

stricto
SENSU
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

***STREPTOMYCES* DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA:
EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E NO METABOLISMO
DE PLÂNTULAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*
(BERTOL.) KUNTZE**

FERNANDO ROSTIROLLA DALMAS
PORTO ALEGRE, 2010

PUCRS

 **PRPPG**
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

***STREPTOMYCES* DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA:
EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E NO METABOLISMO
DE PLÂNTULAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*
(BERTOL.) KUNTZE**

FERNANDO ROSTIROLLA DALMAS

ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO VIEIRA ASTARITA

PORTO ALEGRE, RS
JUNHO, 2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FERNANDO ROSTIROLLA DALMAS
ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO VIEIRA ASTARITA

***STREPTOMYCES* DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA:
EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO E NO METABOLISMO
DE PLÂNTULAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*
(BERTOL.) KUNTZE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

PORTO ALEGRE, RS
JUNHO, 2010

AGRADECIMENTOS

Caros leitores, a dissertação abaixo é, por enquanto, a minha principal obra científica. É resultado de muitas parcerias interdisciplinares que ocorreram desde o seu planejamento até a sua conclusão. Neste trabalho, buscou-se promover uma grande troca de experiência entre os profissionais que compõem o meio científico, não só da PUCRS, mas também da UFRGS, pois além de contribuírem na execução metodológica do trabalho, geraram grandes debates construtivos.

Um dos pilares desse trabalho foi aquele que sentou ao meu lado e disse assim: vamos? Pois é Dr. Leandro Astarita cá estamos; dois anos se passaram e agora chegou a hora em que quero muito agradecer, mais uma vez, a oportunidade oferecida, a confiança, a dedicação, a amizade, a compreensão, os conselhos, as experiências e os ensinamentos científicos e filosóficos da nossa parceria de longa data (6 anos). Levarei sempre comigo a sua postura e dedicação profissional, pois tu sabes, és o “co-autor” da minha formação!! Muito obrigado pela ótima convivência!!!

Agradeço também a Dra. Eliane Santarém, a qual representa um exemplo de competência profissional a ser seguido! Sempre esteve disposta a me auxiliar, informar, discutir, instigar e ensinar. Eliane, muito obrigado pela ótima convivência e oportunidade profissional!!

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal pelo apoio, compreensão, ajuda e boas risadas. Obrigado Janaína Belquis, Calino Pacheco, Juliana Gerhardt, Marco Gadegast, Lauren Bertholdo, Tamiris Salla, Tiago Sartor, Tiago Ferraz, Karen Freitas, Thanise Silva e Camila Santos. Que convivência intensa essa hein?!?

À Talita Pereira pela gigante amizade, carinho, paciência, auxílio, preocupação e paciência!! És o meu braço direito, esquerdo e as duas pernas.

Ao Laboratório de Biologia Genômica e Molecular pelo auxílio e identificação molecular dos isolados utilizados; em especial a Cladinara Sarturi, Cristine Trinca, Talita Pereira e Maurício Bogo.

Aos profissionais e professores: Cláudio Mondin (botânica), Renata Medina (microbiologia), Ricardo Mello (ecologia), Ricardo Cazanova (microbiologia), João Feliz (estatística) e Jorge Mariath (botânica) pelos conselhos metodológicos compartilhados.

A comissão examinadora da dissertação, composta pelo Dr. Luis Fernando da Costa Medina (UNISINOS), Dra. Lucia Rebello Dillenburg (UFRGS) e Dr. Carlos Alexandre S. Ferreira (PUCRS) - relator – pelo comprometimento e avaliação da dissertação no período proposto. Suas sugestões foram muito importantes para o aprimoramento do trabalho. Muito Obrigado!!!

A minha família e amigos pela preocupação, compreensão e assistência.

A CAPES, que concedeu a bolsa de estudos e que possibilitou a elaboração e realização do meu mestrado.

RESUMO

Araucaria angustifolia, conhecida como Pinheiro Brasileiro, é uma espécie ameaçada de extinção de grande importância ecológica e econômica. Embora muitos esforços foram feitos para estabelecerem plantios comerciais desta espécie, ela apresenta crescimento lento e heterogêneo, com alta mortalidade. As plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) representam uma classe de bactérias de solo não patogênicas que promovem efeito benéfico no crescimento do vegetal, destacando-se as actinobactérias do gênero *Streptomyces*. O trabalho avaliou o efeito de três isolados autóctones de *Streptomyces* spp. (PM1, PM4 e PM9) no desenvolvimento e no metabolismo inicial de plântulas de *Araucaria angustifolia* com 50 dias de idade. A atividade enzimática da fenilalanina amônio-liase (FAL), polifenol oxidase (PPO), peroxidase (POX) e os níveis de compostos fenólicos, flavonóides e clorofila foram determinados em extratos de raízes e folhas das plântulas. As análises foram realizadas em 1, 3 e 9 dias após a inoculação das raízes com as rizobactérias. O comprimento e a massa fresca da parte aérea e radicular assim como o volume e densidade das raízes foram avaliados após 100 dias da inoculação. Todos *Streptomyces* spp. apresentaram competência rizosférica e a capacidade de produzir ácido indol-3-acético (AIA). As atividades da PPO e POX exibiram regulação tecido-temporal na presença dos isolados; entretanto não foram alterados no período analisado os níveis de fenólicos, flavonóides e clorofila. A atividade da FAL foi reduzida somente 9 dias após a inoculação do isolado PM9. O volume, densidade e comprimento das raízes foram alterados nas plântulas inoculadas com as rizobactérias durante 100 dias. PM9 foi o isolado que promoveu as maiores alterações no metabolismo vegetal, aumentando o incremento da parte aérea.

Palavras-chave: araucária, *Streptomyces*, PGPR, metabolismo e desenvolvimento vegetal.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze, known as Brazilian pine, is an endangered species with great ecological and economic importance. Although many efforts have been made to establish commercial plantations of this species, it grows slowly and unevenly, with high mortality. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), including some *Streptomyces* (actinobacteria), represent a class of non-pathogenic soil microorganisms and have a beneficial effect on plant growth. This study evaluated the effect of three autochthonous *Streptomyces* spp. isolates (PM1, PM4, and PM9) on the early development and metabolism of 50-day-old *A. angustifolia* seedlings. The enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), and peroxidase (POX), and the levels of phenolic compounds, flavonoids, and chlorophyll were determined in extracts of roots and leaves from seedlings. Assays were carried out 1, 3 and 9 days after the roots were inoculated with each isolate. Length and fresh mass of shoots and roots as well as the volume and density of roots were evaluated at 100 days after seedlings inoculation. All *Streptomyces* spp. evaluated showed rhizospheric competence and produce indole-3-acetic acid (IAA). The activities of PPO and POX exhibited a tissue-temporal regulation in the presence of the isolates; however the levels of phenolics, flavonoids and chlorophylls did not change in the period analyzed. PAL activity was reduced only 9 days after root inoculation with PM9. The volume, density and length of roots changed in seedlings that were in contact with isolates for 100 days. The isolate PM9 caused significant changes in plant metabolism, increasing the shoot increment.

Keywords: Brazilian pine, *Streptomyces*, PGPR, plant metabolism, plant development.

ÍNDICE

CAPÍTULO I – Introdução e Objetivos.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA	8
1.1.1. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA.....	9
1.1.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	11
1.1.3. VULNERABILIDADE.....	11
1.1.4. PRINCIPAIS PROBLEMAS NO REFLORESTAMENTO COM ARAUCÁRIA.....	12
1.1.5. MICORRIZAS EM ARAUCÁRIA	14
1.2. RIZOSFERA.....	16
1.2.1. RIZOBACTÉRIAS	17
1.2.2. PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA – PGPR	17
1.2.2.1. MYCORRHIZATION HELPER BACTERIA – MHB	19
1.2.2.2. <i>STREPTOMYCES</i>	20
1.3. METABOLISMO RELACIONADO À DEFESA VEGETAL	22
2. HIPÓTESE	24
3. OBJETIVO GERAL	24
3.1. Objetivos Específicos	24
CAPÍTULO II – Manuscrito Submetido para Publicação	25
CAPÍTULO III – Considerações Finais.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS.....	69
ANEXO I – Material Suplementar.....	70
ANEXO II – Comprovante de Submissão do Manuscrito.....	75

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze foi descrita cientificamente em 1820, pelo naturalista italiano Antonio Bertoloni, o qual a nomeou como *Columbea angustifolia*. Em 1822, o botânico francês Achille Richard também descreveu a espécie como *Araucaria brasiliensis*. Contudo, em 1893, Otto Kuntze reclassificou-a como *Araucaria angustifolia* (TROPICOS, [19--]). Popularmente é conhecida como araucária, pinheiro, pinho, pinheiro-do-Paraná, pinheiro-brasileiro ou pinheiro-das-Missões (REITZ & KLEIN, 1966; FERREIRA, 1977; MARCHIORI, 1996).

Pertence à ordem Coniferales, agrupamento de maior importância econômica e ecológica das gimnospermas. Os integrantes dessa ordem carregam suas sementes em estruturas especiais denominadas de cones, os quais auxiliam na proteção, polinização e dispersão de suas sementes (autocoria) (JUDD et al., 2009). Sua família Araucariaceae, originária do período Triássico, tornou-se exclusiva do hemisfério sul, ocorrendo predominantemente nas zonas subtropicais em função do seu condicionamento ao clima (KERSHAW & WAGSTAFF, 2001; PUCHALSKI et al., 2006). Na América do Sul, a espécie apresenta distribuição restrita aos países Argentina, Paraguai e Brasil, ocorrendo, no último, em grandes concentrações no estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Há também, esparsos fragmentos no estado de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo, onde a araucária compensa o clima tropical com a ocorrência em maiores altitudes (BACKES, 1999). Desta forma, são encontradas variações populacionais quanto à coloração e época de amadurecimento das sementes, disposição de ramos e tamanho das folhas (KOCH & CORRÊA, 2002), que para Reitz e Klein (1966) são variedades de *A. angustifolia*.

1.1.1. Importância Ecológica

Araucaria angustifolia constitui a espécie predominante da Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como Floresta com Araucária, bioma da Mata Atlântica (MMA, 2002). Sua floresta é reconhecida como um conjunto vegetacional de fisionomia característica, contendo a associação das florestas tropical afro-brasileira e a temperada austro-brasileira (GUERRA et al., 2003). Desta forma, seu ecossistema apresenta riquíssima biodiversidade, sendo a araucária a espécie-chave entre centenas de espécies vegetais e animais.

Durante o seu estabelecimento, as plântulas de araucária podem se desenvolver muito bem ao sol e ao sombreamento (55-90 %), o que demonstra a sua grande capacidade de tolerância quanto à disponibilidade de radiação fotossinteticamente ativa (DUARTE & DILLENBURG, 2000; FRANCO & DILLENBURG, 2007). Desta forma, as plântulas de araucária podem tanto colonizar novas áreas quanto se regenerar no sob-bosque da floresta. Essa regeneração natural ocorre com a rápida germinação de suas sementes recalcitrantes, formando um banco de plântulas da espécie no sub-bosque a espera de condições mais favoráveis para o seu desenvolvimento (DUARTE et al., 2002). Essas características plásticas da espécie permitiram concluir ao Duarte et al. (2002) que a araucária não é necessariamente heliófila e pioneira, como descrito por Reitz e Klein (1966). Uma vez estabelecida, a araucária possibilita o aumento da densidade populacional das árvores do sub-bosque, tornando-se fundamental para a dinâmica deste ecossistema, promovendo maior riqueza de espécies arbóreas (RIBEIRO et al., 2007).

Atualmente, nota-se um avanço gradual da espécie sobre os campos em conjunto com outras espécies. Behling et al. (2004) verificaram que a Floresta com Araucária iniciou a sua migração a partir das matas de galeria localizadas aos longos dos rios a 4.320-3.210 anos atrás, como reflexo das alterações climáticas ocorridas no período Holoceno. Aos poucos, essas florestas foram substituindo os campos já existentes, sendo as datas marco da expansão

para os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná de 1.000, 1.100 e 1.500 anos atrás, respectivamente.

Além disso, muitas das teias alimentares que ocorrem na Floresta Ombrófila Mista estão intimamente relacionadas com a semente da araucária: o pinhão (Figura 1). Esta é envolta por uma escama ovulífera (bráctea escamiforme fértil), a qual sustenta um óvulo em sua base: o megagametófito após fecundação. Sobre esta escama, solda-se a escama de cobertura (bráctea superior infértil), que se unem formando o pinhão (ROSADO et al., 1994; ANSELMINI, 2005). Entretanto, acredita-se que há mais envoltórios que compõem a semente de araucária, sendo necessários estudos a respeito. Muitos animais a utilizam como importante fonte alimentícia, coincidindo muitos períodos reprodutivos com a maturação da semente (KOCH & CORRÊA, 2002), a qual é rica em amido (FERREIRA, 1977). A diversidade de animais que dependem desta espécie é tão diversificada que compreende desde pequenos insetos, como formigas (BMBF PROJEKT ARAUKARIENWALD, [2001]), até grandes predadores, como o puma e o homem (REITZ & KLEIN, 1966; THOME, 1995).

Ressalta-se ainda, a impressionante interdependência desse ecossistema. Classificada como estratégia evolutiva, a zoocoria é a principal responsável pela disseminação do pinhão, uma vez que seu peso fresco está entre 5,67 e 12,65 g em média (FERREIRA, 1977; ANSELMINI, 2005), o que dificulta a sua dispersão anemófila e caracteriza a sua regeneração como um padrão agregado (REITZ & KLEIN, 1966; PALUDO et al., 2009).

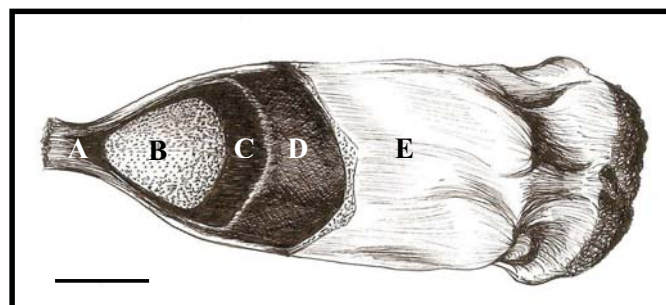


Figura 1. Representação dos envoltórios da semente (pinhão) de *A. angustifolia*. (A) escama ovulífera; (B) megagametófito; (C) e (D) não identificados; (E) escama de cobertura. Barra = 1 cm. Arte: Tiago Ferraz da Silva.

1.1.2. Importância Econômica

A araucária, por ser uma árvore de características marcantes, tanto nos indivíduos jovens quanto adultos, proporciona ao homem diversos usos econômicos. As plantas jovens podem ser utilizadas como adornos de jardins e parques, pois seu formato cônico da copa torna-a muito elegante (REITZ & KLEIN, 1966). As plantas adultas são praticamente aproveitáveis por completo. Suas sementes, ricas em amido, gordura e proteínas (FERREIRA, 1977), complementam a alimentação da população da região sul do Brasil. A resina serve de base para a fabricação de vernizes, terebentina, acetona e outros produtos químicos com variadas aplicações industriais (THOME, 1995). Seus galhos e “nó-de-pinho” servem de lenha.

Entretanto, é a qualidade da madeira que torna a *Araucaria angustifolia* economicamente importante. Com a chegada dos imigrantes em 1920, ocorreu o aumento da procura e da oferta da madeira da araucária. A exploração desta espécie tornou-se tão interessante que, além de tábuas, iniciou-se a produção de móveis, esquadrias e pasta mecânica (papel), muito exportada durante a Segunda Guerra Mundial (THOME, 1995; MARCHIORI, 1996). Entre 1915 e 1960, o Brasil exportou aproximadamente 18,5 bilhões de metros cúbicos de madeira. O período seguinte da expansão foi marcado pela exaustão das araucárias e o início do plantio de espécies exóticas, pois estas ofereciam maior homogeneidade no crescimento e um retorno econômico em curto prazo (THOME, 1995; GUERRA et al., 2003).

1.1.3. Vulnerabilidade

Impulsionada pela economia, a intensa exploração de imensas áreas da Floresta com Araucária promoveram um profundo desequilíbrio ambiental. A fauna deste ecossistema foi

alterada devido ao isolamento das áreas remanescentes e a dinâmica sucessional da flora foi comprometida pela retirada da araucária (KOCH & CORRÊA, 2002). Calcula-se que 95-98% desse bioma foi consumido pelo intenso ritmo de desmatamento, restando 5-2% da superfície originalmente ocupada (MMA, 2002; GUERRA et al., 2003). Além disso, as árvores de araucária iniciam o seu ciclo reprodutivo entre 10 e 20 anos de idade (SOUSA & HATTEMER, 2003). Cada ciclo compreende o intervalo de 29 a 34 meses, na qual inicia com a formação microscópica dos androstróbilos e ginostrobilos (estruturas reprodutivas masculinas e femininas, respectivamente) até a maturação e queda dos pinhões (ANSELMINI, 2005). Há também, registros de oscilação entre o número médio de ginostrobilos produzidos pelas plantas no decorrer dos anos, que reflete no número de sementes (pinhões) produzidos (MANTOVANI et al., 2004) e que consequentemente interferem na taxa de regeneração da espécie.

A Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção categorizou a *Araucaria angustifolia* como vulnerável (IBAMA, 1992). Nesta categoria são incluídas as espécies que, entre outras características, apresentam uma redução $\geq 30\%$ do tamanho populacional durante quaisquer dez anos. Mais recentemente, a araucária foi classificada como criticamente em perigo pela Red List of Threatened Species (IUCN, 2010).

1.1.4. Principais Problemas no Reflorestamento com Araucária

Após intensos anos de exploração descontrolada, projetou-se o esgotamento das reservas de araucária no Brasil. Desde então, políticas de reflorestamento foram implantadas visando o manejo sustentável da espécie.

Aos poucos, foram surgindo dificuldades no cultivo da araucária em função do baixo custo-benefício do estabelecimento de florestas comerciais. O índice de mortalidade das plântulas é elevado e seu desenvolvimento é demorado (ZANDEVALLI, 2004). Suas

sementes apresentam pouca longevidade (EIRA, 1994; AMARANTE, 2007), com perda total de viabilidade até um ano após a colheita (FERREIRA, 1977; CAÇOLA, 2006). Durante muitos anos, o insucesso dos plantios da araucária foi creditado ao manuseio indevido das mudas, devido à ruptura da raiz principal durante o transporte ou o plantio (CARVALHO, 1994). Entretanto, algumas características morfológicas, como a ausência de alocação de biomassa entre a parte aérea e radicular e o crescimento lento, revelam a dificuldade de adaptação nutricional das plântulas desta espécie (DUARTE & DILLENBURG, 2000; MÓSENA & DILLENBURG, 2004). Sabe-se que estes sistemas radiculares apresentam dificuldades em captarem ou explorarem os minerais presentes nos solos, indicando uma dependência micorrízica (JANOS, 1980). Por isso, o solo é um dos aspectos mais problemáticos para reflorestamentos com a araucária, pois deve ser fértil e apresentar boa disponibilidade hídrica. Com relação ao nível de compactação e profundidade do solo, Mósená e Dillenburg (2004) e Korndorfer et al. (2008) observaram que o sistema radicular das plântulas de araucária apresentam alta plasticidade adaptativa a barreiras físicas que limitam o crescimento de sua raiz pivotante, sem, no entanto, prejudicar o crescimento da parte aérea quando há oferta de água e nutrientes.

Em áreas de plantio é usual a superlotação de sementes por hectare (6 a 12 mil sementes/ha), pois só alguns indivíduos vigoram (CARVALHO, 1994). Além disso, esses povoamentos apresentam grande heterogeneidade de desenvolvimento, pois há exemplares com alturas e incremento volumétricos bastante variados no mesmo regime climático. Há plantios no sul do Estado do Paraná que apresentam incremento anual de até 20 m³/ha e outros incrementos de apenas 13 m³/ha (GUERRA et al., 2003), sendo a baixa flexibilidade de captação de nutrientes o fator principal.

Visando reduzir a variabilidade genética das plantas utilizadas nos reflorestamentos, foram iniciados programas de multiplicação vegetativa por enxertia. Contudo, esta técnica apresentou muitas dificuldades devido às plantas apresentarem crescimento lateral

(plagiotropismo) e diâmetros incompatíveis entre o porta-enxerto e o enxerto (CARVALHO, 1994). Recentemente, Anselmini e Zanette (2008) comprovaram que a microenxertia é eficiente e factível para autoenxertia em araucária.

Assim, o baixo interesse na prática da silvicultura da araucária resultou em limitados estudos de doenças associadas a esta espécie. Sabe-se que a araucária é destituída de doenças específicas, sendo atacada pelos mesmos patógenos que provocam doenças em *Pinus* e em *Eucalyptus*. Somente em 1997, pesquisadores da Embrapa Florestas identificaram no estado do Paraná oito patógenos da araucária: *Fusarium* sp., *Phellinus* sp., *Armillaria* sp., *Cylindrocladiella* sp., *Phellinus* sp., *Pestalotia* sp., *Hendersonula* sp. e *Aureobasidium pullulans*. Estes pesquisadores diagnosticaram que os fungos *Fusarium* sp. e *Phellinus* sp., causadores da podridão em raízes, são os principais patógenos impactantes na silvicultura da araucária, pois quando os sintomas são diagnosticados nas folhas (clorose), o sistema radicular já se encontra profundamente comprometido (EMBRAPA FLORESTAS, [19--]b). Além destes patógenos, o fungo *Cylindrocladium clavatum*, identificado em plantas de *Eucalyptus saligna*, *Araucaria angustifolia* e *Pinus* sp., também apresenta grande impacto, promovendo a podridão das raízes (DIANESE et al., 1986). Desta forma, além das limitações impostas pelo ambiente físico, a existência de agentes patogênicos no solo pode agir reduzindo o sucesso no estabelecimento de reflorestamentos em grandes extensões.

1.1.5. Micorrizas em Araucária

A palavra micorriza exprime a estreita relação benéfica existente entre as raízes da maioria das plantas terrestres e determinados fungos presentes na rizosfera (SMITH & READ, 1997). Estes fungos micorrízicos desempenham um papel fundamental no estabelecimento e no desenvolvimento das gimnospermas, visto que 100% das espécies apresentam esta associação simbiótica. Esta interação simbiótica provavelmente influenciou a colonização

terrestre dos vegetais, pois potencializa a captação de água e minerais pelas raízes através do aumento de volume de solo explorado pelas hifas (SOUZA et al., 2005), que em troca recebem carboidratos e aminoácidos (MEINICKE, 1991). Suas ações podem ser significativas na ciclagem e absorção de nutrientes (SMITH & READ, 1997). Experimentos demonstraram que muitas destas interações reduzem o ataque de fungos fitopatogênicos, pois algumas micorrizas produzem antibióticos que inibem o crescimento destes fungos (GARBAYE, 1994; HAHN, 1996).

Em araucária, a infecção de endomicorrizas nas suas raízes é confirmada em muitos trabalhos (BREUNINGER, 1997; BMBF PROJEKT ARAUKARIENWALD, [2001]; MOREIRA-SOUZA et al., 2003; ZANDAVALLI et al., 2004; MOREIRA et al., 2007a, 2007b), não ocorrendo ectomicorrizas (ANDRADE et al., 2000; MOREIRA et al., 2007a). Endomicorrizas são fungos simbioses obrigatórios (LABEDA, 1990), possuem hifas penetrantes em células corticais de raiz onde desenvolvem estruturas características de arbúsculos e/ou vesículas (SOUZA et al., 2005). Tal motivo identifica as endomicorrizas como micorrizas vesiculares-arbusculares (MVA). As hifas não promovem alterações morfológicas visíveis (MEINICKE, 1991), pois os arbúsculos e vesículas se desenvolvem no meio intracelular, podendo o último ocorrer no meio intercelular (SMITH & READ, 1997). Especula-se que são os responsáveis pela transição das plantas aquáticas para o hábito terrestre, pois há registros fósseis dessa infecção neste período (STRACK et al., 2003).

Recentemente, descobriu-se que a araucária é uma planta micotrófica dependente de MVA para se desenvolver (MOREIRA-SOUZA & CARDOSO, 2002). Comparações entre áreas nativas e reflorestadas com araucária demonstram significativas diferenças qualitativas de esporos de MAV no solo (MOREIRA-SOUZA et al., 2003; MOREIRA et al., 2007b; ZANDAVALLI, et al., 2008). Entretanto, diferentes fatores podem influenciar o ciclo de vida das MAV como a estação do ano, exudado das raízes, luminosidade e o histórico das áreas analisadas e, portanto sendo difícil estabelecer padrões de distribuição dos fungos

micorrízicos (MOREIRA et al., 2007a; ZANDEVALLI, et al., 2008). Cada infecção por micorrizas influencia o nível de absorção de nutrientes pela planta. Zandavalli et al. (2004) constatou que araucárias infectadas com *Glomus clarum*, em casa de vegetação, apresentaram resultados superiores aos controles quanto à altura (3,6 vezes) e massa acumulada na parte aérea (312 %). O estabelecimento de associações entre fungos micorrízicos e plantas pode representar uma redução de custos de produção e de manutenção das mudas nas áreas de reflorestamento.

Além de fungos micorrízicos, a rizosfera possui diversos outros componentes que podem interagir com a araucária. Neste sentido, as rizobactérias podem tanto promover diretamente o crescimento das raízes através da síntese de auxina quanto favorecer a micorrização radicular.

1.2. Rizosfera

Os solos de floresta são ambientes dinâmicos e complexos, essencialmente pela riqueza e diversidade da microbiota, dada a grande abundância de espécies vegetais e acúmulo de material orgânico (BARRETA, 2007). A rizosfera constitui a região de contato do solo com as raízes das plantas, a qual é caracterizada pela intensa atividade microbiana. Neste local, a microbiota é mais intensa do que em outras regiões do solo, pois neste habitat as raízes estão continuamente produzindo e secretando compostos ricos em carbono - exudados - que servem de nutrição para estes microorganismos (CRAWFORD et al., 1993; GARBAYE, 1994; COMPANT et al., 2005) e que determinam as interações com as plantas (NIRANJAN RAJ et al., 2006; BAIS et al., 2006; VAN DER ENT et al., 2009).

1.2.1. Rizobactérias

A rizosfera das plantas é uma zona onde as bactérias, chamadas de rizobactérias, exibem intensa colonização radicular em microflora nativa (ZEHNDER et al., 2000). As plantas exercem uma forte influência na diversidade e densidade destes microrganismos (GARBAYE, 1994; BARETTA, 2007). Suas raízes exudam na rizosfera compostos do seu metabolismo secundário (MEINICKE, 1991) que representam uma importante fonte de alimentação para alguns organismos, incluindo fitopatógenos (COMPANT et al., 2005). Estas rizobactérias se modificam ao longo do tempo em função das alterações dos exudados produzidos, sendo selecionados a cada momento subpopulações de rizobactérias adaptadas (DEKKERS et al., 1998).

1.2.2. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* – PGPR

As bactérias PGPRs constituem grupos heterogêneos de bactérias não patogênicas, endofíticas ou não, associadas às raízes de planta que promovem efeito benéfico no crescimento dos vegetais (BENT, 2006). Devido à sua grande capacidade de produzir moléculas biologicamente ativas, várias espécies podem estimular o aumento da capacidade fotossintética (ZHANG et al., 2008), a tolerância a estresses abióticos, facilitar a micorrização, fixar nitrogênio, solubilizar fósforo, produzir sideróforos, auxinas e suprimir doenças, a qual é denominada de biocontrole (STICHER et al., 1997; COMPANT et al., 2005; LEHR et al., 2007; LONG et al., 2008). Esta atividade é exercida pelas rizobactérias através de três propriedades: 1) competência na aquisição dos nutrientes da rizosfera (*rhizosphere competence*), as quais utilizam o exudado radicular como fonte de nutrição, sobrevivendo e proliferando ao longo das raízes de modo a colonizarem por inteiro; 2) secreção de antibióticos (antibiose), como resposta inibitória a outros microorganismos presentes no

habitat que competem pelos exudados; e 3) indução de resposta sistêmica de defesa (HAAS et al., 2002), que acontece via rota de sinalização dependente do jasmonato (JA) e do etileno (ET) nas plantas colonizadas (VAN DER ENT et al., 2009).

Embora jasmonato e etileno também sejam requeridos na SAR (*Systemic Acquired Resistance*), via dependente do aumento dos níveis de ácido salicílico (AS) que coordenadamente ativam proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e promovem a resistência sistêmica no vegetal, ela difere da SIR (*Induced Systemic Resistance*). A SIR é ativada somente por microorganismos não-patogênicos, que proporcionam resistência a espectros de patógenos diferentes da SAR e que, na grande maioria dos casos, não ativam a via do AS (CONN et al., 2008; POZO et al., 2008). Sua indução de resistência ocorre quando os componentes da superfície celular da rizobactéria PGPR (*microbe-associated molecular pattern* – *MAMPs*) são reconhecidos pelos receptores celulares das plantas que induzem o acúmulo de fatores de transcrição, como MYC2 e MYB72, chamados de *priming*, inativos no citosol para os genes relacionados à defesa dependente de JA e ET (VAN DER ENT et al., 2009). Esse *priming* permite que as defesas dos vegetais estejam fortemente preparadas antes do ataque do patógeno e que, posteriormente, possam ser rapidamente ativadas, promovendo a resistência do vegetal. Sabe-se que a diferença entre a resistência e a suscetibilidade ao patógeno é resultante, provavelmente, do tempo de resposta da planta a infecção (MORAES, 1998).

Além disso, estas interações podem ainda induzir resposta local de defesa. Duijff et al. (1997) observaram que densas colonizações da rizobactéria endofítica *Pseudomonas fluorescens* WCS417r nas células da epiderme e hipoderme das raízes de *Lycopersicon esculentum* promoveram a indução de lignificação nas paredes das células corticais da raiz. Da mesma forma, Lehr et al. (2008) observaram que a inoculação de *Streptomyces* GB 4-2 nas raízes de plântulas de *Picea abies* promoveu a lignificação do cilindro vascular. Nas folhas, Suzuki et al. (2005) também demonstraram a lignificação da parede celular das células

da epiderme e mesofilo de *Rhododendron* sp. na presença do micélio de *Streptomyces galbus* R-5.

Muitas destas rizobactérias são capazes, ainda, de produzir ácido indol-3-acético (AIA), uma auxina que desempenha um importante papel no desenvolvimento das raízes (ALVAREZ et al., 1989). Ela controla a identidade, divisão e expansão celular. Desta forma, o AIA é uma importante e eficiente maneira pela qual as rizobactérias podem manipular as raízes das plantas hospedeiras, uma vez que seu efeito é dose-dependente. Baixas concentrações estimulam o crescimento das raízes, enquanto que as altas concentrações inibem (LONG et al., 2008; TROMAS et al., 2009).

1.2.2.1. Mycorrhization Helper Bacteria - MHB

Em estudos de associação micorrízica, constatou-se que durante a germinação do esporo no solo até o estabelecimento da simbiose, o fungo necessita crescer e colonizar a superfície da raiz antes de penetrá-la (GARBAYE, 1994). Durante este período de desenvolvimento, o fungo interage com a população bacteriana presente na rizosfera (GARBAYE, 1994). Desta forma, se observou que a presença de bactérias no solo afeta o crescimento das micorrizas, tanto as endomicorrizas quanto as ectomicorrizas, e promove o aumento na taxa de infecção das raízes, conhecidas como MHB (FREY-KLETT et al., 2007).

Duponnois e Garbaye (1992) demonstraram um aumento de 30 % na micorrização de *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) na presença de MHB. Nos experimentos realizados com *Streptomyces*, verificou-se que a inoculação de *Streptomyces coelicolor* 2389 promoveu o aumento da colonização de raízes de sorgo pela micorriza, assim como o número de arbúsculos nas raízes das plantas infectadas (ABDEL-FATTAH & MOHAMEDIN, 2000). Schrey et al. (2005) descreveram que *Streptomyces* sp. AcH 505 promoveu o crescimento das hifas de *Amanita muscaria* em *Picea abies*. Da mesma forma, constatou-se também que este

isolado poderia promover a formação de micorriza e suprimir o crescimento de fitopatógenos, como *Heterobasidion annosum* e *Armillariella obscura* (MAIER et al., 2004). A rizobactéria MHB *Paenibacillus* provou ser compatível com o desenvolvimento de micorriza arbuscular, porém antagônica aos fungos patogênicos. Esta bactéria produz pequenos peptídeos responsáveis pelo efeito antagônico ao patógeno, mas inofensivo ao fungo simbiote (BUDI et al., 1999; SELIM et al., 2005 apud FREY-KLETT et al., 2007). Interessantemente, Lehr et al. (2007) demonstraram que ao inocular *Streptomyces* sp. AcH 505 nas raízes de *Picea abies*, ocorreu uma diminuição na atividade da peroxidase neste tecido, indicando que rizobactérias MHB podem facilitar a colonização radicular das micorrizas após suprimirem as respostas de defesa do vegetal. Assim, destaca-se a importância das MHBs como agente de pressão seletiva da microbiota do solo (SCHREY & TARKKA, 2008). Além disso, destaca-se nas MHBs a mobilização de nutrientes minerais do solo e a fixação de nitrogênio, importantes para a produção de plantas a campo (FREY-KLETT et al., 2007).

1.2.2.2. *Streptomyces*

As actinobactérias (anteriormente denominadas de actinomycetes) representam uma classe de bactérias gram-positivas que desempenham importantes funções na decomposição e formação de húmus no solo (SUIHKO et al., 2009). Muitas dessas bactérias são saprófitas de vida livre, outras são fitopatogênicas e rizobacterianas. Dentre estas, o gênero *Streptomyces* tem despertado especial atenção devido ao seu papel ecológico na rizosfera. Constituem aproximadamente 10 % da microbiota total do solo (JANSSEN, 2006), e desempenham funções importantes nas associações planta-comunidades microbianas (SCHREY & TARKKA, 2008). Representam os organismos com maior adaptação aos diferentes tipos de solo. Eles produzem esporos de resistência hidrofóbicos, que são facilmente deslocados pelo movimento da água, sendo germinados independentemente da existência de nutrientes. Seu

esporo estabelece micélios com ramificações multinucleadas, que secretam enzimas catabólicas que disponibilizam nutrientes a partir de substratos orgânicos presentes no solo ou que possuem atividade biológica, como antibióticos, imunossuppressores e inibidores enzimáticos (LORIA et al., 2006; HORINOUCI, 2007). Esta característica de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários faz com que os *Streptomyces* sejam promissores agentes de biocontrole, e que poderiam ser empregados na formulação de produtos alternativos aos agrotóxicos utilizados nas práticas agrícolas (EMMERT & HANDELSMAN, 1999). Mais de 50 diferentes tipos de antibióticos já foram isolados em *Streptomyces*, tais como streptomicina, neomicina, cloramfenicol e tetraciclina (FRAVEL, 1988).

Assim, diversos estudos com *Streptomyces* têm demonstrado seu potencial uso como controle biológico. Lehr et al. (2008) observaram que a inoculação de *Streptomyces* GB 4-2 em plântulas de *Picea abies* promoveu o aumento das respostas de defesa local e sistêmica no vegetal (aumento nos níveis de peroxidases), suprimindo o desenvolvimento do fitopatógeno *Heterobasidion abietinum*. Da mesma forma, Conn et al. (2008) verificaram que sementes de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Streptomyces* sp. EN27 e EN28 aumentaram a resistência das folhas aos patógenos *Erwinia carotovora* e *Fusarium onyosporum* através do “priming” dos genes envolvidos nas rotas do JA/ET e SAR, respectivamente. Xiao et al. (2002) observaram que plântulas de *Medicago sativa* e *Glycine max* inoculadas com diversas linhagens de *Streptomyces* conseguiram reduzir a severidade das doenças causadas pelos fungos *Phytophthora medicaginis* e *P. sojae*, respectivamente, através do efeito antagônico destas rizobactérias na rizosfera, além de aumentarem a biomassa, altura e comprimento das raízes em *M. sativa*. Shimizu et al. (2006) observaram que *Streptomyces* spp. MBR-37 e MBR-38 e *Streptomyces galbus* R-5 promoveram resistência a *Rhododendron* sp. contra o fungo *Pestalotiopsis sydowiana*, através do acúmulo de antocianinas (rota JA/ET). Contudo, a maioria dos estudos de biocontrole é realizada primeiramente *in vitro* (CRAWFORD et al., 1993; XIAO et al., 2002; ERRAKHI et al., 2007; LEHR et al., 2007; HAMDALI et al., 2008;

VASCONCELLOS & CARDOSO, 2009), sendo selecionadas para ensaios *in vivo* somente aquelas rizobactérias que conseguem promover o melhor efeito antagônico ao fitopatógeno. Entretanto, esse método não condiz exatamente com o observado *in vivo* (XIAO et al., 2002), sendo demonstrado por Shimizu et al. (2006) que *Streptomyces* não antagônicos conseguem também induzir resistência nas plantas após infecção patogênica.

1.3. Metabolismo Relacionado à Defesa Vegetal

A resistência em coníferas a ataque de patógenos inclui defesas constitutivas, que detêm a invasão inicial, e induzidas, que podem incluir secreção em massa de oleoresina (terpenos), além de aumentar a síntese de fenólicos e ativar os flavonóides (LEWINSOHN et al., 1991; HUDGINS & FRANCESCHI, 2004). Estas respostas induzidas causam transformações anatômicas nas coníferas e podem ser eliciadas pela aplicação exógena de metil jasmonato (MeJa). *Pseudotsuga menziesii* e *Sequoiadendron giganteum* mostraram a síntese de ductos resiníferos e aumentaram os compostos fenólicos após 28 dias da aplicação de MeJa. Este fitohormônio induz a produção de etileno pelo ácido 1-aminociclopropano-carboxílico (ACC) oxidase, sendo provavelmente este o último eliciador das respostas envolvidas nas rotas dos fenilpropanóides e de terpeno em coníferas. (FOSSDAL et al., 2001; TARKKA et al., 2001; HUDGINS & FRANCESCHI, 2004). Contudo, PGPRs endofíticas podem produzir ACC desaminase, a qual reduz os níveis de etileno produzidos pelo vegetal e que auxilia nas associações radiculares (LONG et al., 2008).

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão relacionadas a mudanças na atividade de enzimas-chave, como enzimas da família das fenilalanina amônia-liases (FALs), peroxidases (POXs) e polifenoloxidasas (PPOs).

As FALs são enzimas que catalisam o primeiro passo da rota dos fenilpropanóides nas plantas, conversão da L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia, ponto regulatório chave na passagem do metabolismo primário para o secundário (DIXON & PAIVA, 1995; OLSEN et al., 2008). Os fenilpropanóides asseguram a proteção do vegetal contra fatores abióticos e bióticos (RITTER & SCHULZ, 2004), na qual o ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sináptico), presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (CAVALCANTI et al., 2005; RITTER & SCHULZ, 2004).

As POXs catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando a lignina (CAVALCANTI et al., 2005). Esta é depositada nas paredes celulares das células vegetais, onde atua como barreira mecânica, interferindo no crescimento e no desenvolvimento de patógenos (AGRIOS, 1997). Esta família de enzimas também participa da biosíntese do hormônio vegetal etileno e da oxidação de compostos fenólicos.

As PPOs oxidam compostos fenólicos a quinonas, as quais são freqüentemente mais tóxicas aos microrganismos que os fenóis originais. Um aumento na atividade dessas enzimas resulta em altas concentrações de produtos tóxicos e, portanto, em níveis maiores de resistência a infecções (AGRIOS, 1997). A ação dessas enzimas ocorre principalmente quando há descompartimentalização, após ferimentos ou ataque de insetos, sendo que as quinonas são altamente reativas, podendo reagir entre si ou entre outras substâncias do tecido lesado, formando compostos marrons ou escuros (MAZZAFERA & ROBINSON, 2000).

Considerando tanto a perda expressiva do bioma da Floresta com Araucária quanto à fragmentação das áreas remanescentes, bem como as dificuldades relacionadas ao estabelecimento de florestas comerciais com esta espécie, é necessário utilizar diferentes abordagens visando aumentar a eficiência no crescimento inicial das plantas a campo, promovendo o sucesso nos cultivos desta espécie. O isolamento de rizobactérias de solos nativos a araucária, bem como as suas aplicações nesta espécie, representa uma estratégia original na avaliação dos efeitos e interações existentes entre estes dois organismos.

2. HIPÓTESE

As rizobactérias autóctones podem estimular as respostas de defesas e promover o desenvolvimento das plântulas de *A. angustifolia*.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos isolados PM1, PM4 e PM9 de rizobactérias no metabolismo de defesa e no desenvolvimento das plântulas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cultivadas *in vivo*.

3.1. Objetivos Específicos

- Identificar os isolados de rizobactérias utilizados nos experimentos a nível de gênero através de ferramentas moleculares;
- Avaliar a produção de ácido indol-3-acético (AIA) pelos isolados de rizobactérias utilizados;
- Analisar, nas plântulas de *A. angustifolia*, a competência rizosférica dos isolados de rizobactérias utilizados após inoculação radicular;
- Verificar alterações no metabolismo de defesa nas plântulas de *A. angustifolia* inoculadas com os isolados de rizobactérias;
- Verificar alterações de desenvolvimento nas plântulas de *A. angustifolia* inoculadas com os isolados de rizobactérias;

CAPÍTULO II
MANUSCRITO SUBMETIDO

Autochthonous *Streptomyces* Regulate the Metabolism of Seedlings of *Araucaria angustifolia* (Coniferales) During Root Colonization

Fernando Rostirolla Dalmas¹, Talita Carneiro Brandão Pereira², Maurício Reis Bogo² and Leandro Vieira Astarita¹.

¹ Laboratório de Biotecnologia Vegetal PUCRS

² Laboratório de Biologia Genômica e Molecular PUCRS

Manuscrito submetido para publicação na revista Australian Journal of Botany.

1 **Autochthonous *Streptomyces* regulate the metabolism of seedlings of *Araucaria***
2 ***angustifolia* (Coniferales) during root colonization**

3

4 *F. R. Dalmas*^A, *T. C. B. Pereira*^B, *M. R. Bogo*^B and *L. V. Astarita*^A

5

6 ^ALaboratory of Plant Biotechnology, Bioscience Institute, Pontifícia Universidade Católica do
7 Rio Grande do Sul. Ipiranga Avenue, 6681, Building 12A. CEP: 90619-900, Porto Alegre,
8 RS, Brazil.

9

10 ^BLaboratory of Genomics and Molecular Biology, Bioscience Institute, Pontifícia
11 Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Ipiranga Avenue, 6681, Building 12A. CEP:
12 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

13

14

15 Author for correspondence

16 Leandro Astarita

17 Tel: +55-51-3353-4148

18 Fax: +55-51-3320-3568

19 Email: astarita@pucrs.br

20

21

22 **Keywords:** actinobacteria, Brazilian pine, native microflora, PGPR, plant metabolism, plant
23 development.

24 SUMMARY

25 *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, known as Brazilian pine, is an endangered
26 species with great ecological and economic importance. Although many efforts have been
27 made to establish commercial plantations of this species, it grows slowly and unevenly, with
28 high mortality. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), including some
29 *Streptomyces*, represent a class of non-pathogenic soil microorganisms and have a beneficial
30 effect on plant growth. This study evaluated the effect of three autochthonous *Streptomyces*
31 spp. isolates (PM1, PM4, and PM9) on the early development and metabolism of 50-day-old
32 *A. angustifolia* seedlings. The enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL),
33 polyphenol oxidase (PPO), and peroxidase (POX), and the levels of phenolic compounds,
34 flavonoids, and chlorophyll were determined in extracts of roots and leaves from seedlings.
35 Assays were carried out 1, 3 and 9 days after the roots were inoculated with each isolated.
36 Length and fresh mass of shoots and roots as well as the volume and density of roots were
37 evaluated at 100 days after seedlings inoculation. All *Streptomyces* spp. evaluated showed
38 rhizospheric competence and produce indole-3-acetic acid. The activities of PPO and POX
39 exhibited a tissue-temporal regulation in the presence of the isolates; however the levels of
40 phenolics, flavonoids and chlorophylls did not change in the period analyzed. The volume,
41 density and length of roots changed in seedlings that were in contact with isolates for 100
42 days. The isolate PM9 caused significant changes in plant metabolism, increasing the shoot
43 increment. PAL activity was reduced only 9 days after root inoculation with PM9.

44

45 **Keywords:** actinobacteria, Brazilian pine, native microflora, PGPR, plant metabolism, plant
46 development.

47 **Introduction**

48 *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, known as Brazilian Pine, grows wild in
49 Argentina, Brazil, and Paraguay (Reitz and Klein 1966). It is a key-species of great economic
50 importance. In Brazil, it was intensively exploited because of its availability and usefulness
51 for pulp and timber, which culminated in extreme fragmentation (95 %) of its biome (MMA
52 2002).

53 Subsequently, reforestation policies were implemented in order to establish *Araucaria*
54 forests for sustainable management. However, in cultivation, this pine grows slowly and,
55 unevenly, with high mortality (Guerra *et al.* 2003), and is immediately replaced by more
56 profit exotic species. Recently, Moreira-Souza and Cardoso (2002) found that *Araucaria* is a
57 mycotrophic plant, i.e., it is dependent on vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) to
58 develop, because its root system limits its own development. Zandavalli *et al.* (2004)
59 observed that *Araucaria* seedlings inoculated with VAM showed a significant accumulation
60 of mass (312 %) comparing to the controls. Studies of mycorrhizal association have found
61 that during spore germination in the soil, until symbiosis is established, the fungus needs to
62 grow and colonize the root surface before penetrating it. During this developmental period,
63 the fungus interacts with the bacterial population present in the rhizosphere, which may affect
64 its growth and increase the root infection rate (Garbaye 1994; Frey-Klett *et al.* 2007).

65 The Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) represent a class of non-
66 pathogenic soil microorganisms that have a beneficial effect on plant growth. They may
67 stimulate an increase in photosynthetic capacity (Zhang *et al.* 2008), tolerance to abiotic
68 stress, mycorrhizal facilitation, and disease suppression (Sticher *et al.* 1997; Compant *et al.*
69 2005; Lehr *et al.* 2007). This last activity, known as biocontrol, is performed by rhizobacteria
70 through competition for rhizosphere nutrients, secretion of antibiotics (antibiosis), and
71 induction of the systemic response (*ISR*) of defense (Haas *et al.* 2002) via the jasmonate- and
72 ethylene-dependent signaling pathway in colonized plants (Van der Ent *et al.* 2009).

73 Among the PGPR rhizobacteria, the genus *Streptomyces* (actinobacteria) has attracted
74 special attention because of its ecological role in the rhizosphere. Comprising about 10 % of
75 total soil microbiota (Janssen 2006), these organisms play important roles in plant-microbial
76 community associations (Schrey and Tarkka 2008), producing a wide variety of secondary
77 metabolites, such as antibiotics and enzymatic inhibitors (Paulitz and Bélanger 2001;
78 Horinouchi 2007). *Streptomyces* may contribute to mycorrhization, phosphorus solubilization,
79 auxin production, biomass increase, photosynthetic activity, antibiosis, and induction of
80 defense responses in *Streptomyces*-colonized plants (Crawford *et al.* 1993; Xiao *et al.* 2002;
81 Suzuki *et al.* 2005; Shimizu *et al.* 2006; Errakhi *et al.* 2007; Lehr *et al.* 2007; Hamdali *et al.*
82 2008; Lehr *et al.* 2008; Vasconcellos and Cardoso 2009).

83 Plants have a strong influence on the diversity and density of the rhizobacteria present
84 in the soil (Garbaye 1994; Baretta 2007), exuding carbon-rich compounds that provide
85 nutrition; and are able to establish associations that may improve their survival (Bais *et al.*
86 2006). Since the plant-rhizobacteria associations vary according to the rhizobacteria species
87 and the host plant (Ramamoorthy *et al.* 2001; Long *et al.* 2008), the use of native microflora
88 may make facilitate to find PGPR that are both already adapted to use the root exudates (Hass
89 *et al.* 2002) and that influence plant development.

90 The objective of this study was to evaluate the effect of three autochthonous
91 *Streptomyces* spp. isolates on the development and initial metabolism of *Araucaria*
92 *angustifolia* seedlings. This approach is an original strategy in the assessment of the effects
93 and interactions between these two organisms, which may lead to improvements in the
94 promotion of growth and development of field-grown plants. *Araucaria*-actinobacteria
95 interactions are still poorly known, but better understanding of them may represent the
96 difference between success and failure in the establishment of reforestation programs for *A.*
97 *angustifolia*.

98

99 **Material and Methods**

100 *Plant Material*

101 Mature cones of a single *Araucaria* specimen were collected in the Araucaria forests of the Pró-Mata
102 Center for Research and Conservation of Nature (29°29'28.8''S, 50°11'09.8''W), São Francisco de Paula, Rio
103 Grande do Sul, Brazil, in April 2009. In the laboratory, the cones were threshed, and the seeds were disinfected
104 with sodium hypochlorite (2 % active sodium) for 20 minutes (Zandavalli *et al.* 2004), followed by 0.3 %
105 Benlate® fungicide for 10 minutes, and rinsed with sterile distilled water. The seeds were then placed in
106 polyethylene bags and stored at 0 °C (Caçola *et al.* 2006; Amarante *et al.* 2007). Scarified seeds (Moreira-Souza
107 and Cardoso 2003) were embedded in 10 ml of sterile distilled water in Petri dishes containing sterile filter
108 paper, and allowed to germinate. After germination (day 0), seedlings with 1-cm-long roots were transferred to
109 polyethylene jars (22 cm high and 10.5 cm in diameter) containing moist sterile vermiculite. Immediately, they
110 were watered with 100 ml of modified MS solution (Murashige and Skoog 1962), with the salt concentration
111 reduced to one-quarter. The jars were kept covered with punctured plastic film for 20 days, and were then
112 uncovered and watered with 100 ml of sterile distilled water at 10-day intervals, for a total of 50 days of
113 cultivation. All the jars were kept at 25 ± 2 °C with light intensity of $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in a 16 hours photoperiod.
114

115 *Culture, Molecular Analysis and Root Inoculation of Isolates*

116 The actinobacteria (formerly called actinomycetes) isolates were obtained at Pró-Mata, from soil
117 samples collected to a depth of 20 cm in the native forest, one meter away from adult trees of *A. angustifolia*.
118 The samples were dried in an oven at 42 °C for 72 h and then stored at -20 °C. Approximately 0.5 g of soil was
119 shaken in 50 ml with yeast extract (60 g l⁻¹), sodium dodecyl sulfate (0.5 g l⁻¹), and CaCl₂ (0.5 g l⁻¹), pH 7.0 for
120 30 min, and aliquots were inoculated in Petri dishes with ISP2 medium containing 0.5 g l⁻¹ cycloheximid, 2 g l⁻¹
121 nalidixic acid, and 5 g l⁻¹ nystatin (Williams and Davies 1965; Hirsch and Christensen 1983; Hayakawa and
122 Nonomura 1989). The isolates PM1, PM4, and PM9 were selected based on the characteristic morphology of
123 actinobacteria, and were maintained and multiplied in ISP4 medium (Shirling and Gottlieb 1966). Stock cultures
124 were stored at -80 °C in ISP4 liquid medium with 10 % glycerol. The rhizobacteria suspensions were prepared in
125 Erlenmeyer flasks containing 10 ml of ISP4 liquid medium. The flasks were kept in a shaker (100 rpm) for seven
126 days (stationary phase), and then centrifuged at 2,500 g for 10 min at room temperature. The pellet was
127 resuspended in sterile distilled water and adjusted to $10^6 - 10^7$ CFU ml⁻¹ ($\text{DO}_{540\text{nm}} = 1.0$).

128 Total DNA of each isolate was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification kit (PROMEGA
129 Corp.), following suppliers instructions. Extraction products were visualized on 1% agarose gel with GelRed®

130 (Biotium) and hereafter were amplified through polymerase chain reaction (PCR) using 16S primers according
131 to Ritchie *et al.* (2008) (except for primer annealing temperature, optimized for 58°C). PCR products were
132 purified using the enzymes exonuclease I (Exo) and Shrimp alkaline phosphatase (SAP) and then were
133 sequenced using MegaBACE 1000 automated sequencer. Resulting chromatograms were analysed using
134 FinchTV and PhredPhrap programs and DNA sequences were blasted using NCBI-BLAST searches of
135 GenBank, aiming to identify the isolates. This experiment was carried out in duplicate.

136 Production of auxin by actinobacteria was analyzed by the Salkowski method (Gordon and Weber
137 1951), using acetic-3-indol acid as standard. The isolates PM1, PM4, and PM9 maintained in semi-solid ISP4
138 medium were removed from the dishes and weighed before analysis.

139 Roots of 50-day-old *A. angustifolia* seedlings (Figure 1a) were inoculated with isolates PM1, PM4, and
140 PM9. The inoculation consisted of irrigation of 1 ml of bacterial suspension from a single isolate onto the root,
141 and watered with 100 ml of sterile distilled water. The control treatment consisted of irrigation with sterile water
142 only.

143 The root colonization by actinobacteria was evaluated on secondary roots of *A. angustifolia* seedlings
144 inoculated with isolates (Duijff *et al.* 1997). Samples were fixed in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)
145 containing 2 % glutaraldehyde after five days of cultivation. The samples were gradually dehydrated in acetone,
146 critical-point dried, sputter-coated with gold, and observed by Scanning Electron Microscopy.

147 The markers of plant metabolism were determined in assays with the root and expanded leaves (Einig *et*
148 *al.* 1999; Poiatti *et al.* 2009) at 1, 3, and 9 days after inoculation. Each treatment was repeated six times. The
149 development of the plants at 100 days post-inoculation (150-day-old plants) was evaluated. These plants
150 received 100 ml of a one-fourth MS solution, at 10-day intervals. Each treatment consisted of 20 replicates.

151

152 *Plant Metabolism*

153 Leaf and root samples (0.2 g each) were homogenized in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.0)
154 containing 1.4 mM β -mercaptoethanol. The extracts were centrifuged at 2,500 g for 30 min at 4 °C. The
155 enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC 4.3.1.24) was determined in a spectrophotometer
156 (290 nm) after the incubation of the supernatant for 60 min at 40 °C in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.8)
157 supplemented with 2 % L-phenylalanine ($w v^{-1}$) and, expressed as μ Katal mg^{-1} of protein (Akinwunmi and John
158 2001). Trans-cinnamic acid was used as standard.

159 Leaf and root samples (0.2 g each) were homogenized in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)
160 containing polyvinylpyrrolidone (PVPP) (1:6 $w v^{-1}$). The extracts were centrifuged at 2,500 g for 30 min at 4

161 °C, and the supernatants were used for the enzyme assays. The enzymatic activity of the polyphenol oxidases
162 (PPO) (EC 1.14.18.1) was determined in a spectrophotometer (400 nm) after incubation of the supernatant in
163 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) with 1 mM chlorogenic acid for 30 min at 30 °C, and expressed by the
164 difference of absorbance $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ of protein (González *et al.* 1999). The enzymatic activity of peroxidase
165 (POX) (EC 1.11.1.7) was determined by the kinetic method in a spectrophotometer (420 nm) after the oxidation
166 of 0.1 M guaiacol in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) and 10 mM hydrogen peroxide, expressed as
167 $\eta\text{Katal mg}^{-1}$ of protein (Randhir *et al.* 2002). Total proteins were determined according to Bradford's method
168 (Bradford 1976), using bovine serum albumin as the standard.

169 Phenolic compounds and flavonoid fraction were analyzed in leaf and root samples (0.2 g each)
170 homogenized in 80 % methanol (1:20 w v⁻¹). The extracts were centrifuged at 2,500 g for 30 min at 4 °C, and the
171 supernatants were used for the quantifications. The levels of phenolic compounds were determined in a
172 spectrophotometer (765 nm) using Folin-Ciocalteu reagent and 1.88 M Na₂CO₃, after incubation in the dark for
173 30 min at 25 °C (Arnaldos *et al.* 2001). Gallic acid was used as the standard. The levels of the flavonoid fraction
174 were determined in a spectrophotometer (415 nm), using 96 % ethanol, 0.26 M aluminum nitrate, and 1 M
175 potassium acetate (Toor and Savage 2005), using quercetin as the standard. The levels were expressed as mg g^{-1}
176 FM.

177 Contents of chlorophyll were determined in leaves samples (0.2 g) homogenized in 80 % acetone
178 containing 0.01 % CaCO₃. The extracts were centrifuged at 2,500 g for 30 min at 4 °C. The supernatants were
179 used for the quantifications of chlorophyll *a* (663 nm), chlorophyll *b* (645 nm), and total chlorophyll (652 nm) in
180 a spectrophotometer. The concentrations were calculated according to Whitham *et al.* (1971).

181

182 *Growth Measurements*

183 At 100 days after rhizobacteria incubation, the seedlings had their shoot and root length (cm) and fresh
184 mass (g) evaluated. The shoot increment (%) was calculated as the difference between the final and initial length,
185 divided by the initial length. The volume (cm³) and density (g cm³⁻¹) of the roots were determined by the mass
186 of the volume of water displaced after the roots were submerged.

187

188 *Statistical Analysis*

189 The data were analyzed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA), and the outliers
190 determined by Boxplot were eliminated (SPSS software ver. 11.5). Differences among the means were separated

191 by Duncan's test, with a significance level of $P \leq 0.05$. Bivariate correlations were determined by the Pearson
192 correlation coefficient, with significance levels of $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.05$.

193

194 **Results**

195 The scarified seeds of *A. angustifolia* showed a 74 % germination rate after six months
196 of storage in 0 °C. The seedlings exhibited highly non-uniform growth (47 %) during the
197 initial 50 days of development, caused mainly by the premature death of the cotyledon and the
198 consequent interruption of the seedling nutrition by the megagametophyte. These plants
199 showed slow shoot and root development, often followed by their death (20 %). Therefore,
200 only 36 % of the seedlings originating from the germinated seeds were used in the
201 experiments, which emphasizes the enormous heterogeneity of development of seeds from a
202 single tree. The seedlings used in the experiment showed averages of 14.06 cm of shoot
203 length, 26.31 cm of root length, and 5.0 g of total fresh mass (without the megagametophyte
204 and cotyledons) (Figure 1a). No correlation between the shoot and root length was observed (r
205 = 0.15; $P = 0.24$).

206 Using NCBI-BLAST searches, all isolates were identified as belonging to
207 *Streptomyces* genus and designated as *Streptomyces* sp. PM1, *Streptomyces* sp. PM4 and
208 *Streptomyces* sp. PM9. The DNA partial sequences obtained were submitted to GenBank
209 under the following access numbers: PM1 - HM460335; PM4 - HM460336 and PM9 -
210 HM460337.

211 All *Streptomyces* spp. were able to produce indol-3-acetic acid (IAA). The PM1 strain
212 produced the lowest auxin concentration (0.1391 mg g⁻¹ FM), which was, on average, 6.27-
213 fold lower than the production of the PM4 and PM9 isolates (Table 1).

214 The PM1, PM3 and PM9 strains were all capable of growing and developing on the
215 surface of *A. angustifolia* lateral roots, as analyzed five days after the suspension inoculation.
216 The *Streptomyces* colonies adhered to the root surface and grew rapidly (Figure 1b),
217 indicating that these isolates were capable of colonizing the jars-cultivated seedlings.

218

219 *Plant Metabolism*

220 The enzyme activities differed among the treatments. The lowest PAL activity
221 ($3.98 \pm 0.88 \mu\text{Katal mg}^{-1}$) was observed on day 9, in the root tissues inoculated with strain PM9
222 (Figure 2). This was the only isolate that significantly reduced the PAL activity during the
223 treatment, which demonstrates the influence of this isolate on the activity of the main enzyme
224 in the phenylpropanoid pathways (Olsen *et al.*, 2008). The PAL activities on the control
225 treatment were 7.20 ± 1.13 , 10.68 ± 2.26 , and $7.13 \pm 1.34 \mu\text{Katal mg}^{-1}$ for day 1, day 3 and day 9,
226 respectively. It was not possible to evaluate this enzyme activity in the leaf tissues by the
227 method employed.

228 The PPO activity in the root tissues decreased on day 3, for all *Streptomyces* isolates.
229 The highest PPO activity occurred in the presence of isolate PM9 when activity was five-fold
230 higher than in the control ($46.10 \pm 16.10 \Delta\text{Abs min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{protein}$) on day 9 (Figure 3a). The
231 increase in PPO activity was positively correlated with the seedling growth ($r = 0.63$; $P =$
232 0.021). The inoculation of PM9 onto the roots caused a higher activity of PPO in the seedling
233 shoot ($5.85 \pm 2.35 \Delta\text{Abs min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{protein}$) on day 1. However, this increase in activity did not
234 persist over time (Figure 3a).

235 The root tissues inoculated with PM4 and PM9 showed a rapid reduction of POX
236 activity on day 1 (Figure 3b). PM1 also decreased POX activity on day 3. However, PM4
237 increased POX activity four-fold on day 9 in the roots ($29.97 \pm 2.20 \eta\text{Katal mg}^{-1} \text{protein}$), to a
238 level similar to that found in the control treatment on day 1 ($21.68 \pm 2.84 \eta\text{Katal mg}^{-1} \text{protein}$);
239 the activity then decreased over time ($r = -0.77$; $P = 0.006$). In the leaves, PM9 increased
240 POX activity on day 1, and on day 3 all the treatments with the isolates showed increased
241 activity (Figure 3b).

242 Therefore, the data indicate the existence of a tissue-temporal regulation of PPO and
243 POX in *A. angustifolia* seedlings during the root association with these isolates. In the roots,

244 the activities increased at day 9. In the leaf tissue, the activities increased soon after the
245 inoculation of the isolates in the roots (on days 1 and 3), returning to the basal levels only on
246 day 9.

247 Independently of the isolate used, the levels of phenolic compounds in both the root
248 and leaf tissues were not significantly affected. On average, the control treatment showed 3.52
249 and 0.95 mg g⁻¹ FM for root and leaves, respectively, with a positive correlation ($r = 0.51$; $P =$
250 0.03) between seedling age and phenolic levels in the leaves (data not shown). Likewise, the
251 flavonoid levels did not show significant changes in the roots or leaves of the seedlings
252 colonized by the isolates, corresponding, on average, to 0.16 and 0.49 mg g⁻¹ FM,
253 respectively, in the control seedlings (data not shown).

254 The treatments with the isolates also did not change the total chlorophyll levels and the
255 chlorophyll *a/b* ratio; the means in the control seedlings were 2.47 and 0.58 mg g⁻¹ FM,
256 respectively (data not shown). However, there was an inverse correlation ($r = -0.48$; $P =$
257 0.038) between the chlorophyll *a/b* ratio and the age of the seedlings, indicating that 59-day-
258 old seedlings had a lower ratio than those that were 51 and 53 days old.

259

260 *Analysis of Development*

261 In addition to the metabolic changes, the isolates caused morphological alterations in
262 *A. angustifolia* seedlings after 100 days of inoculation. The measurements of the seedlings
263 (Table 2) demonstrated that the control treatment showed the lowest root density and the
264 largest root volume and length, compared to the seedlings inoculated with the isolates. The
265 fresh mass of the shoot as well as the roots did not differ significantly among the treatments
266 ($P = 0.30$ and $P = 0.41$, respectively); and a correlation between shoot and roots length was
267 also not observed ($r = 0.19$; $P = 0.18$). Surprisingly, only isolate PM9 caused a significant
268 increment in the shoots after 100 days of inoculation (Table 2).

269

270 **Discussion**

271 The highly uneven growth of the *A. angustifolia* seedlings during the first 50 days of
272 this study indicated that this period is the most critical for the plant's establishment. Einig *et*
273 *al.* (1999) demonstrated that germinated seedlings of *A. angustifolia* are strongly dependent
274 on the carbohydrates from the megagametophyte reserves up to 70 days of age, because the
275 maximum photosynthetic capacity is reached only after the leaves have completely expanded,
276 which occurs when the seedlings are 25 days old. Premature death of the cotyledon prevented
277 carbohydrate transfer from the megagametophyte to seedlings less than 50 days old, making
278 most of the plants unsuitable for use in the experiments. The factors involved in this necrosis
279 have not yet been identified, but may be responsible for the failures experienced in
280 establishing field cultures.

281 The *Streptomyces* spp. success in colonizing the roots demonstrated their rhizospheric
282 competence for *A. angustifolia*. The bacterial isolates, colonized, and proliferated during the
283 lateral-root growth phase, confirming the seedling-*Streptomyces* interaction. Studies on
284 cocultivation have been used to identify antagonist effects between rhizobacteria and
285 pathogens (Crawford *et al.* 1993; Xiao *et al.* 2002; Errakhi *et al.* 2007; Lehr *et al.* 2007;
286 Vasconcellos and Cardoso 2009). However, Shimizu *et al.* (2006) reported that rhizobacteria
287 strains without any antagonistic effect were efficient on inducing plant resistance when
288 inoculated on the roots. Therefore, we suggest that colonizing roots with rhizobacteria
289 represents the best method to evaluate the induced plant resistance after pathogen attack.

290 The PAL, PPO, and POX activities are involved in the phenylpropanoid pathways,
291 phenolic oxidation, and synthesis of lignin in the plant cell wall, respectively, in order to
292 stimulate higher levels of resistance to infections (Agrios 1997; Butland *et al.* 1998). They
293 were modified by the inoculation of the isolates PM1, PM4, and PM9 on the roots of *A.*
294 *angustifolia* seedlings. However, the endogenous levels of phenolic compounds and
295 flavonoids, related to the plant defenses, were not changed by the isolates in the period

296 analyzed. According to Van der Ent *et al.* (2009), non-pathogenic rhizobacteria such as PGPR
297 interact with the roots without activating the defense responses in the host plants, and only
298 cause the accumulation, known as *priming*, of transcription factors related to defense genes
299 that reduce the response time to the attack of pathogens. These defense genes are traditionally
300 dependent on methyl jasmonate and ethylene, which signals pathogenic infections. In
301 conifers, the fast induction of synthesis of phenolic and flavonoids is related to the attack of
302 pathogens and to injuries (Hudgins and Franceschi 2004), and can be induced by the
303 application of methyl jasmonate (Krokene *et al.* 2008). In eudicotyledons, it has also been
304 observed that inoculation of rhizobacteria does not cause the production of phenols. *Dianthus*
305 *caryophyllus* seedlings inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WCS417 showed no change
306 in the phenolic levels over a period of 15 weeks. However, when these seedlings were
307 challenged with the pathogen *Fusarium oxysporum*, the phenolic levels rose rapidly, with a
308 consequent reduction of the disease (Van Peer *et al.* 1991). The difference in the
309 concentrations of phenolic compounds and flavonoids between the root and shoot tissues of *A.*
310 *angustifolia* may be attributed to the histological and physiological profiles of each tissue
311 type. *A. angustifolia* roots possess polyphenol-containing parenchyma cells in the secondary
312 phloem, and these cells produce and store phenolic compounds (Mastroberti and Mariath
313 2003; Hudgins and Franceschi 2004). This explains their higher concentration in the roots (3.7
314 fold) compared to the leaves, which store these compounds only in some hypoderm and
315 palisade parenchyma cells. The leaves contain three times more flavonoids than the roots,
316 which is related to the function of flavonoids in protecting against UV radiation.

317 Chen *et al.* (2000) showed that PGPR rhizobacteria may increase the activity of the
318 defense enzymes PAL, PPO, and POX in *Cucumis sativus* roots on days 2 and 5.
319 Nevertheless, our results indicated that the changes in PPO and POX activities in *A.*
320 *angustifolia* exhibited a tissue-temporal regulation in the presence of the isolates. At first, on
321 days 1 and 3, the activities of those enzymes in the roots were suppressed, and increased only

322 on day 9. The leaf tissues showed a contrary response, with the activities of both PPO and
323 POX increasing during the initial period of root colonization, and returning to the basal levels
324 on day 9. The responses observed in the shoot level, suggested that the isolates stimulated the
325 induction of systemic response (ISR), which was longer in POX than in PPO. The initial
326 suppression of the enzyme activity in the roots may represent a strategy of root colonization.
327 Lehr *et al.* (2007) showed that inoculating *Streptomyces* sp. AcH 505 (*mycorrhization helper*
328 *bacteria*, MHB; Frey-Klett *et al.* 2007) in *Picea abies* roots, led to a decrease in POX activity
329 in the roots and the maintenance of this activity in the leaves after two weeks of inoculation.
330 These responses indicate that the MHB rhizobacteria may facilitate the root colonization after
331 suppressing the defense responses of the plant. However, inoculations with *Streptomyces* sp.
332 GB 4-2 in *Picea abies* did not affect the POX activity in the root after two weeks of
333 inoculation, but did induce it in the leaves (Lehr *et al.* 2008). PAL, PPO, and POX accumulate
334 in the root tissues after pathogenic infections (Nagy *et al.* 2004), suggesting that the increase
335 in the activities of these enzymes after the root-colonization period in *A. angustifolia* is related
336 to the protection of the root against the invasion of its tissues (Shimizu *et al.* 2006), hence
337 limiting the growth of the rhizobacteria during the gradual process of root association. Duijff
338 *et al.* (1997) observed that dense colonization of the roots of *Lycopersicon esculentum* by
339 endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS417r induced lignification of the root
340 cells.

341 Regarding the morphology of the *A. angustifolia* seedlings, the roots of the control
342 seedlings were larger and longer than the roots of the seedlings inoculated with the isolates.
343 This response indicates that the levels of auxin produced by the isolates may have been
344 sufficient to inhibit the root expansion, because root growth depends on the concentration of
345 this phytohormone (Long *et al.* 2008; Tromas *et al.* 2009). Nevertheless, the fresh mass of the
346 roots did not differ significantly among the treatments, and the roots of the seedlings
347 inoculated for 100 days were coarser, probably due to increased lignification of the cell walls

348 (Duijff *et al.* 1997). Therefore, the roots of *A. angustifolia* associated with *Streptomyces*
349 isolates are denser than the control roots. Zandavalli *et al.* (2004) observed that *A. angustifolia*
350 roots exhibit a characteristic morphology when they are associated with mycorrhizal fungi.
351 These roots develop slowly, with the energy being re-allocated from the root to the growth of
352 the shoot (Sattler 2006). Such a re-allocation of energy in *A. angustifolia* plants inoculated
353 with the isolates is unlikely, because no relationship was observed between the decrease in
354 root length and the growth of the shoot. Lehr *et al.* (2007, 2008) found that the photosynthetic
355 rate increased in *Picea abies* inoculated with *Streptomyces* sp. AcH 505 and *Streptomyces* GB
356 4-2, after two weeks of cultivation; the rhizobacteria may increase the plant photosynthetic
357 capacity in order to increase the carbohydrates exuded by the roots (Zhang *et al.* 2008).
358 Therefore, it is suggested that the shoot increment observed in *A. angustifolia* seedlings
359 inoculated with the PM9 isolate may result from an increased rate of photosynthesis. In spite
360 of the metabolic and morphological changes caused by the *Streptomyces* spp., the
361 development of *A. angustifolia* seedlings was not negatively affected by the presence of
362 isolates.

363 In conclusion, the lack of uniformity in the initial development of *A. angustifolia*
364 seedlings is linked to a premature death of the cotyledons. The autochthonous *Streptomyces*
365 spp. interact with the *A. angustifolia* seedlings by suppressing the defense responses of the
366 roots during the initial phase of colonization. In general, the plant-rhizobacteria associations
367 are very dynamic and induce several responses, and it is essential to emphasize the period of
368 time analyzed during the interactions. The tested isolates demonstrated efficiency in
369 stimulating the rhizospheric competence, which is important for the biocontrol process. PM9
370 affected the plant metabolism more than did PM1 and PM4, proving to be a promising
371 rhizobacterium with a PGPR/MHB function. Further studies will be needed to find out
372 whether these *Streptomyces* are capable of aiding in mycorrhization and/or suppressing the

373 growth of phytopathogens, thus contributing to the successful establishment of reforestation
374 programs with *A. angustifolia*.

375

376 **Acknowledgements**

377 We thank Dr. Hans-Peter Fiedler and Dr. Rüdiger Hampp from Tübingen University,
378 Germany, for providing the rhizobacteria isolates, the Center for Microscopy and
379 Microanalysis of PUCRS for technical assistance, the Institute of the Environment (IMA) of
380 PUCRS for biological material, and CAPES for the fellowship.

381 REFERENCES

382

383 Agrios GN (1997) 'How plants defend themselves against pathogens'. Plant Pathology. (Academic Press: San
384 Diego).

385

386 Akinwunmi O, John LA (2001) The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna*
387 *unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant*
388 *Pathology* **58**, 199-208.

389

390 Amarante CVT, Mota CS, Megguer CA, Ide GM (2007) Postharvest preservation of "pinhões" [seeds of
391 *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] stored at different temperatures. *Ciência Rural* **37**, 346-351.

392

393 Arnaldos TL, Muñoz R, Ferrer MA, Calderón AA (2001) Changes in phenol content during strawberry
394 (*Fragaria ananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum* **113**, 315-322.

395

396 Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions
397 with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 233-266.

398

399 Baretta CRDM (2007) Microbial diversity in soils under *Araucaria angustifolia* forests. Thesis, University of
400 São Paulo.

401

402 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein
403 utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

404

405 Butland SL, Chow ML, Ellis BE (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in
406 pine trees and cell cultures. *Plant Molecular Biology* **37**, 15-24.

407

408 Caçola ÁV, Amarante CVT, Fleig FD, Mota CS (2006) Physiological quality of *Araucaria angustifolia* (Bertol.)
409 Kuntze seeds submitted to different storage conditions and escarification. *Ciência Rural* **16**, 391-398.

410

411 Chen C, Bélanger RR, Benhamou N, Paulitz T (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment
412 with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and*
413 *Molecular Plant Pathology* **56**, 13-23.

414

415 Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for
416 biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental*
417 *Microbiology* **71**, 4951-4959.

418

419 Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA (1993) Isolation and characterization of actinomycete
420 antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3899-3905.

421

422 Dianese JC, Ribeiro WRC, Urban AF (1986) Root rot of soybean caused by *Cylindrocladium clavatum* in central
423 Brazil. *Plant Disease* **70**, 977-980.

424

425 Duijff BJ, Gianinazzi-pearson V, Lemanceau P (1997) Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides
426 in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New*
427 *Phytologist* **135**, 325-334.

428

429 Einig W, Mertz A, Hampp R (1999) Growth rate, photosynthetic activity, and leaf development of Brazil pine
430 seedlings (*Araucaria angustifolia* [Bert.] O. Ktze.). *Plant Ecology* **143**, 23-28.

431

432 Eira MTS, Salomão AN, Cunha R, Carrara DK, Mello CMC (1994) Effect of moisture content on the
433 germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze seeds. *Revista Brasileira de Sementes* **16**, 71-75.

434

435 Errakhi R, Bouteau F, Lebrihi A, Barakate M (2007) Evidences of biological control capacities of *Streptomyces*
436 spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World*
437 *Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 1503-1509.

438

439 Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* **176**, 22-36.

440

441 Garbaye J (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **128**, 197-
442 210.
443
444 González EM, Ancos B, Cano MP (1999) Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry
445 fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4068-4072.
446
447 Gordon AS, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology* **26**, 192-195.
448
449 Guerra MP, Silveira V, Reis MS, Schneider L (2003) Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria*
450 *angustifolia*). In 'Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais'. (Eds LL Simões, CF
451 Lino). pp 85-101. (Senac Editora: São Paulo).
452
453 Haas D, Keel C, Reimann C (2002) Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol
454 properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 385-395.
455
456 Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y (2008) Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening
457 for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**, 2565-2575.
458
459 Hayakawa M, Nonomura H (1989) A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil.
460 *Actinomycetologica* **3**, 95-104.
461
462 Hirsch CF, Christensen DL (1983) Novel method for selective isolation of Actinomycetes. *Applied and*
463 *Environmental Microbiology* **46**, 925-929.
464
464 Horinouchi S (2007) Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Bioscience,*
465 *Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 283-299.
466
467 Hudgins JW, Franceschi VR (2004) Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer
468 phloem defense responses and reprogramming of stem defense responses and reprogramming of stem cambial
469 zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiology* **135**, 2134-2149.
470

471 Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes.
472 *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1719-1728.
473
474 Krokene P, Nagy NE, Solheim H (2008) Methyl jasmonate and oxalic acid treatment of norway spruce:
475 anatomically based defense responses and increased resistance against fungal infection. *Tree Physiology* **28**, 29-
476 35.
477
478 Lehr NA, Schrey SD, Bauer R, Hampp R, Tarkka MT (2007) Suppression of plant defence response by a
479 mycorrhiza helper bacterium. *New Phytologist* **174**, 892-903.
480
481 Lehr NA, Schrey SD, Hampp R, Tarkka MT (2008) Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to
482 locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytologist* **177**,
483 965-976.
484
485 Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific
486 manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *Plos ONE* **3**, e2702.
487
488 Mastroberti AA, Mariath JEA (2003) Leaf anatomy of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae).
489 *Revista Brasileira de Botânica* **26**, 343-353.
490
491 MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2002) 'Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e
492 ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos
493 biomas brasileiros.' (Ministério do Meio Ambiente Press: Brasília).
494
495 Moreira-Souza M, Cardoso EJBN (2002) Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.
496 sob doses de fósforo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, in press.
497
498 Moreira-Souza M, Cardoso EJBN (2003) Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.
499 Ktze. seeds. *Scientia Agricola* **60**, 389-391.
500

501 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
502 *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
503
504 Nagy NE, Fossdal CG, Dalen LS, Lönneborg A, Heldal I, Johnsen O (2004) Effects of Rhizoctonia infection and
505 drought on peroxidase and chitinase activity in Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* **120**, 465-
506 473.
507
508 Olsen KM, Lea US, Slimestad R, Verheul M, Lillo C (2008) Differential expression of four *Arabidopsis* PAL
509 genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis.
510 *Journal of Plant Physiology* **165**, 1491-1499.
511
512 Paulitz TC, Bélanger RR (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* **39**,
513 103-133.
514
515 Poiatti VAD, Dalmas FR, Astarita LV (2009) Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to
516 attack by plant-pathogenic bacteria. *Biological Research* **42**, 205-215.
517
518 Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic
519 resistance by plant grow promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* **20**,
520 1-11.
521
522 Randhir R, Shetty P, Shetty K (2002) L-Dopa and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in
523 response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry* **37**, 1247-1256.
524
525 Reitz PR, Klein RM (1966) 'Araucariáceas.' (Série Flora Ilustrada Catarinense: Itajaí.)
526
527 Ritchie LE, Steiner JM, Suchodolski JS (2008) Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract
528 using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **66**, 590-598.
529

530 Rosado RM, Ferreira AG, Mariath JEA, Cocucci AE (1994) Starchy reserve of the megagametophyte of
531 *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: mobilization during germination and on the developing sporophyte. *Acta*
532 *Botânica Brasileira*, in press.

533

534 Sattler M (2006) Development of shoot and root system of juvenile *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.
535 growing on different sites. Thesis, Rottenburg University of Applied Forest Sciences.

536

537 Schrey SD, Tarkka MT (2008) Friends and foes: *Streptomyces* as modulators of plant disease and symbiosis.
538 *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 11-19.

539

540 Shimizu M, Meguro A, Hasegawa S, Nishimura T, Kunoh H (2006) Disease resistance induced by
541 nonantagonistic endophytic *Streptomyces* spp. on tissue-cultured seedlings of rhododendron. *Journal of General*
542 *Plant Pathology* **72**, 351-354.

543

544 Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of*
545 *Systematic Bacteriology* **16**, 313-340.

546

547 Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*
548 **35**, 235-270.

549

550 Suzuki T, Shimizu M, Meguro A, Hasegawa S, Nishimura T, Kunoh H (2005) Visualization of infection of an
551 endophytic actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured rhododendron. *Actinomycetologica* **19**,
552 7-12.

553

554 Toor RK, Savage GP (2005) Antioxidante activity in different fractions of tomato. *Food Research International*
555 **38**, 487-494.

556

557 Tromas A, Braun N, Muller P, Khodus T, Paponov IA, Palme K, Ljung K, Lee J-Y, Benfey P, Murray JAH et al
558 (2009) The auxin binding protein 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS*
559 *ONE* **4**, e6648.

560

561 Van der Ent S, Van Wees SCM, Pieterse CMJ (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-
562 inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* **70**, 1581-1588.
563
564 Van Peer R, Niemann GJ, Schippers B (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological
565 control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology* **81**, 728-734.
566
567 Vasconcellos RLF, Cardoso EJBN (2009) Rhizospheric *Streptomyces* as potential biocontrol agents of *Fusarium*
568 and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol* **54**, 807-816.
569
570 Whitham FH, Blaydes DF, Devlin RM (1971) 'Experiments in plant physiology.' (D van Nostrand Company:
571 New York).
572
573 Williams ST, Davies FL (1965) Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of Actinomycetes in
574 soils. *Journal of General Microbiology* **38**, 251-261.
575
576 Xiao K, Kinkel LL, Samac DA (2002) Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with
577 *Streptomyces*. *Biological Control* **23**, 285-295.
578
579 Zandavalli RB, Dillenburg LR, Souza PVD (2004) Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)
580 to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Applied Soil Ecology* **25**, 245-255.
581
582 Zhang H, Xie X, Kim M-S, Korniyev DA, Holaday S, Paré PW (2008) Soil bacteria augment *Arabidopsis*
583 photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal* **56**, 264-273.

584 Figure legends:

585

586 **Fig. 1.** Representation of 50-day old seedlings of *A. angustifolia* (a). Bar = 2 cm. In detail (b),
587 scanning electron microscopy of growth of *Streptomyces* sp. PM9 after five days of
588 inoculation in lateral root of *A. angustifolia*. Arrow indicates the megagametophyte.

589

590 **Fig. 2.** Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in roots of *A. angustifolia* at 1, 3, and 9
591 days after inoculation with suspension of *Streptomyces* (Isolates PM1, PM4 e PM9). Bars
592 represent standard errors of the means.

593

594 **Fig. 3.** Polyphenol oxidase (PPO) (a) and Peroxidase (POX) (b) activities in roots and shoots
595 of *A. angustifolia* at 1, 3, and 9 days after inoculation with suspensions of *Streptomyces*.

596 Different letters indicate significant differences within the same day and plant organ analyzed
597 (Duncan $P \leq 0.05$). Bars represent standard errors of the means.

Tables:

Table 1. Concentration of the indol-3-acetic acid (IAA) in *Streptomyces* isolates.

Different letters in columns indicate significant differences (Duncan $P \leq 0.05$).

Numbers in parenthesis represent standard errors of the means.

Isolate of <i>Streptomyces</i> sp.	IAA (mg g ⁻¹ FM)
PM1	0.1391(0.017) ^b
PM4	0.7886(0.224) ^a
PM9	0.9557(0.043) ^a

Table 2. Growth measurements of roots and shoots of *A. angustifolia* at 100 days after inoculation with suspensions of *Streptomyces*.

Different letters in the columns indicate significant differences within the same day and plant organ analyzed (Duncan $P \leq 0.05$). Numbers in parenthesis represent standard errors of the means.

Treatments	Root Length (cm)	Root Mass (g)	Root Volume (cm ³)	Root Density (g cm ⁻³)	Shoot Increment (%)
Control	33.65(0.96) ^a	1.95(0.06) ^a	2.24(0.07) ^a	0.92(0.03) ^b	40.28(2.77) ^b
<i>Streptomyces</i> sp. PM1	28.35(1.40) ^b	1.79(0.15) ^a	1.33(0.14) ^b	1.09(0.04) ^a	47.05(3.50) ^{ab}
<i>Streptomyces</i> sp. PM4	27.33(1.28) ^b	1.95(0.15) ^a	1.57(0.16) ^b	1.05(0.04) ^a	42.10(4.18) ^b
<i>Streptomyces</i> sp. PM9	27.11(1.12) ^b	1.80(0.12) ^a	1.62(0.15) ^b	1.03(0.03) ^a	54.74(4.71) ^a

Figures:

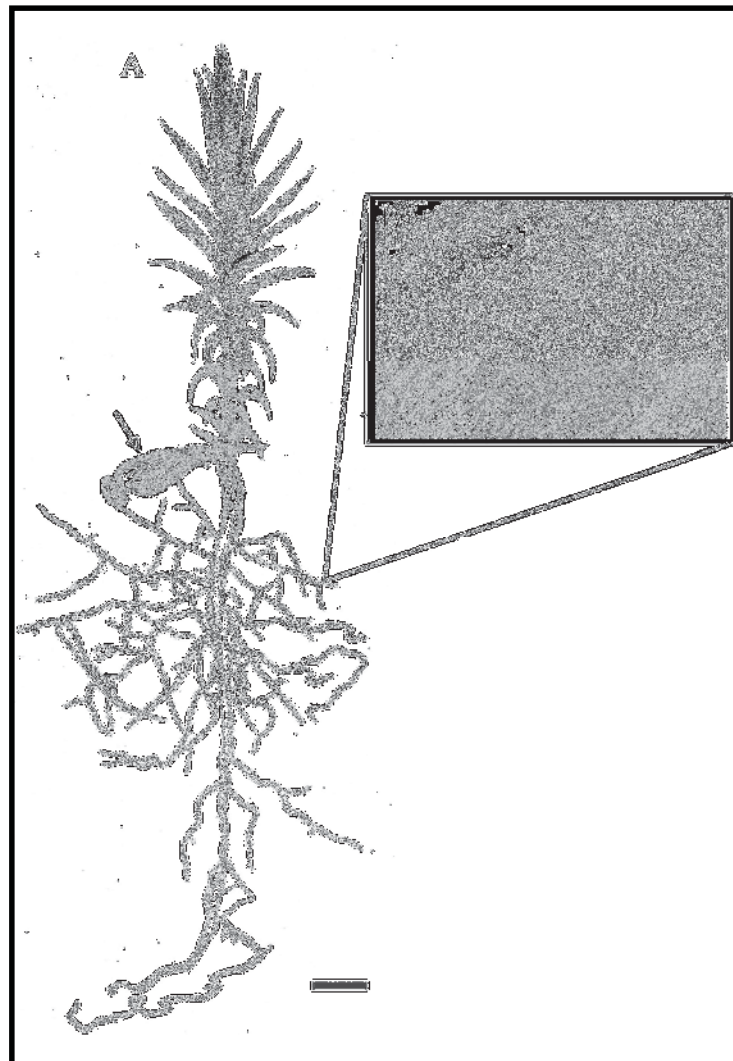


Fig. 1. Representation of 50-day old seedlings of *A. angustifolia* (A). Bar = 2 cm. In detail (B), scanning electron microscopy of growth of *Streptomyces* sp. PM9 after five days of inoculation in lateral root of *A. angustifolia*. Arrow indicates the megagametophyte.

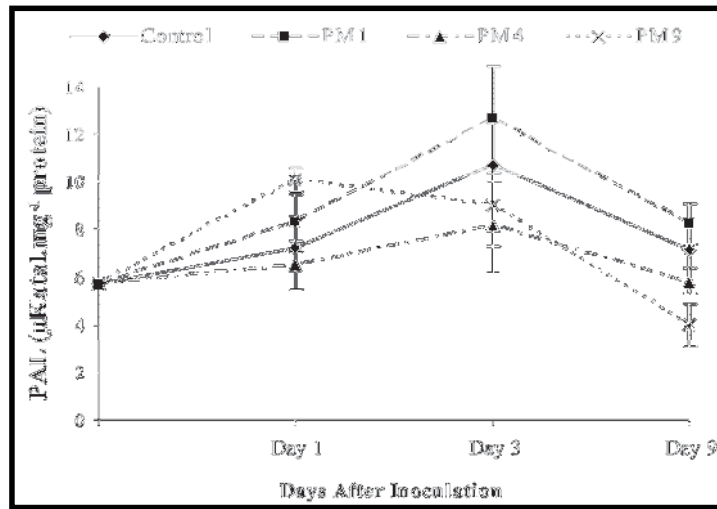


Fig. 2. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in roots of *A. angustifolia* at 1, 3, and 9 days after inoculation with suspension of *Streptomyces* (Isolates PM1, PM4 e PM9). Bars represent standard errors of the means.

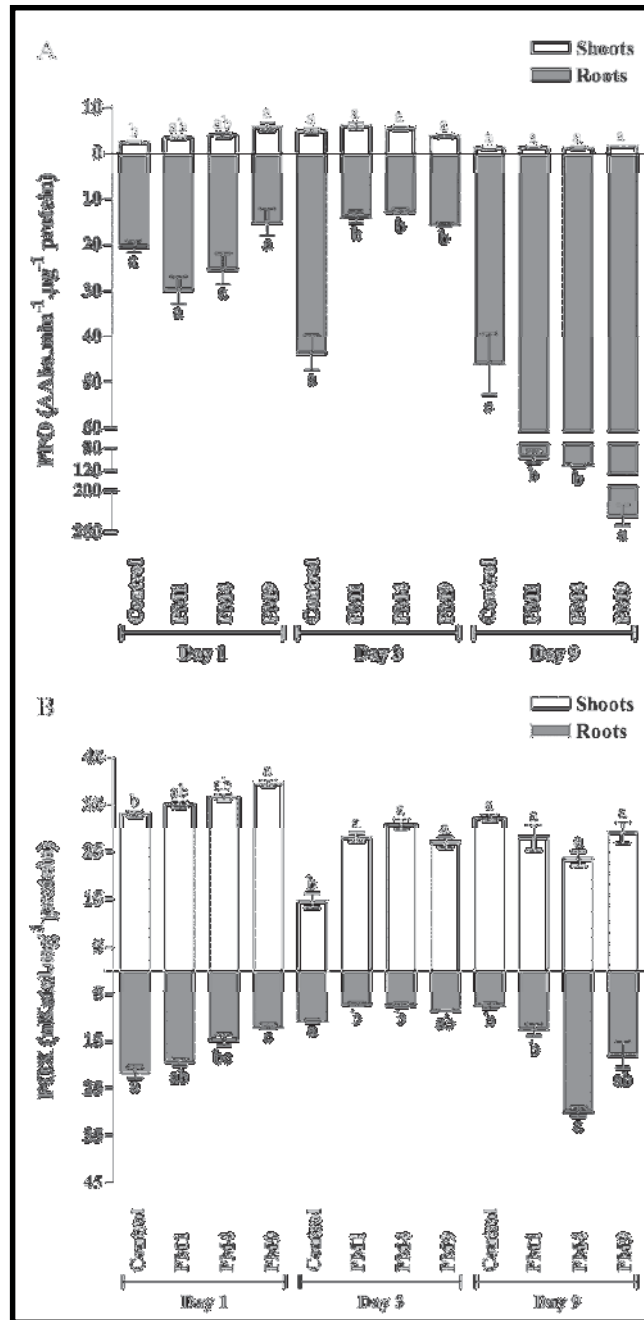


Fig. 3. Polyphenol oxidase (PPO) (A) and Peroxidase (POX) (B) activities in roots and shoots of *A. angustifolia* at 1, 3, and 9 days after inoculation with suspensions of *Streptomyces*. Different letters indicate significant differences within the same day and plant organ analyzed (Duncan $P \leq 0.05$). Bars represent standard errors of the means.

CAPÍTULO III
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que os *Streptomyces* autóctones são capazes de alterar tanto o metabolismo quanto a morfologia das plântulas de *A. angustifolia*, sem, no entanto, prejudicar o seu desenvolvimento. Os isolados avaliados neste experimento promoveram a diminuição tanto do volume quanto do comprimento das raízes. Esta característica morfológica de robustez poderia trazer vantagens quanto à capacidade de penetração no solo, pois esta espécie possui dificuldades de crescimento em solos compactados (1 MPa). Até o momento, esta característica de aumento da robustez tem sido relatada para raízes de *A. angustifolia* inoculadas com micorrizas. Contudo, nossos resultados indicam que as rizobactérias podem representar o fator determinante na modificação morfológica da raiz, podendo auxiliar na plasticidade da mesma independentemente do fungo micorrízico.

A expressiva morte de plântulas e a heterogeneidade no crescimento da espécie em condições controladas de laboratório indicam uma grande suscetibilidade das plantas nesta fase de desenvolvimento. Neste sentido, os fatores envolvidos na morte prematura dos cotilédones devem ser melhor compreendidos, pois a regeneração natural desta espécie pode estar sendo afetada por agentes biológicos antes da independência nutricional. Talvez seja este um dos principais fatores limitantes para o estabelecimento dos programas de reflorestamento com araucária, visto que o custo do plantio é elevado pela necessidade de superlotação de sementes.

Plantas inoculadas com o isolado PM9 apresentaram um incremento do comprimento da parte aérea, levando a um provável ganho na competição pelo fator luz em um ambiente natural. Da mesma forma, este isolado promoveu as maiores mudanças nas atividades das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e fenilalaina amônia-liase, tanto na parte aérea quanto nas raízes, indicando uma maior interação planta-bactéria.

Estas respostas morfológicas e metabólicas da araucária em relação ao PM9 podem significar ganhos na competição com outras plantas e/ou uma maior resistência aos estresses abióticos e ao ataque de agentes patogênicos em condições naturais. Aspectos relacionados a estes fatores deverão ainda ser avaliados, utilizando condições de laboratório e casa-de-vegetação a fim de relacionar à presença de rizobactérias com a capacidade de crescimento e de sobrevivência das plantas a campo. Estes estudos podem revelar que os microrganismos presentes na rizosfera são mais importantes para o sucesso da araucária do que a necessidade de solos ricos em nutrientes minerais.

REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, G. M.; MOHAMEDIN, A.H. Interactions between a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brawn scales. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 5. p. 401-409, dec. 2000.

AGRIOS, G.N. **How plants defend themselves against pathogens**. Plant Pathology, 4nd. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 635.

AKINWUNMI, O.; JOHN, L. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, n. 5, p. 199-208, may. 2001.

ALVAREZ, R.; NISSEN, S. J.; SUTTER, E. G. Relations between índole-3-acetic acid levels in Apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of índole-3-butyric acid. **Plant Physiology**, v. 89, p. 439-443, 1989.

AMARANTE, C. V. T. et al. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 346-351, mar-abr. 2007.

ANDRADE, A. C. S. et al. Mycorrhizal status of some plants of the araucaria forest and the atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. **Mycorrhiza**, v. 10, n. 3, p. 131-136, aug. 2000.

ANSELMINI, J. I. **Fenologia reprodutiva da Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. na região de Curitiba – PR**. 2005. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Setor de Ciência Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 967-973, jul, 2008.

ARNALDOS, T. L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.

BACKES, A. Condicionamento climático e distribuição geográfica de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Brasil-II. **Pesquisas Botânica**, v. 49, p. 5-40, 1999.

BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233-266, jan. 2006.

BARETTA, C. R. D. M. **Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia***. 2007. 158 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007.

BEHLING, H.; PILLAR, V. D.; ORLOCI, L.; BAUERMANN, S. G. Late quaternary *Araucaria* forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 203, p. 277-297, 2004.

BENT, E. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: TUZUN, S.; BENT, E. **Multigenic and induced systemic resistance in plants**. New York: Springer, 2006. p. 225-258.

BMBF PROJEKT ARAUKARIENWALD. Disponível em: <<http://www.uni-tuebingen.de/entw-phys/CD/html/berichte.html>>. Acesso em: 06 set. 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREUNINGER, M. **Mycorrhizierung von *Araucaria angustifolia***. 1997. 59 f. (Zulassungsarbeit)-Fakultat für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, 1997.

CAÇOLA, A. V. et al. Qualidade fisiológica da semente de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 391-398, out. 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira.** Brasília: Embrapa SP, 1994. p. 640.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 263.

COMPANT, S. et al. Use of plant growth-promoting for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, sep. 2005.

CONN, V. M.; WALKER, A. R.; FRANCO, C. M. M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 208-218, feb. 2008.

CRAWFORD, D.L. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3899-3905, nov. 1993.

DEKKERS, L. C. et al. A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 7051-7056, jun. 2008.

DIANESE, J. C.; RIBEIRO, W. R. C.; URBEN, A. F. Root rot of soybean caused by *Cylindrocladium clavatum* in central Brazil. **Plant Disease**, v. 70, p. 977-980, oct. 1986.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479-501, sep. 1994.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, jul. 1995.

DUARTE, L. S.; DILLENBURG, L. R. Ecophysiological responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seedlings to different irradiance levels. **Australian Journal of Botany**, v. 48, p. 531-537, 2000.

DUARTE, L. S.; DILLENBURG, L. R.; ROSA, M. G. Assessing the role of light availability in the regeneration of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 50, p. 741-751, 2002.

DUIJFF, B. J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v. 135 p. 325-334, 1997.

DUPONNOIS, R.; GARBAYE, J. Application des BAM (bacteres auxiliaires de la mycorrhizatin) a rinoculation du Douglas par *Laccaria laccata* S238 en pepiniere forestiere. **Revue Forestiere Frinifaise**, v. 44, p. 491-500, 1992.

EIRA, M. T. S. et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. – Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, jan. 1994.

EMBRAPA FLORESTAS. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/bolpesdes/arqgrat/pesq-andam-31.PDF>>. Acesso em: 11 sep. 2008.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 1-9, 1999.

ERRAKHI, R. et al. Evidences of biological control capacities os *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1503-1509, may 2007.

FERREIRA, A. G. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.: **germinação da semente e desenvolvimento da plântula**. 1977. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

FOSSDAL, C. G.; SHARMA, P.; LÖNNEBORG, A. Isolation of the first putative peroxidase cDNA from a conifer and the local and systemic accumulation of related proteins upon pathogen infection. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 3, p. 423-435, out. 2001.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 75-91, 1988.

FRANCO, A. M. S.; DILLENBURG, L. R. Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, v. 34, p. 135-144, feb. 2007.

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

GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 128, n. 76, p. 197-210, may. 1994.

GONZÁLEZ, E. M.; ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4068-4072, 1999.

GUERRA, M.P. et al. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: Simões, L. L.; Lino, C. F., eds. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo, SP: Senac Editora, 2003. p. 85-101.

HAAS, D.; KEEL, C.; REIMMANN, C. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 385-395, dec. 2002.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 387-412, sep. 1996.

HAMDALI, H. et al. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2565-2575, jul. 2008.

HORINOUCI, S. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 283-299, 2007.

HUDGINS, J.W.; FRANCESCHI, V. R. Methyl jasmonato-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2134-2149, aug. 2004.

IBAMA. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/flora/>>. Acesso em: 25 aug. 2008.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 15 jul. 2010.

JANOS, D. P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. **Ecology**, v. 61, p. 151-162, jan. 1980.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, mar. 2006.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Tradução de: Simões, A.O. et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 632

KERSHAW, P.; WAGSTAFF, B. The southern conifer family araucariaceae: history, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 397-414. 2001.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. C. **Araucária: a floresta do Brasil meridional**. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002. 148 p.

KORNDORFER, C. L.; MÓSENA, M.; DILLENBURG, L. R. Initial growth of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) under equal soil volumes but contrasting rooting depths. **Trees**, v. 22, p. 835-841, 2008.

LABEDA, D. P. **Isolation of biotechnological organisms from nature**. Illinois: McGraw-Hill, 1990. (Série the mcgraw-hill environmental biotechnology).

- LEHR, N.A. et al. Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. **New Phytologist**, v. 174, p. 892-903, feb. 2007.
- LEHR, N.A. et al. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. **New Phytologist**, v. 177, n. 4, p. 965-976, mar. 2008.
- LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M.; CROTEAU, R. Defense mechanisms of conifers. **Plant Physiology**, v. 96, p. 44-49. 1991.
- LONG, H.H.; SCHMIDT, D.D.; BALDWIN, I.T. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **Plos One**, v. 3, e2702, jul. 2008.
- LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 469-487, 2006.
- MAIER, A. et al. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic, and plant parasitic soil fungi in dual culture. **Mycological Progress**, v. 3, n. 2, p. 129-136, may 2004.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787-796, out-dez 2004.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das gimnospermas**. Santa Maria: UFSM, 1996. 158 p.
- MASTROBERTI, A.A.; MARIATH, J.E.A. Leaf anatomy of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 343-353, jul. 2003.
- MATTOS, L. M. **Métodos de análises de flavonóides e antioxidantes de própolis**. 2000. Dissertação (Mestrado em Farmácia)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4068-4072, 2000.

MEINICKE, A. C. **Micorriza: terra viva, produtiva para sempre**. Ponta Grossa: IMPAG, 1991. 60 p.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2002. 404 p.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, v. 6, p. 261-284, 1998.

MOREIRA, M. et al. Sporulation and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil pine in the field and in the greenhouse. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 6, p. 519-526, mar. 2007a.

MOREIRA, M. et al. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Science Agriculture**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 393-399, jul-aug. 2007b.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E.J.B.N. Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sob doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, in press. 2002.

MOREIRA-SOUZA, M. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 4, p. 211-215, feb. 2003.

MÓSENA, M.; DILLENBURG, L. R. Early growth of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* [Bertol.] Kuntze) in response to soil compaction and drought. **Plant and Soil**, v. 258, p. 293-306, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul. 1962.

NIRANJAN RAJ, S.; SHETTY, H. S.; REDDY, M. S. Plant growth promoting rhizobacteria: potential greenn alternative for plant productivity. In: Siddiqui, Z. A., eds. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer: Netherlands, 2006. p. 197-216.

OLSEN, K. M. et al. Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. **Journal of Plant Pathology**, v. 165, n. 14, p. 1491-1499, sep. 2008.

PALUDO, G. F.; MANTOVANI, A.; KLAUBERG, C.; REIS, M. S. Estrutura demográfica e padrão espacial de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) na reserva genética florestal de Caçador, estado de Santa Catarina. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 1109-1121, 2009.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

POZO, M. J. et al. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 180, p. 511-523, jun. 2008.

PUCHALSKI, A.; MANTOVANI, M.; REIS, M. S. Variação em populações naturais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze associada a condições edafo-climáticas. **Scientia Forestalis**, v. 70, p. 137-148, abr. 2006.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-Doppa and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1247-1256, 2002.

REITZ, P. R.; KLEIN, R. M. **Araucariáceas**. Itajaí: [s.n.], 1966. 62 p. (Série flora ilustrada catarinense).

RIBEIRO, S. B. et al. Classification and diversity of arboreal community of the moist ombrophylous forest in the Flona of São Francisco de Paula Flona, RS. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 2, p. 101-108, apr-jun. 2007.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **The Plant Cell**. vol. 16, p. 3426-3436, 2004.

ROSADO, R.M. et al. Starchy reserve of the megagametophyte of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: mobilization during germination and on the developing sporophyte. **Acta Botânica Brasílica**, in press. jan. 1994.

SCHREY, S. D. et al. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **New Phytologist**, v. 168, n.1, p. 205-216, oct. 2005.

SCHREY, S. D.; TARKKA, M. T. Friends and foes: *Streptomyces* as modulators of plant disease and symbiosis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 11-19, apr. 2008.

SHIMIZU, M. et al. Disease resistance induced by nonantagonistic endophytic *Streptomyces* spp. on tissue-cultured seedlings of rhododendron. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, p. 351-354, may. 2006.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, jul. 1966.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. San Diego: Academic Press, 1997. 605 p.

SOUZA, V. A.; HATTEMER, H. H. Fenologia Reprodutiva da *Araucaria angustifolia* no Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 47, p. 19-32, jul-dez. 2003.

SOUZA, V. C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 612-618, dez. 2005.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, sep. 1997.

STRACK, D. et al. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1955-1979, sep. 2003.

SUIHKO, M. L. et al. Detection and molecular characterization of filamentous actinobacteria and thermoactinomycetes present in water-damaged building materials. **Indoor Air**, v. 19, p. 268-277, 2009.

SUZUKI, T. et al. Visualization of infection of an endophytic actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured rhododendron. **Actinomycetologica**, v. 19, p. 7-12, mar. 2005.

TARKKA, M. T. et al. Scots pine expresses short-root-specific peroxidases during development. **European Journal of Plant Pathology**, v. 268, n. 1, p. 86-92, dec. 2001.

THOMÉ, N. **Ciclo da madeira: história da devastação da floresta da araucária e do desenvolvimento da indústria da madeira em Caçador e na região do contestado no século XX**. Caçador: Universal, 1995. 212 p.

TROMAS, A. et al. The auxin binding protein 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. **Plos One**, v. 4, e6648, sep. 2009.

TROPICOS. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/>>. Acesso em: 23 ago. 2008.

VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1581-1588, aug. 2009.

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

WHITHAM, F. H.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. M. **Experiments in plant physiology**. 1nd. ed. New York: D. van Nostrand Company, 1971, p. 245.

XIAO, K.; KINKEL, L. L.; SAMAC, D. A. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biological Control**, v. 23, p. 285-295, nov. 2002.

ZANDEVALLI, R. B.; DILLENBURG, L. R.; SOUZA, P. V. D. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied Soil Ecology**, v. 25, n. 3, p. 245-255, mar. 2004.

ZANDEVALLI, R. B.; STÜRMER, S. L.; DILLENBURG, L. R. Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi in forests with *Araucaria* in Southern Brazil. **Hoehnea**, v. 35, p. 63-68. 2008.

ZEHNDER, G. W. et al. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 39-50, aug. 2000.

ZHANG, H. et al. Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **The Plant Journal**, v. 56, p. 264–273, aug. 2008.

ANEXOS

ANEXO I – MATERIAL SUPLEMENTAR



Figura 2. Aspecto morfológico da semente (pinhão) de *A. angustifolia* utilizado nos experimentos.



Figura 3. Armazenamento das sementes de *A. angustifolia* em câmara a 0 °C.



Figura 4. Semente escarificada de *A. angustifolia* embebida por 6 dias em água destilada estéril.



Figura 5. Plântulas de *A. angustifolia* com 20 dias de idade.

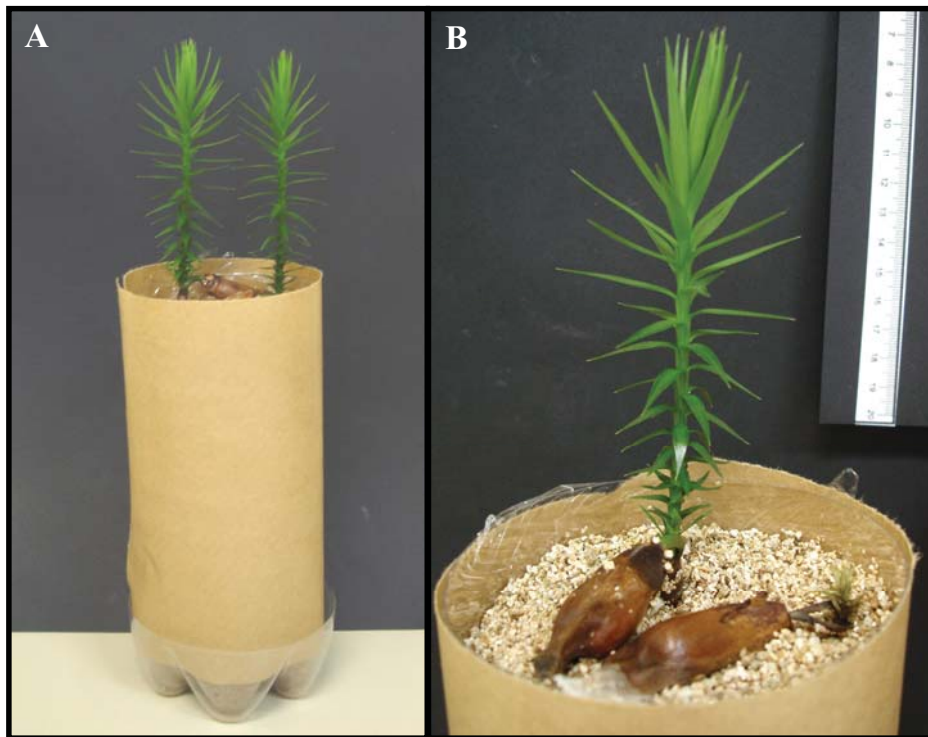


Figura 6. Comparação entre o desenvolvimento das plântulas com cotilédones saudáveis (A) e necrosados (B) de *A. angustifolia* com 50 dias de idade.

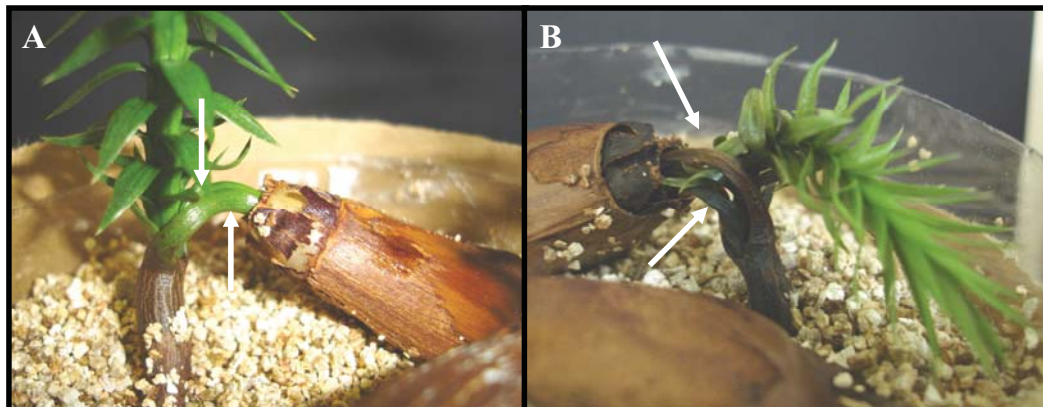


Figura 7. Comparação entre cotilédones (setas) saudáveis (A) e necrosados (B) de plântulas de *A. angustifolia* com 50 dias de idade.

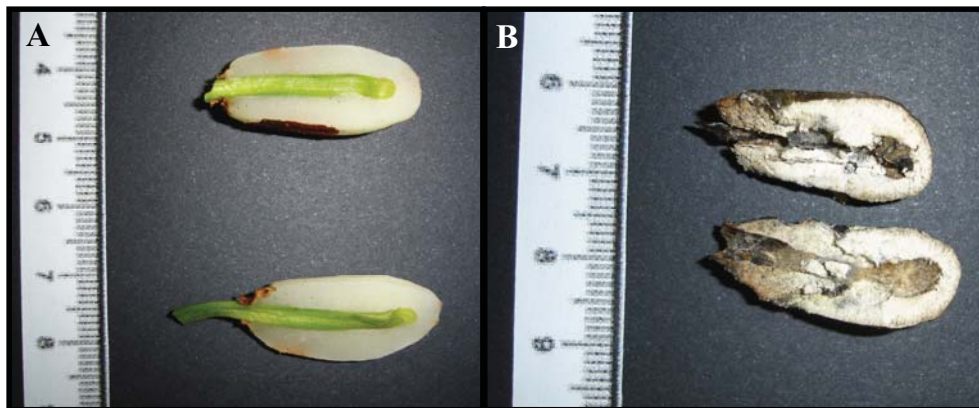


Figura 8. Comparação entre megagametófitos saudáveis (A) e necrosados (B) de plântulas de *A. angustifolia* com 50 dias de idade em corte longitudinal.

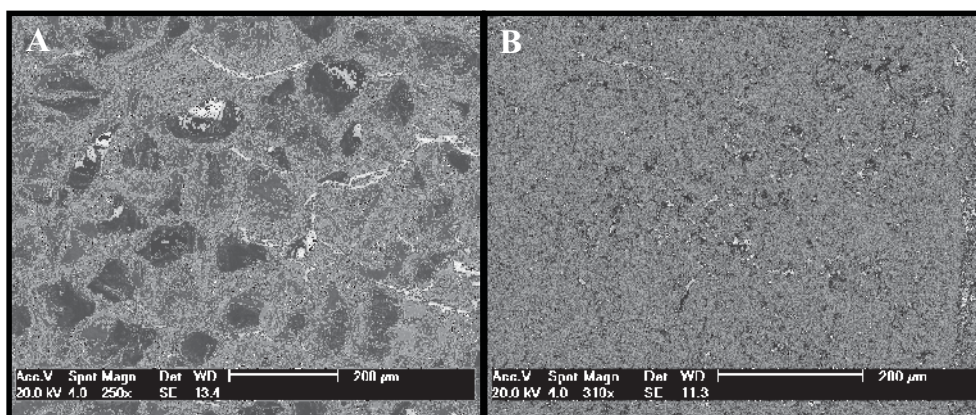


Figura 9. Visualização em microscopia eletrônica de varredura do consumo dos grãos de amido contidos nos megagametófitos saudáveis (A) e necrosados (B) de plântulas de *A. angustifolia* com 50 dias de idade em corte transversal.

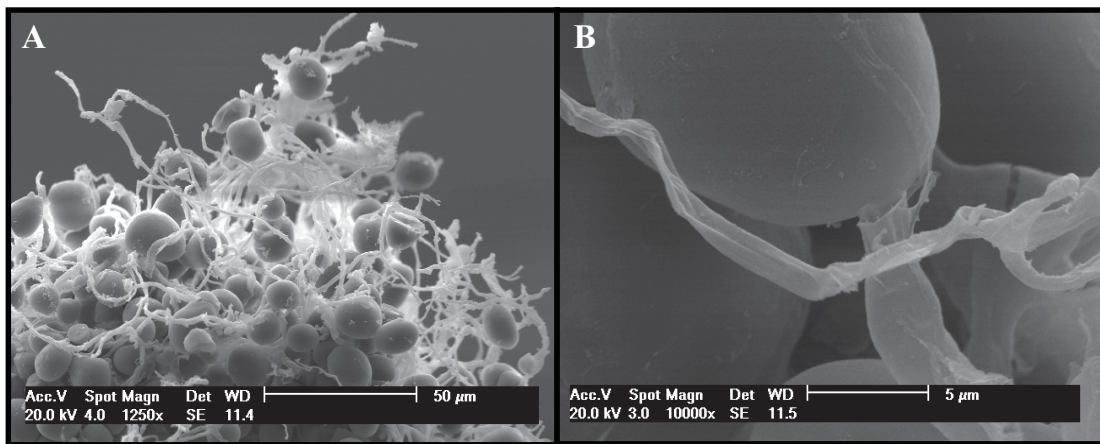


Figura 10. Visualização em microscopia eletrônica de varredura de hifas ao entorno dos grãos de amido (A, B) contidos nos megagametófitos necrosados de plântulas de *A. angustifolia* com 50 dias de idade em corte transversal.



Figura 11. Plântulas de *A. angustifolia* com 150 dias de idade.

ANEXO II - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

CSIRO PUBLISHING

Australian Journal of Botany

An international journal for plant science

OSPREY Online Submission and Peer Review [Contact Us](#) [Support](#) [About](#) [Log Out](#)

Logged in as: Leandro Astarita

Submitted Manuscripts Status

[Return to Menus](#)


[Help](#)

Submitted Manuscripts

Manuscript Number	Version	Title	Date Submitted	Status	Outcome
BT10175	1	Autochthonous Streptomyces regulate the metabolism...	13/07/2010	For Evaluation	

Only the most current version of the manuscript is shown.

OSPREY Online Submission and Peer Review [Contact Us](#) [Support](#) [About](#) [Log Out](#)


© CSIRO 2004-2008