsudatos do CLV100, podem ser atribuídos a sua conversão em AIA através de enzimas desidrogenases, como observado em *Streptomyces violaceus* e *S. exfoliatuz* (Manulis et al., 1994).

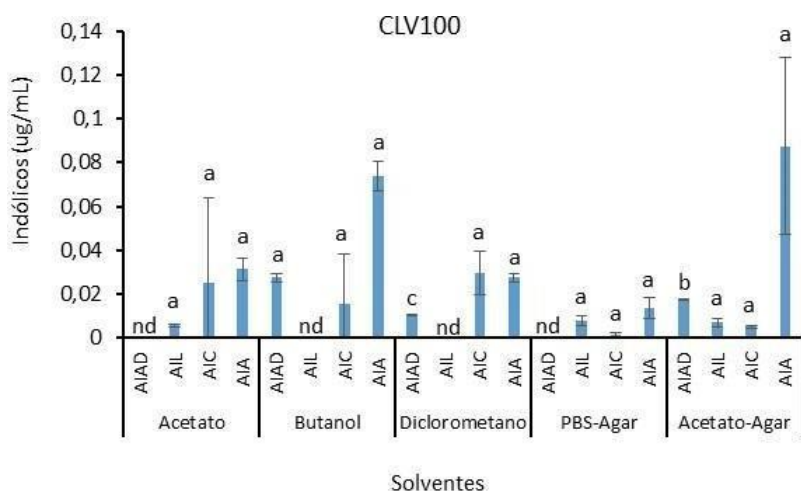


Figura 10 – Compostos indólicos presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV100 cultivado em meio líquido e sólido. AIAD (*Indole-3-acetaldehyde*), AIL (*DL- indole -3-lactic acid*), AIC (*Indole-3-carboxylic acid*) e AIA (*Indole-3-acetic acid*). PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias do mesmo composto indólico, nos diferentes solventes (ANOVA, Duncan $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

Análises dos exsudatos do CLV103 indicaram que os indólicos AIAD (0,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PBS-Agar) e o AIC (0,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Acetato-Agar) apresentaram as maiores concentrações (Figura 11). Quanto a auxina, o cultivo deste isolado em meio sólido resultou nos maiores valores médios do AIA (0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$), comparado aos valores médios (0,014 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos exsudatos extraídos do meio líquido.

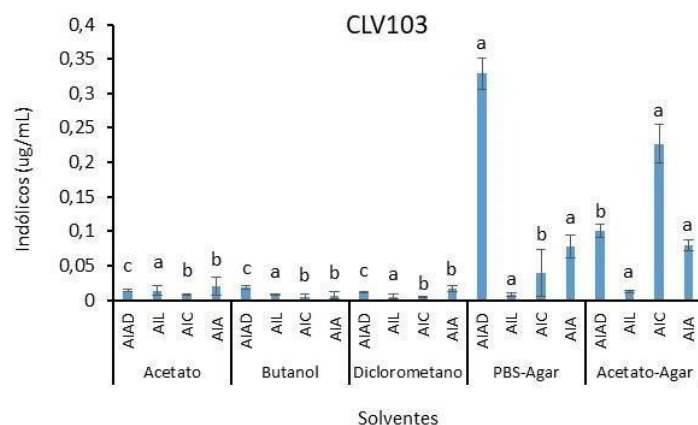


Figura 11 – Compostos indólicos presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV103 cultivado em meio líquido e sólido. AIAD (*Indole-3-acetaldehyde*), AIL (*DL-indole-3-lactic acid*), AIC (*Indole-3-carboxylic acid*) e AIA (*Indole-3-acetic acid*). PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias do mesmo composto indólico, nos diferentes solventes (ANOVA, Duncan $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

O isolado CLV 115 foi capaz de produzir a maioria dos compostos indólicos analisados, tanto no meio líquido quanto no sólido (Figura 12). O AIAD (1,56 µg/mL) e o AIC (0,7 µg/mL) foram encontrados em maiores concentrações nos exsudatos extraídos com PBS no meio sólido. Por outro lado, os níveis do AIA estavam abaixo da capacidade de detecção (extração PBS) ou em concentrações muito baixas (0,009 µg/mL Acetato-Agar). No meio de cultivo líquido, a maior concentração do AIAD foi de 0,05 µg/mL, obtida na extração com Acetato de etila. Nesta mesma condição de cultivo, os níveis de AIC foram extremamente baixos, variando de 0,0006 µg/mL (Diclorometano) a 0,0026 µg/mL (Butanol).

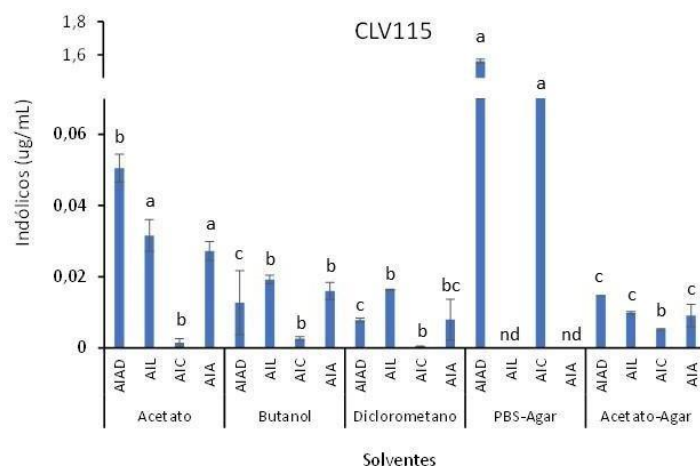


Figura 12 – Compostos indólicos presentes em exsudatos extraídos do isolado CLV115 cultivado em meio líquido e sólido. AIAD (*Indole-3-acetaldehyde*), AIL (*DL-indole-3-lactic acid*), AIC (*Indole-3-carboxylic acid*) e AIA (*Indole-3-acetic acid*). PBS, *Phosphate-Buffered Saline*. Barras indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa entre as médias do mesmo composto indólico, nos diferentes solventes (ANOVA, Duncan $p \leq 5\%$). nd, não detectado.

Os CLVs diferiram amplamente na capacidade de produção de compostos indólicos dependendo da condição de cultivo (meio líquido ou sólido) e do isolado avaliado. As variações na produção de AIA entre isolados pode ser atribuída às propriedades individuais inerentes de cada bactéria (Sarwar et al. 1992). Os compostos indólicos, além de participarem na via de síntese da auxina em bactérias e plantas, apresentam efeito antimicrobiano (Bordoloi et al., 2002; Matsuda et al., 1998). O AIC extraído de culturas de *Streptomyces* sp. TK-VL333, utilizando o solvente acetato de etila, apresentou efeito fungicida contra *Fusarium oxysporum* quando utilizado na concentração de 15 µg/mL (Kavitha et al., 2010). Da mesma forma, derivados do composto indólico ácido 3-indolepropionic apresentam efeito inibidor sobre *Ralstonia solanacearum* na concentração de 1 µg/mL (Matsuda et al., 1998). Embora o mecanismo da ação antimicrobiana de vários compostos indólicos ainda não é conhecida, muitos destes compostos são acumulados nos tecidos vegetais como resposta ao ataque de patógenos. Plantas de *Arabidopsis* acumulam AIC e indole-3-carbaldehyde após as raízes serem atacadas por *Pythium sylvaticum* (Bednarek et al., 2005; Tan et al., 2004). Da mesma forma, a inoculação de *Arabidopsis* com *Phytophthora infestans* promove o acúmulo de indole-3-acetonitrile e de três derivados do AIC no tecido foliar (Böttcher et al., 2009). No presente trabalho, não foram identificados efeitos antimicrobianos dos diferentes exsudatos contendo compostos indólicos sobre o fungo *S. sclerotiorum*. Apesar do potencial uso de compostos indólicos para o controle de fitopatógenos, algumas destas moléculas apresentam limitações devido ao efeito hormonal, inibindo o desenvolvimento vegetal (Matsuda et al., 1998).

Os compostos indólicos, produzidos por bactérias, estão envolvidos em vários processos microbianos, tais como *quorum sensing* e a formação de biofilme. Contudo, a ação destes compostos no desenvolvimento das plantas ainda é pouco compreendido, em comparação com o AIA (S. Gilbert et al., 2018). Embora grande parte das bactérias do solo sejam capaz de produzir AIA, o efeito deste indólico nas plantas depende do microrganismo. Nas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, o AIA pode promover o crescimento das raízes, levando ao aumento da absorção de nutrientes e a produção de exsudatos (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Contudo, em bactéria patogênicas, o AIA promove o desequilíbrio hormonal na planta, facilitando o desenvolvimento da doença. O aumento dos níveis do AIA em plantas de *Arabidopsis* promove o desligamento do sistema de defesa mediado pelo ácido salicílico e age como agente sinalizador promovendo a multiplicação de *Pseudomonas syringae* DC3000 (Djami-Tchatchou et al., 2020). Considerando que os isolados CLVs avaliados neste trabalho não possuem proximidade com espécies patogênicas (Figuras 13 e 14), espera-se que estas rizobactérias tenham capacidade de modular o crescimento vegetal através da síntese de compostos indólicos.

Referências:

- A B Nur Azura, M Yusoff, G Y A Tan, R Jegadeesh, D R Appleton, S Vikineswary, *Streptomyces sanglieri* which colonised and enhanced the growth of *Elaeis guineensis* Jacq. seedlings was antagonistic to *Ganoderma boninense* in in vitro studies, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 43, Issue 4, 1 April 2016, Pages 485–493, <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1724-4>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. In *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Antony-Babu, S., Stien, D., Eparvier, V., Parrot, D., Tomasi, S., & Suzuki, M. T. (2017). Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>
- Areias da Silva, R. E. (2006). AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Conyza bonariensis* (L) Cronquist. (RABO-DE-RAPOSA).
- Arseneault, T., Goyer, C., & Fillion, M. (2013). Phenazine production by *Pseudomonas* sp. LBUM223 contributes to the biological control of potato common scab. *Phytopathology*, 103(10), 995–1000. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0022-R>
- Arseneault, T., Goyer, C., & Fillion, M. (2015). *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 increases potato yield and reduces common scab symptoms in the field. *Phytopathology*, 105(10), 1311–1317. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0358-R>
- Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gualtieri, G., Noya, F., & Arias, A. (1998). Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10–11), 1317–1322. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00003-0)
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatoš, A., Oldham, N. J., & Hahlbrock, K. (2005). Structural Complexity, Differential Response to Infection, and Tissue Specificity of Indolic and Phenylpropanoid Secondary Metabolism in *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiology*, 138(2), 1058. <https://doi.org/10.1104/PP.104.057794>
- Bianco, C., & Defez, R. (2009). *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3097–3107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp140>
- Bibb M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>
- Boer, W. et al. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biology And Biochemistry*, Grã-bretanha, v. 30, n. 2, p.193-203, 1998.
- Bordoloi, G. N., Kumari, B., Guha, A., Thakur, D., Bordoloi, M., Roy, M. K., & Bora, T. C. (2002). Potential of a novel antibiotic, 2-methylheptyl isonicotinate, as a biocontrol agent against fusarial wilt of crucifers. *Pest Management Science*, 58(3), 297–302.

<https://doi.org/10.1002/ps.457>

- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., & Glawischnig, E. (2009). The Multifunctional Enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) Converts Cysteine-Indole-3-Acetonitrile to Camalexin in the Indole-3-Acetonitrile Metabolic Network of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *21*, 1830–1845. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066670>
- Bressan, W., & Figueiredo, J. E. F. (2003). *Controle de Fusarium moniliforme em sementes de milho por actinomicetos*.
- Camerini, S., Senatore, B., Lonardo, E., Imperlini, E., Bianco, C., Moschetti, G., Rotino, G. L., Campion, B., & Defez, R. (2008). Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. *Archives of Microbiology*, *190*(1), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0365-7>
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*, *247*(2), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.006>
- Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Amaral, L. S., & Garcia, F. A. (2009). Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. *Horticultura Brasileira*. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362009000300014>
- Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M. A. M., Teplow, D. B., Stevens, D., & Yaver, D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2675>
- Castillo, U., Harper, J. K., Strobel, G. A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, J. B., Porter, H., Robison, R., Millar, D., Hess, W. M., Condrón, M., & Teplow, D. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*, *224*(2), 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00426-9)
- Chaves, J. V., Ojeda, C. P. O., Silva, I. R. da, & Procopio, R. E. de L. (2017). Identification and Phylogeny of *Streptomyces* Based on Gene Sequences. *Research Journal of Microbiology*, *13*(1), 13–20. <https://doi.org/10.3923/jm.2018.13.20>
- Cheng, Z., McCann, S., Faraone, N., Clarke, J. A., Hudson, E. A., Cloonan, K., Hillier, N. K., & Tahlan, K. (2020). Production of Plant-Associated Volatiles by Select Model and Industrially Important *Streptomyces* spp. *Microorganisms*, *8*(11), 1767. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111767>
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2001). *Introduction of the phzH Gene of Pseudomonas chlororaphis PCL1391 Extends the Range of Biocontrol Ability of Phenazine-1-Carboxylic Acid-Producing Pseudomonas spp. Strains*. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.8.1006>
- Chincholkar, S., & Thomashow, L. (2013). Microbial Phenazines. In *Microbial Phenazines*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40573-0>
- Dalmas F. R., Pereira T. C. B., Bogo M. R., Astarita L. V. (2011) Autochthonous *Streptomyces* regulate the metabolism of seedlings of *Araucaria angustifolia* (Coniferales) during root colonisation. *Australian Journal of Botany* **59**, 118-

125. <https://doi.org/10.1071/BT10175>

- Deganello, J. (2012). Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum*. *Dissertação de Mestrado*.
- Demain, A. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 455–463. <https://doi.org/10.1007/s002530051546>
- Djami-Tchatchou, A. T., Harrison, G. A., Harper, C. P., Wang, R., Prigge, M. J., Estelle, M., & Kunkel, B. N. (2020). Dual role of auxin in regulating plant defense and bacterial virulence gene expression during *Pseudomonas syringae* PtoDC3000 pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(8), 1059–1071. https://doi.org/10.1094/MPMI-02-20-0047-R/ASSET/IMAGES/LARGE/MPMI-02-20-0047-R_F6.JPEG
- Egamberdiyeva, D., & Höflich, G. (2003). Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(7), 973–978. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00158-5)
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. E. S. J., & Sivasithamparam, K. (2009). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03926.x>
- Fleuri, L. F.; Sato, H. H.; Garcia, J. S.; Franco, T. T. Elucidação parcial da estrutura de aminogluconooligossacarídeos (AGO's) produzidos enzimaticamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, p. 111-116, 2009.
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. In *Plant Signaling and Behavior*. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F., & Kluepfel, D. (1995). Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15(1), 13–39. <https://doi.org/10.3109/07388559509150530>
- Gilbert, S., Xu, J., Acosta, K., Poulev, A., Lebeis, S., & Lam, E. (2018). Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweeds and endophytes. *Frontiers in Chemistry*, 6(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00265>
- Hadla, M., & Halabi, M. A. (2018). Effect of Quorum Sensing. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 81, 95–116. <https://doi.org/10.1016/BS.COAC.2018.02.004>
- Harrison, J., & Studholme, D. J. (2014). Recently published *Streptomyces* genome sequences. *Microbial Biotechnology*, 7(5), 373–380. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12143>
- Hohnadel, D.; Meyer, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 170, n. 10, p. 4865-4873, 1988.
- Huang, J., Xu, Y., Zhang, H., Li, Y., Huang, X., Ren, B., & Zhang, X. (2009). Temperature-Dependent Expression of *phzM* and Its Regulatory Genes *lasI* and *ptsP* in Rhizosphere Isolate *Pseudomonas* sp. Strain M18. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6568. <https://doi.org/10.1128/AEM.01148-09>
- Isik, K., Gencbay, T., Kocak, F. A., & Cil, E. (2014). Molecular identification of different actinomycetes isolated from East Black Sea region plateau soil by 16S rDNA gene

- sequencing. *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 878–887.
<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6174>
- Jepsen, T., Jensen, B., & Jørgensen, N. O. G. (2022). Volatiles produced by *Streptomyces* spp. delay rot in apples caused by *Colletotrichum acutatum*. *Current Research in Microbial Sciences*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100121>
- Kang, B. R., Han, S. H., Zdor, R. E., Anderson, A. J., Spencer, M., Yang, K. Y., Kim, Y. H., Lee, M. C., Cho, B. H., & Kim, Y. C. (2007). Inhibition of seed germination and induction of systemic disease resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6 requires phenazine production regulated by the global regulator, *gacS*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(4), 586–593.
- Karthik, N., Binod, P., & Pandey, A. (2015). Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology*, 188, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.006>
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., & Venkateswarlu, Y. (2010). Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333. *Research in Microbiology*, 161(5), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.011>
- Kennedy, R. K., Veena, V., Naik, P. R., Lakshmi, P., Krishna, R., Sudharani, S., & Sakhivel, N. (2015). Phenazine-1-carboxamide (PCN) from *Pseudomonas* sp. strain PUP6 selectively induced apoptosis in lung (A549) and breast (MDA MB-231) cancer cells by inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Apoptosis*, 20(6), 858–868.
<https://doi.org/10.1007/S10495-015-1118-0/FIGURES/7>
- Kern, S. E., & Newman, D. K. (2014). Measurement of phenazines in bacterial cultures. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_25
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., & Miller, T. D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11), 1078–1082. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-1078>
- Laursen, J. B., & Nielsen, J. (2004). Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chemical Reviews*, 104(3), 1663–1685.
<https://doi.org/10.1021/CRO20473J/ASSET/IMAGES/LARGE/CRO20473JH00010.JPEG>
- LEITE, A. V. W. H. (2017). Rizobactérias *Streptomyces* No Crescimento E Na Defesa De Plantas De *Solanum Lycopersicum* (L.). *Dissertação de Mestrado*, 1–61.
- Lins, M. R. D. C. R. (2014). SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DA CAATINGA COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL. *Dissertação de Mestrado*.
- Liu, D., Yan, R., Fu, Y., Wang, X., Zhang, J., & Xiang, W. (2019). Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2077.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02077>
- Lopes, L. de paula. (2011). Avaliação da atividade antibiótica in vitro de compostos extracelulares bacteriano sobre *Xanthomonas Axonopodis* e no controle da mancha foliar de eucalipto. *Dissertação de Mestrado*.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., & King, R. R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81(8), 836–846.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.8.836>

- Ma, K.-W., & Ma, W. (2016). Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Molecular Biology*, *91*(6), 713–725. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0452-0>
- Macagnan, D., Romeiro, R. D. S., Pomella, A. W. V., & DeSouza, J. T. (2008). Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) pernicioso* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control*, *47*(3), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.016>
- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., & Barash, I. (1994). Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology*, *140*(5), 1045–1050. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-5-1045>
- Matsuda, K., Toyoda, H., Nishio, H., Nishida, T., Dohgo, M., Bingo, M., Matsuda, Y., Yoshida, S., Harada, S., Tanaka, H., Komai, K., & Ouchi, S. (1998). Control of the Bacterial Wilt of Tomato Plants by a Derivative of 3-Indolepropionic Acid Based on Selective Actions on *Ralstonia solanacearum*. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 4416–4419. <https://doi.org/10.1021/jf980205f>
- Mavrodi, O. V., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2007). Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00925-07>
- McClerklin, S. A., Lee, S. G., Harper, C. P., Nwumeh, R., Jez, J. M., & Kunkel, B. N. (2018). Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathogens*, *14*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006811>
- Melo, I. S. de, & Valarini, P. J. (1995). Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). *Scientia Agricola*. <https://doi.org/10.1590/s0103-90161995000200020>
- Mentel, M., Ahuja, E. G., Mavrodi, D. V., Breinbauer, R., Thomashow, L. S., & Blankenfeldt, W. (2009). Of two make one: The biosynthesis of phenazines. In *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>
- Miranda, J. A. L., Rocha, J. A., Araújo, K. M., Quelemes, P. V., Mayo, S. J., & Andrade, I. M. (2015). Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_169
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *13*(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
- Narayana, K. J. P., & Vijayalakshmi, M. (2008). Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Research Journal of Pharmacology*, *2*(1), 4–7.
- Nicola G de Luca, Margaret Wexler, Maria J Pereira, Kay H Yeoman, Andrew W.B Johnston, Is the *fur* gene of *Rhizobium leguminosarum* essential?, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 168, Issue 2, November 1998, Pages 289–295, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13286.x>
- Pacios-Michelena, S., Aguilar González, C. N., Alvarez-Perez, O. B., Rodriguez-Herrera, R., Chávez-González, M., Arredondo Valdés, R., Ascacio Valdés, J. A., Govea Salas, M., &

- Ilyina, A. (2021). Application of Streptomyces Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.696518>
- Palacios, O. A., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2014). Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria-an overview. In *Biology and Fertility of Soils*. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0894-3>
- Pollak, F. C., & Berger, R. G. (1996). Geosmin and Related Volatiles in Bioreactor-Cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100121>
- Pullen, C., Schmitz, P., Meurer, K., Bamberg, D. D. V., Lohmann, S., De Castro França, S., Groth, I., Schlegel, B., Möllmann, U., Gollmick, F., Gräfe, U., & Leistner, E. (2002). New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. *Planta*, 216(1), 162–167. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0874-6>
- Raza, W., Ling, N., Liu, D., Wei, Z., Huang, Q., & Shen, Q. (2016). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiological Research*, 192, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.014>
- Robinette, D., & Matthyse, A. G. (1990). Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology*, 172(10), 5742–5749. <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.5742-5749.1990>
- Salgado, A. P. S. P., Cardoso, M. das G., Souza, P. E. de, Souza, J. A. de, Abreu, C. M. P., & Pinto, J. E. B. P. (2003). Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciência e Agrotecnologia*. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542003000200001>
- Salla, T. D., Ramos da Silva, T., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2014). *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of *Eucalyptus* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.10.008>
- Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231(September 2019), 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
- Sarwar, M., Arshad, M., Martens, D. A., & Frankenberger, W. T. (1992). Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant and Soil*, 147(2), 207–215. <https://doi.org/10.1007/BF00029072>
- Shimizu, M., Igarashi, Y., Furumai, T. et al. (2004). Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites. *J Gen Plant Pathol* 70, 66–68. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0082-7>
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Silva, L. A. da. (2017). Atividade Antioxidante e Antimicrobiana do Fracionamento Bioguiado do Extrato Etanólico do Caule e Atividade Leishmanicida e Citotóxica do Óleo Essencial das Folhas da Espécie *Banisteriopsis oxyclada* (A . Juss .) B . Gates. *Trabalho de Conclusão de Curso*.

- Silva, L. C. N., Costa, E. C. V., & Souza, L. I. O. (2012). *Potencial do gene htrA como marcador molecular para estudos filogenéticos e identificação de espécies de micobactérias*. 1–6.
- Sottorff, I., Wiese, J., Lipfert, M., Preußke, N., Sönnichsen, F. D., & Imhoff, J. F. (2019). Different secondary metabolite profiles of phylogenetically almost identical streptomyces griseus strains originating from geographically remote locations. *Microorganisms*, 7(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060166>
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–13.
- Tan, J., Bednarek, P., Liu, J., Schneider, B., Svatoš, A., & Hahlbrock, K. (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected Arabidopsis thaliana roots and leaves. *Phytochemistry*, 65(6), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.12.009>
- Tian, X., Cao, L., Tan, H. *et al.* Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro* . *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 303–309 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000023843.83692.3f>
- Toharisman, A., Suhartono, M. T., Spindler-Barth, M., Hwang, J. K., & Pyun, Y. R. (2005). Purification and characterization of a thermostable chitinase from Bacillus licheniformis Mb-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 733–738. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-4797-1>
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. In *Applied Biochemistry and Microbiology*. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Ventura, J. P., Casteliani, A. G. B., Vargas, H. A. H. S., Nobre, S., Melo, & Soares, I. (2018). *Actinobactérias Como Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos de Trigo*. 1–12.
- Vicente, C. M., Thibessard, A., Lorenzi, J. N., Benhadj, M., Hôtel, L., Gacemi-Kirane, D., Lespinet, O., Leblond, P., & Aigle, B. (2018). Comparative Genomics among Closely Related Streptomyces Strains Revealed Specialized Metabolite Biosynthetic Gene Cluster Diversity. *Antibiotics*, 7(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS7040086>
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of streptomyces spp. As endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040952>
- Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M., Wang, Y., Huang, Y., & Cui, H. (2013). Antifungal activity of volatile organic compounds from Streptomyces alboflavus TD-1. *FEMS Microbiology Letters*, 341(1), 45–51. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12088>
- Webster, G., Jones, C., Mullins, A. J., & Mahenthalingam, E. (2020). A rapid screening method for the detection of specialised metabolites from bacteria: Induction and suppression of metabolites from Burkholderia species. *Journal of Microbiological Methods*, 178(July), 106057. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106057>
- Wohlleben, W., Bera, A., Mast, Y., Stegmann, E. (2017). Regulation of Secondary Metabolites of Actinobacteria . In: Wink, J., Mohammadipanah, F., Hamed, J. (eds) *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_8
- Xu, Z., Wang, M., Du, J., Huang, T., Liu, J., Dong, T., & Chen, Y. (2020). Isolation of Burkholderia

sp. HQB-1, A Promising Biocontrol Bacteria to Protect Banana Against Fusarium Wilt Through Phenazine-1-Carboxylic Acid Secretion. *Frontiers in Microbiology*, 11(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.605152>

Yu, T. W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B. S., Hutchinson, C. R., & Floss, H. G. (1999). Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyke1. Yu TW, Shen Y, Doi-Katayama Y, Tang L, Park C, Moore BS, et al. processively. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9051>

Zamoum, M., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2017). Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings. *Biocontrol Science and Technology*, 27(6), 723–738. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1334257>

Zin, N. M., Sarmin, N. I. M., Ghadin, N., Basri, D. F., Sidik, N. M., Hess, W. M., & Strobel, G. A. (2007). Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00819.x>

CAPÍTULO III

1. Conclusões

- Os isolados CLV16, CLV100, CLV103 e CLV115 são eficientes no controle do desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, reduzindo em até 60% o crescimento micelial.
- Análises dos exsudatos produzidos pelos CLVs cultivados em meio sólido indicaram que o CLV16 possuía os maiores níveis de proteínas solúveis. Não foram detectadas proteínas nos CLV100 e CLV103.
- Os CLVs produzem os maiores níveis de compostos fenazinas quando cultivados em meio sólido, destacando-se o CLV16 como o mais produtivo. O isolado CLV103 produziu os níveis mais baixos de fenazinas, tanto no meio de cultura líquido quanto no sólido. Contudo, este isolado apresentou a mesma capacidade do CLV16 em inibir o fitopatógeno.
- Os CLVs produziram fenazinas com reconhecida capacidade antimicrobiana, tais como PYO (Pyocyanin), PCA (ácido fenazina-1-carboxílico) e Phe (Fenazina). Contudo, os exsudatos com estas moléculas não foram eficientes no controle de *S. sclerotiorum*.
- Os CLVs produziram compostos indólicos relacionados a síntese de auxina (AIA). O AIC (*Indole-3-carboxylic acid*) foi produzido em todas as condições de cultivo (líquido e sólido) e por todos os isolados. Esta molécula é reconhecida por apresentar ação antimicrobiana, além de participar da síntese do AIA. O isolado CLV103 apresentou os menores níveis de síntese de compostos indólicos no meio líquido.
- De forma geral, a auxina AIA ou o seu precursor imediato (AIAD), apresentaram os maiores níveis nos exsudatos de todos os CLVs, extraídos tanto do meio líquido quanto do sólido.
- A ausência de atividade antimicrobiana nos exsudatos dos CLVs sugere que os compostos inibidores podem ser instáveis e terem sido degradados no processo de obtenção das frações semi-purificadas.
- Não foi possível determinar o mecanismo utilizado pelas CLVs na inibição de *S. sclerotiorum*. Contudo, sugere-se que esta inibição possa ocorrer de forma indireta, através de competição por nutrientes. Possivelmente devido a síntese de sideróforos.

2. Perspectivas

Considerando os resultados obtidos até este momento, vislumbra-se a necessidade de investigar aspectos-chave que possam indicar qual estratégia as CLVs utilizam para inibir o crescimento de *S. scleotiorum in vitro*. Para tanto, deve-se:

- Determinar a capacidade dos CLV16, CLV100, CLV103 e CLV115 em sintetizar sideróforos utilizando o meio LB-CAS.
- Avaliar a antibiose em meios de cultura suplementados com elevados níveis de ferro, visando determinar a existência de inibição por competição de nutrientes (sideróforos).
- Avaliar a presença de enzimas quitinases no meio de cultura sólido utilizando como substrato quitina coloidal suplementada ao meio.
- Avaliar a fitotoxicidade de exsudatos semi-purificados de *Streptomyces* em plantas de soja.
- Determinar a indução de resistência em plantas de soja aspergidas com exsudatos e desafiadas com *S. scleotiorum*.