

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

Priscila Monteiro Pereira

***Streptomyces* spp. E SEUS METABÓLITOS COM ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pyrenophora tritici-repentis*
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TRIGO**

Porto Alegre

2023

Priscila Monteiro Pereira

***Streptomyces* spp. E SEUS METABÓLITOS COM ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pyrenophora tritici-repentis*
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TRIGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

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

Coorientador: Dr. Flávio Martins Santana

Porto Alegre

2023

Pereira, Priscila Monteiro

Streptomyces spp. E SEUS METABÓLITOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE Pyrenophora tritici-repentis E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TRIGO / Priscila Monteiro Pereira. -- 2023.

116 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Coorientadora: Flávio Martins Santana.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Streptomyces spp.. 2. Pyrenophora tritici-repentis. 3. biocontrole. 4. trigo. 5. metabólitos. I. Van Der Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Santana, Flávio Martins, coorient. III. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, dono da vida e todo o saber, e que me deu forças e saúde para chegar até aqui.

Ao longo destes quatro anos e meio eu não estive sozinha, pois muita gente contribuiu de alguma forma para que este trabalho se concluísse.

Inicio agradecendo à minha querida orientadora Sueli Van Der Sand por todo suporte, mentoria, confiança e amizade nestes seis anos desde o Mestrado, pois sem ela este projeto não sairia do papel.

Aos muitos colegas de vários laboratórios distribuídos entre o ICBS, Agronomia e Campus do Vale da UFRGS, onde pude ter o apoio de técnicos, servidores, pós-graduandos em vários dos ensaios e experimentos que foram realizados. Em especial os colegas que passaram pelo nosso Lab 323/539.

Em especial agradeço o apoio do professor Marcelo Gravina de Moraes que sempre nos cedeu o espaço da casa de vegetação e dependências do seu laboratório, esta parceria foi essencial.

Ao grupo de técnicos e ao meu coorientador Flávio Martins Santana da Embrapa Trigo em Passo Fundo, que me receberam muito bem, lá em 2018, para que eu pudesse aprender a cultivar as “Drechslera”!

À querida Ana Paula Folmer que mesmo à distância fez o seu máximo para me auxiliar no que foi possível nas últimas etapas deste trabalho.

À professora Maria Lúcia Scroferneker que sempre esteve disposta a auxiliar-nos no que fosse preciso e foi uma professora muito amiga nestes tempos de pandemia.

Agradeço ao meu esposo Tiago Nascimento que sempre me apoiou, incentivou, muitas vezes cedendo do seu tempo para me ajudar, em todos os momentos durante este trabalho.

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

***Streptomyces* spp. E SEUS METABÓLITOS COM ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pyrenophora tritici-repentis*
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TRIGO**

Autora: Priscila Monteiro Pereira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli T. Van Der Sand
Coorientador: Dr. Flávio Martins Santana

RESUMO

Streptomyces são actinobactérias capazes de produzir diversos compostos bioativos e podem interagir com sua planta hospedeira conferindo-lhe vantagens como, promoção de crescimento e controle de doenças. A mancha amarela causada por *Pyrenophora tritici-repentis* acomete principalmente a cultura do trigo e que para garantir a produtividade é necessária a utilização de fungicidas sintéticos, porém existe o risco do desenvolvimento de cepas fúngicas resistentes às moléculas químicas aplicadas além de causarem desequilíbrio ambiental. A fim de propor uma alternativa que visa diminuir o uso de fungicidas sintéticos no cultivo do trigo e agregar no manejo integrado de doenças, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico de dois *Streptomyces* spp. e seus metabólitos frente a *P. tritici-repentis* (*Ptr*). Para tanto, testes *in vitro* e *in vivo* buscando atividade antifúngica e produção de compostos relacionados à promoção do crescimento vegetal foram executados. Os isolados 6(4), R18(6), consórcio e seus metabólitos demonstraram antagonismo frente a *Ptr*, os isolados também produziram AIA, sideróforos e solubilizaram fosfato. As plantas inteiras de sementes inoculadas tiveram menor porcentagem de área sintomática comparadas com as plantas não tratadas. Já com o tratamento duplo de inoculação de semente mais a pulverização dos metabólitos na parte aérea, conferiu, além de controle da doença, ganho de massa seca indicando promoção de crescimento. A análise do sobrenadante livre de células por UHPLC-QTOF MS indicou a presença de uma variedade de compostos, e com atividade antifúngica conhecida foi detectada na amostra do isolado 6(4) a presença dos compostos erucamida e bengamida. Desta forma, concluímos que estes isolados e seus metabólitos têm potencial para serem utilizados no controle biológico de *P. tritici-repentis* e podem contribuir para o manejo mais sustentável da mancha amarela, favorecendo o desenvolvimento das plantas de trigo.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (116 p.) janeiro, 2023.

Streptomyces spp. AND THEIR METABOLITES WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY
FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *Pyrenophora tritici-repentis* AND GROWTH
PROMOTION OF WHEAT PLANTS¹

Author: Priscila Monteiro Pereira

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

Co-Advisor: Prof. Dr. Flávio Martins Santana

ABSTRACT

Streptomyces are actinobacteria capable of producing several bioactive compounds and can interact with their host plant, conferring advantages such as growth promotion and disease control. The tan spot caused by *Pyrenophora tritici-repentis* mainly affects the wheat crop, where in order to ensure productivity requires the use of synthetic fungicides, however there is a risk of developing fungal strains resistant to the chemical molecules applied, in addition to causing environmental imbalance. In order to propose an alternative that aims to reduce the use of synthetic fungicides in wheat cultivation and add to the integrated management of diseases, this work aimed to evaluate the antifungal potential of two *Streptomyces* spp. and its metabolites against *P. tritici-repentis* (*Ptr*). For that, *in vitro* and *in vivo* tests seeking antifungal activity and production of compounds related to the promotion of plant growth were performed. The strains 6(4), R18(6), consortium and their metabolites showed antagonism against *Ptr*, also produced IAA, siderophores and solubilized phosphate. The whole plants of inoculated seeds had a smaller percentage of symptomatic area compared with untreated plants. With the double treatment of seed inoculation plus the spraying of the metabolites in the shoot, in addition to disease control, they provided biomass gain indicating growth promotion. Analysis of the cell-free supernatant by UHPLC-QTOF MS indicated the presence of a variety of compounds, and with known antifungal activity, the presence of erucamide and bengamide was detected in the strain 6(4) culture broth. Thus, we conclude that these isolates and their metabolites have the potential to be used in the biological control of *P. tritici-repentis* and can contribute to a more sustainable management of tan spot, favoring the development of wheat plants.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (116 p.) January, 2023.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Cultivo do trigo.....	4
3.2	Mancha amarela da folha do trigo	5
3.3	Formas de controle da mancha amarela	7
3.4	Controle biológico de pragas e doenças	9
3.5	Mecanismos de biocontrole	11
3.6	<i>Streptomyces</i> e os compostos bioativos	13
3.7	Metabólitos secundários	15
3.8	Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa de alta resolução	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Culturas microbianas.....	19
4.2	Produção do inóculo fúngico	19
4.3	Produção dos compostos antifúngicos em cultura submersa	20
4.4	Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.....	20
4.5	Efeito do extrato bruto e concentrado dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp. na germinação dos conídios de <i>Ptr</i>	21
4.6	Produção de ácido indolacético e sideróforo, solubilização de fosfato e redução de nitrato pelos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.	22
4.7	Ensaio da folha destacada	23
4.8	Ensaio em casa de vegetação	24
4.9	Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa de alta resolução	25
4.10	Concentração inibitória mínima	26
4.11	Novos isolados de actinobactéria	26

5.	ARTIGOS.....	29
5.1.	Evaluation of <i>Streptomyces</i> spp. strains as potential biocontrol agents for <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	29
5.2.	Biological control of <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> by <i>Streptomyces</i> spp.....	42
5.3.	Resultados não apresentados na forma de artigo.....	76
5.3.1.	Novos isolados.....	77
6.	DISCUSSÃO GERAL.....	79
7.	CONCLUSÕES.....	85
8.	REFERÊNCIAS.....	87
9.	APÊNDICES.....	101

LISTA DE TABELAS

Artigo 1.

Table 1. Antifungal activity (mm) of the crude extract from the <i>Streptomyces</i> isolates against <i>P.tritici-repentis</i> isolates and inhibition of mycelial growth (%) of the <i>P.tritici-repentis</i> isolates by <i>Streptomyces</i> isolates in dual culture assay.....	34
Table 2. Evaluation of treatments with the crude and concentrate extracts and pre-seed inoculation with <i>Streptomyces</i> isolates and wheat leaves infected with <i>P.tritici-repentis</i>	36

Artigo 2.

Table 1. Production of plant growth regulators	69
Table 2. Effect of <i>Streptomyces</i> spp. and their metabolites in control <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> on wheat plants.....	70
Table 3. Compounds identified from the cell-free supernatant of strain 6(4) through LC-MS/MS with error lower 5 ppm	71

Resultados não apresentados em forma de artigo.

Tabela 1. Produção de compostos relacionados à promoção de crescimento vegetal e resultado da atividade antifúngica frente a <i>P.tritici-repentis</i>	78
Tabela 2. Características morfológicas e culturais dos isolados de actinobactéria.....	78
Tabela 3. Promoção de crescimento das plântulas de trigo de sementes inoculadas com os novos isolados de actinobactéria.....	78

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figure 1. Light micrographs of mycelium alterations of *P.tritici-repentis* in crude extract presence. (a) and (b) *Streptomyces* sp. 6(4); (c) consortium; (d) Control, *Pyrenophora tritici-repentis* normal hyphae 35

Figure 2. Leaves treated with the concentrated extract of (a) *Streptomyces* sp. 6(4); (b) the consortium and (c) *Streptomyces* sp. R18(6). Leaves treated with the crude extract of (d) 6(4); (e) the consortium and (f) R18(6); (g) the control, only *Pyrenophora tritici-repentis*..... 37

Artigo 2

Figure 1. Light micrographs of MIC assay. Abnormal conidia germination in presence of filtered culture of *Streptomyces* sp. 6(4). A) 57 mg/ml – alterations such as vesicles and wrinkling of the wall; B) 7.12 mg/ml – damage in cell wall; C) 3.56 mg/ml – damage in cell wall and wrinkling of the hyphae; D) control, without alterations and completely germinated. The black arrows indicate the changes. Scale bar = 5 µm. 72

Figure 2. The low severity of tan spot on leaves of seedlings of wheat treated with the antagonist. The three leaves in each frame are the sequence of days analyzed, first day, mid-week and seventh day of capture. A) strain 6(4) – sowing furrow; B) strain 6(4) – sowing furrow and foliar spray; C) strain R18(6) - sowing furrow; D) strain R18(6) - sowing furrow and foliar spray; E) consortium - sowing furrow; F) consortium - sowing furrow and foliar spray; G and H) untreated control - foliar spray only of *P. tritici-repentis* 73

Figure 3. Mass spectra of sample 6(4) indicate erucamide presence (m/z 338.34), and fragments confirmation (last figure). The arrows show corresponding pikes 74

Figure 4. Mass spectra of sample 6(4) indicate bengamide Z (m/z 389.22) presence 75

Resultados não apresentados em forma de artigo.

Figura 1. Tipos de cadeia de esporos (figuras de cima) e morfologia colonial dos isolados de actinobacteria (figuras de baixo). A) ônix; B) MR2; C) MR3 77

Figura 2. Halos de inibição do crescimento micelial de *P. tritici-repentis* em presença do extrato livre de células do isolado ônix 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCBio - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico

ACA - Amido Caseína Ágar

bbCID - broadband collision–induced dissociation (dissociação induzida por colisão de banda larga)

BDA – Batata Dextrose Ágar

CAS – Chromeazurol S

Conab – Companhia Nacional de Abastecimento

Dtr – *Drechslera tritici-repentis*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

eV – elétron-volt

Hz - hertz

ISR - Induced Systemic Resistance (Resistencia sistêmica induzida - RSI)

LC-MS - Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida-espectrometria de massa)

m/s – Metros por segundo

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH - Metanol

ml – mililitros

QTOF - Quadrupole – Time of Flight (Quadrupolo Tempo de Vôo)

µg – micrograma

µl – microlitro

NBRIP - National Botanical Research Institute's Phosphate

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)

ppm – partes por milhão

Ptr – *Pyrenophora tritici-repentis*

Rpm – Rotação por minuto

SAR- Systemic Acquired Resistance (Resistência sistêmica adquirida - RSA)

UHPLC - Ultra High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Performance)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USDA - United States Department of Agriculture

V8 - Suco de vegetais V8 Campbell's

1. INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum*) é um dos cereais mais produzidos no mundo, com 220 milhões de hectares plantados, sendo uma opção importante na dieta de muitos povos. O trigo juntamente com o milho (*Zea mays*) e o arroz (*Oryza sativa*), são culturas básicas fundamentais para a segurança alimentar no mundo. Estes três principais cereais fornecem 50% das calorias alimentares da humanidade (Singh et al., 2006; FAO, 2018).

No Brasil, a região Sul é a principal produtora de trigo, responsável por 90% da produção nacional, no entanto, essa produção conseguiu avançar para outras regiões do país devido aos avanços em pesquisa e tecnologia. Mesmo assim o Brasil ainda não é autossuficiente em trigo. Conforme dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex), em fevereiro de 2020, o Brasil importou 526,1 mil toneladas de trigo e segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) de 2022, o consumo anual está estabilizado em 12,5 milhões de toneladas.

O cultivo do trigo no sul do Brasil está localizado na região ME 3 (Wheat Atlas, 2016), representado pela cidade de Passo Fundo no Rio Grande do Sul, Brasil, esta região é caracterizada por alta pluviosidade, alta umidade e temperatura mínima entre 3 e 16 °C no período do plantio. Além do estresse térmico e do solo ácido característico do país, esse cultivo sofre com doenças fúngicas como as manchas foliares e ferrugem, contribuindo para a diminuição do rendimento e qualidade da produção (Reis et al., 2011).

O fungo *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. é o agente causal da mancha amarela da folha do trigo, a principal mancha foliar deste cereal no sul do Brasil. Esta doença causa lesões necróticas na folha comprometendo o total desenvolvimento vegetal, diminuindo a produtividade e acarretando em muitos prejuízos ao produtor. A mancha amarela é uma doença economicamente importante, pois se não controlada pode levar a perdas de até 70% no rendimento (Moreno et al., 2012; Santana et al., 2017).

Para garantir a produção, a utilização de agroquímicos para tratamento de fitopatógenos é necessária, no entanto, em longo prazo podem surgir patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, além da contaminação ambiental

e o desequilíbrio dos ecossistemas (Zadoks, 1992; Veiga et al., 2006; Jorgensen e Olsen, 2007). Em 1995 Byerlee e Traxler, já defendiam que princípios da intensificação sustentável dos agroecossistemas seriam exigidos para reverter o declínio da produtividade frente às mudanças climáticas, onde as novas variedades precisariam ser acompanhadas com práticas de manejo sustentável para impedir a piora da escassez de água e a degradação do solo.

O controle de doenças fúngicas através de métodos que afetam menos o meio ambiente e que evitem a resistência dos patógenos aos fungicidas abrangem práticas agrícolas sustentáveis, incluindo o uso de produtos biológicos e/ou em conjunto com as aplicações de produtos convencionais. O mercado global de bio defensivos agrícolas mostra um crescimento anual, com a Europa representando a maior comercialização (30%) destes produtos e a América Latina tem 13% deste mercado (AbcBio, 2018). Em 2020, o MAPA anunciou que o mercado de bio defensivos cresceu mais de 70% no Brasil em um ano, e que segue tendência mundial de redução do uso de agroquímicos para combater pragas e doenças nas lavouras.

Dentro deste contexto, na busca por novos produtos e microrganismos eficientes no controle de fitopatógenos, as actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido estudadas como ferramenta de biocontrole de fungos fitopatogênicos devido ao seu intenso antagonismo através da produção de vários metabólitos antifúngicos (Rothrock e Gottlieb, 1984; Newitt et al., 2019). A combinação destes diversos compostos bioativos produzidos por elas pode impedir o desenvolvimento de resistência genética do fitopatógeno. Sendo assim, a utilização de estirpes de *Streptomyces* na agricultura pode ser um avanço importante sobre os problemas recorrentes da resistência aos pesticidas convencionais (Challis e Hopwood, 2003; Bosch et al., 2014), além de contribuir para o aporte de nutrientes e produção de fito hormônios que auxiliam no desenvolvimento e crescimento da planta hospedeira (Palaniyandi et al., 2014; Newitt et al., 2019).

Portanto, este trabalho buscou investigar a capacidade de dois isolados de *Streptomyces* spp. – 6(4), R18(6) e seu consórcio – bem como de seus metabólitos, em controlar o fungo *Pyrenophora tritici-repentis* causador da mancha amarela em plantas de trigo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral investigar a capacidade de dois isolados de *Streptomyces* spp. e o consórcio dos mesmos, bem como os metabólitos produzidos por eles, em controlar o fungo *Pyrenophora tritici-repentis* causador da mancha amarela e quais os seus benefícios para as plantas de trigo.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar a atividade antifúngica de dois isolados de *Streptomyces* sp. - 6(4), R18(6) e do consórcio entre eles frente a *Pyrenophora tritici-repentis*.
- 2.2.2 Avaliar o efeito dos extratos brutos e concentrados destes isolados de *Streptomyces* spp. sobre *P. tritici-repentis*.
- 2.2.3 Avaliar a capacidade destes isolados de *Streptomyces* spp. e seus metabólitos em promover o crescimento vegetal e controlar o fitopatógeno *P. tritici-repentis* em condição de casa de vegetação.
- 2.2.4 Identificar os compostos responsáveis por esta atividade antifúngica através de espectrometria de massas de alta resolução.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cultivo do trigo

No Brasil o cultivo de trigo provavelmente começou com a colonização portuguesa em São Vicente, litoral de São Paulo, ainda no século XVI. Depois, migrou rumo ao sul, onde o ambiente apresentava condições climáticas mais adequadas às suas necessidades (Bacaltchuk, 1999). A maior parte da produção ocorre na região Sul do país, especialmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul (Farias et al., 2016). Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o trigo não é considerado uma cultura-alvo em outros estados, mas é usado para a rotação de culturas, o que garante melhor solo e cultivo com menor incidência de pragas e doenças. No entanto, em alguns lugares o cereal vem ganhando espaço, com o aumento de produção nos últimos anos como, São Paulo, Minas Gerais, região do Cerrado (Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal) e Bahia. Isso é possível devido ao avanço de tecnologias e o desenvolvimento de cultivares mais resistentes às intempéries de cada região (Farias et al., 2016).

No mundo, o trigo é o segundo cereal mais produzido com mais de 220 milhões de hectares plantados anualmente, sob amplas faixas de condições climáticas e em muitas regiões geográficas (Shiferaw et al., 2013). A sua relevância para a agricultura global está associada à sua integração com numerosas cadeias produtivas, principalmente no setor de alimentos para humanos (71%) e menos de 20% é usado para alimentação animal (USDA, 2019; Shiferaw et al., 2013).

No Brasil, dados da Conab (2022) relataram que o consumo de trigo está estabilizado em 12,5 milhões de toneladas. A estimativa de produção nas safras de 2021/22 ficou em 7,7 milhões de toneladas. Para suprir a demanda interna, o Brasil importou 534,9 mil toneladas, 9,5% a mais que no ano de 2021. Os principais fornecedores são Argentina (92,87%), Paraguai (7%) e Uruguai (0,07%).

As práticas de lavoura de conservação, a adição de adubação verde e a rotação de culturas estão se espalhando pela adoção do sistema de plantio direto, que é mais adequado às condições de solo e clima brasileiros (Baumgratz et al., 2017). Porém, o trigo pode sofrer com diversas doenças associadas à prática do plantio direto, como o complexo de manchas foliares que é causado por um grupo de fungos, sendo os principais patógenos *Pyrenophora tritici-repentis* (mancha bronzeada ou mancha amarela), *Bipolaris sorokiniana* (mancha marrom) e *Stagonospora nodorum* (mancha da gluma). Esses patógenos possuem em comum a alta habilidade saprofítica e possuem a capacidade de sobreviver nas sementes e restos culturais (Fernandes e Picinini, 1999).

3.2 Mancha amarela da folha do trigo

Pyrenophora tritici-repentis (Died.) Drechs. é o agente causal da mancha bronzeada/castanha/amarela da folha do trigo. É um fungo parasita facultativo (saprotrófico) do Filo Ascomycota, Classe Loculoascomycetes, cujo anamorfo corresponde a *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoeman., fungo imperfeito da classe Hyphomycetes. Foi isolado pela primeira vez de *Agropyron repens* na Alemanha e determinado como *Pleospora trichostoma* por Diecke. Em 1928 foi isolado por Nishikado e denominado de *Helminthosporium tritici-repentis* (= *Drechslera tritici-repentis*) (Hosford, 1971).

O processo de infecção inicia com a germinação do conídio seguido pelo alongamento do tubo germinativo e formação do apressório. Durante esta colonização o micélio invade as células extraindo nutrientes determinando-lhes a morte pela ação parasitária e também pela produção de toxinas (Reis et al., 2011). A temperatura ideal para maturação de pseudotécios e ascósporos varia entre 15 e 18 °C (Wright e Sutton, 1990). Pesquisadores confirmam que o amadurecimento dos ascósporos ocorre gradualmente e a dispersão dos ascósporos continua ao longo do período da estação de crescimento. Os conídios se desenvolvem apenas em manchas senescentes (De Wolf et al., 1998). Durante o período de chuvas e alta umidade do ar, ocorrem vários ciclos de produção e liberação de conídios, o que leva ao rápido desenvolvimento da mancha amarela no mês seguinte (Ronis e Semaškiene, 2011). No hospedeiro suscetível à *P.tritici-repentis* (*Ptr*) ocorre o desenvolvimento de lesões necróticas de cor bronzeada, que muitas vezes são

circundadas por bordas cloróticas ou halos de intensidade variável que dão à doença o nome mancha amarela (Reis, 1994; Andrie et al., 2007; Lamari e Strelkov, 2010).

Os pesquisadores Kholi et al., (1982), Dubin, (1983) e Annone (1998), indicaram que essa doença é de grande importância na região do Cone Sul, onde causou perdas de produção de até 70% nos anos 80 no Paraguai e Argentina. Esta mancha reduz o rendimento total e peso do grão (Shabeer e Bockus, 1988), o número de grãos por cabeça (Schilder e Bergstrom, 1990), a biomassa total (Kremer e Hoffmann, 1992) e a qualidade do grão devido aos sintomas da mancha (Fernandez et al., 1994).

Na última década os danos têm sido crescentes, principalmente devido às oscilações climáticas, com o aumento da frequência das chuvas e elevação das temperaturas durante os cultivos de inverno e primavera. A doença é uma ameaça emergente à produção de trigo mundial, pois pode apresentar resistência aos fungicidas e a agressividade do fungo é um desafio aos programas de melhoramento genético visando cultivares resistentes (Bertagnolli, 2018; Maciel et al., 2020).

A resistência à mancha amarela em trigo foi relatada por Luz e Hosford (1980), Gilchrist et al., (1984) e Raymond et al., (1985), e foi considerada dependente da duração do período de molhamento foliar pós-inoculação (Hosford, 1982). Sherwood e Vance em 1980, sugeriram que existe um mecanismo molecular que influencia a resistência da planta ao patógeno, impedindo o seu desenvolvimento na planta resistente. Por outro lado, a resposta de suscetibilidade pode ser determinada pela produção de toxina por parte do fungo, que coloniza o hospedeiro a partir do mesófilo intercelular (Loughman e Deverall, 1986). *P. tritici-repentis* diferencia em virulência causando diferenças no tamanho da lesão e porcentagem da área foliar infectada (Misra e Singh 1972; Luz e Hosford, 1982; Kholi, 1982; Gilchrist et al., 1984).

Estudos de Lamari e Bernier em 1989 também contribuíram para avaliar a reação do trigo à mancha amarela, utilizando um sistema de classificação baseado exclusivamente no tipo de lesão. A resistência foi expressa através de lesões pequenas marrons escuras que não aumentam de tamanho, enquanto a susceptibilidade foi expressa por manchas marrons escuras cercadas por extensa

necrose e clorose que podem envolver toda a folha.

3.3 Formas de controle da mancha amarela

A atual estratégia de manejo da mancha amarela é com base no uso de sementes viáveis, rotação de culturas e preparo do solo para reduzir o inóculo do patógeno, e no uso de cultivares moderadamente resistentes combinadas com pulverização foliar de fungicidas (Bankina et al., 2014; Bockus e Claassen, 1992; Carmona et al., 2006). Porém Perelló e Dal Bello (2011) relataram que o nível de resistência à mancha amarela em cultivares comerciais de trigo é relativamente baixo, além disso alguns fungicidas tornaram-se menos eficazes no controle devido ao desenvolvimento de resistência em certas populações de *Ptr* (Jorgensen e Olsen, 2007).

Diversos relatos têm sido feitos sobre falhas no controle da mancha amarela, tornando-se a principal mancha foliar no Sul do Brasil, além disso muitas cultivares, com boas características agronômicas, não possuem níveis de resistência suficiente para evitar grandes prejuízos, que podem chegar a 40% de perda no rendimento (Moreno et al., 2012; Santana et al., 2017).

Os fungicidas utilizados atualmente para controle de manchas foliares no trigo compreendem o grupo químico dos triazóis e estrobirulinas. Estes fungicidas têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese de esteróis e a inibição da respiração mitocondrial bloqueando o transporte de elétrons no citocromo b e c1, respectivamente. Esses compostos são da classe dos fungicidas sistêmicos, ou seja, que podem ser absorvidos pela planta e serem transportados para outros tecidos onde eles serão tóxicos para o fungo. Embora estes compostos possam controlar as infecções, a aplicação frequente de fungicidas com modos de ação semelhantes aumenta o risco de surgimento de resistência a estes produtos e pode levar à perda de toda uma classe de fungicidas. Vários exemplos de resistência em patógenos têm sido atribuídos ao manejo inadequado de fungicidas. Para reduzir a resistência devido ao uso excessivo de produtos químicos, os fungicidas são classificados de acordo com sua classe química. Ao alternar entre diferentes classes de fungicidas, a população de fungos é menos propensa a desenvolver resistência a um determinado produto químico (Deising et al., 2002; Baibakova et al., 2019).

Outra problemática do uso destes agentes químicos é a contaminação do ambiente e aos organismos não-alvo. Estudos toxicológicos indicam que resíduos de fungicidas da classe das estrobirulinas no meio ambiente apresentam riscos ecológicos. Outro estudo indica que altas doses dos fungicidas triazólicos perturbam muito a estrutura das comunidades microbianas e geralmente levam à diminuição da população microbiana do solo e à diminuição das atividades das enzimas encontradas neste nicho (Zhang et al., 2020; Roman et al., 2021).

Diante da necessidade de buscar alternativas eficientes e ecológicas, pesquisadores buscam agentes de biocontrole para diversas doenças nas culturas agrícolas, porém para o controle da mancha amarela no trigo ainda não foi registrado nenhum produto biológico. A seleção de agentes de biocontrole não é uma tarefa simples devido à diversidade de agentes e interações com a planta hospedeira (Mota et al., 2017). Pfender et al. (1993), identificaram que o fungo *Limonomyces roseipellis* reduziu significativamente em 60-80% o inóculo primário da palhada no solo naturalmente infestadas com *Ptr*, mas eles relataram que maiores reduções seriam necessárias para o controle aceitável desta doença. Na Argentina onde o problema com a mancha amarela é recorrente e limitante para o cultivo de trigo, o uso de microrganismos antagônicos a *Ptr* tem sido investigado incluindo diferentes espécies de *Trichoderma* (Papavizas, 1985; Tronsmo, 1986; Perelló et al., 1997; Monte, 2001; Perelló et al., 2001a, 2001b, 2002, 2003, 2008). Perelló et al. (2011) verificaram a eficácia do uso combinado de agentes sintéticos acibenzolar-S-metil (ASM) e tiametoxam (TM) com *Trichoderma harzianum* (Th1) e concluíram que as plantas tratadas com Th1 e ambos os compostos sintéticos alcançaram um incremento de até seis vezes da massa seca da raiz em relação ao controle. Diante disto, em 2014, na Argentina foi lançado um produto biológico para tratamento de semente chamado Rizoderma® (*Trichoderma harzianum*). Esse produto tem capacidade para controlar aproximadamente 40% dos fitopatógenos do solo (Agrolink, 2014).

Ainda na Argentina, em termos de pesquisa, Larran et al. (2016) investigaram endófitos de cultivares de trigo quanto ao seu potencial como agentes de biocontrole contra *P. tritici-repentis*. Alterações na morfologia de *Ptr* foram demonstradas por *Fusarium* sp., *Chaetomium globosum*, *Trichoderma hamatum*, *Bacillus* sp., *Paecilomyces lilacinum* e *Penicillium* sp. Na Argélia - África

do Norte, o grupo de Zouaoui et al. (2018) verificou a ação antifúngica de diferentes extratos etanólico, metanólico, hexânico da semente selvagem de *Chenopodium quinoa*, incorporando esse extrato em meio BDA. Foi possível verificar uma taxa de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos de 68,42% a 91,17%. Porém não foi encontrado prosseguimento de tais estudos para níveis a campo.

3.4 Controle biológico de pragas e doenças

Populações de todos os seres vivos são, até certo ponto, reduzidos por ações naturais de seus predadores, parasitas, patógenos e antagonistas. Esses processos, que ocorrem entre todos os organismos vivos, tem sido referido como “controle natural”. Entretanto, quando organismos considerados pestes são controlados por inimigos naturais, é chamado de controle biológico ou biocontrole (Ann e Eilenberg, 2018). O controle biológico é definido pela International Biocontrol Manufactures Association (IBMA), como o uso de agentes ou produtos que naturalmente afetam as pestes e patógenos das culturas limitando sua propagação. Estes agentes ou produtos incluem macroorganismos, microrganismos, mediadores químicos, e substâncias naturais (Lacomte et al., 2016).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) reconhece três categorias de biopesticidas: (1) biopesticidas bioquímicos (por exemplo, compostos naturais usados para manejo de pragas); (2) protetores incorporados em plantas (PIPs), que são o resultado de transgenia que conferem a síntese de compostos naturais de manejo de pragas em culturas (por exemplo, toxina *Bt* transgênica); (3) organismos de biocontrole (por exemplo, fungos). E as qualidades desejáveis para biopesticidas bioquímicos incluem especificidade do alvo, baixa persistência ambiental e baixa toxicidade ao organismo não-alvo. Estes produtos podem variar de pequenas moléculas a estruturas maiores e são produzidas por biossíntese microbiana ou vegetal (Seiber et al., 2014).

O número de cepas e produtos microbianos tem aumentado, principalmente pelas exigências de proteção sustentável das lavouras. Com redução do uso de pesticidas, as empresas agroquímicas estão mostrando maior interesse por alternativas biológicas para novas oportunidades de negócio (Preiningger et al.,

2018). Produtos biológicos que visam a promoção de crescimento vegetal são na maioria das vezes comercializados em forma de inoculantes, que consistem em produtos com a utilização de microrganismos vivos capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, por diferentes mecanismos. Produtos que contém bactérias capazes de controlar patógenos são conhecidos como biopesticidas e inseticidas biológicos (Vassey, 2003).

Normalmente estes produtos microbianos são aplicados como tratamento de sementes, imersão das raízes, aplicação no solo ou spray foliar. Em especial no uso de spray foliar, as plantas podem ser tratadas durante toda a estação, em certos estágios de crescimento, para promover o crescimento e melhorar o vigor das plantas, além de que podem ser aplicados com mais frequência, dependendo da pressão da doença e da eficácia da pulverização (Preininger et al., 2018).

Os produtos microbianos têm vários benefícios sobre os pesticidas químicos, por exemplo: (a) são mais seguros, (b) causam danos ambientais reduzidos, (c) mostram atividade mais direcionada, (d) são eficazes em quantidades menores, (e) são capazes de se multiplicar, mas também são controlados pelas plantas e pelos microrganismos autóctones; (f) têm decomposição mais rápidos; (g) têm menos probabilidade de induzir resistência por patógenos e pragas; e finalmente (h) podem ser usados tanto na agricultura orgânica quanto na convencional (Berg, 2009).

A adoção de produtos biológicos e boas práticas agronômicas vem sendo cada vez mais empregadas nas lavouras do Brasil e no mundo. Uma pesquisa da Associação Brasileira de Controle Biológico (ABCbio) em 2018, em conjunto a Agribusiness Consulting relatou que, à medida que os agricultores adquirem um maior conhecimento técnico quanto ao uso de produtos biológicos ocorre uma maior conscientização quanto à importância das práticas de Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIP e MID), que preveem o uso de produtos biológicos em conjunto a defensivos agrícolas convencionais. Esta mesma pesquisa indicou que o mercado mundial de biodefensivos agrícolas apresenta crescimento anual, sendo a Europa a que representa a maior comercialização (30%) destes produtos e a América Latina possui 13% do mercado.

Em 2020, o MAPA anunciou que o mercado de biodefensivos cresceu mais de 70% no Brasil em um ano, e que segue tendência mundial de redução do uso

de agroquímicos para combater pragas e doenças nas lavouras. O Brasil, México, Chile e Argentina são os mercados de maior crescimento na região e emergiram como grandes mercados-alvo para os fornecedores desses produtos. Dentre os produtos biológicos registrados e disponíveis no Brasil, 53% são de bioinseticidas, 4% de reguladores de crescimento, 11,7% são de biofungicidas, 12% de armadilhas biológicas, 6,9% de bioacaricidas e 12,2% de bionematicidas (CropLife Brasil, 2021).

3.5 Mecanismos de biocontrole e promoção de crescimento

Vários mecanismos para atividade de biocontrole e promoção de crescimento em plantas são estudados com a utilização de microrganismos endofíticos e/ou rizosféricos. Os endofíticos fornecem vantagens às plantas hospedeiras, por exemplo, aumentando a atividade fisiológica da planta ou facilitando a absorção de nutrientes (Shimizu et al., 2011). Este mecanismo faz parte da promoção direta do crescimento das plantas que ocorre pela produção de reguladores de crescimento de plantas (Patten e Glick, 2002), como a disponibilidade de ferro pela produção de sideróforos (Carrillo-Castañeda et al., 2002), a fixação de nitrogênio (Madhaiyan et al., 2009), produção de fito hormônios (Patten e Glick, 2002) e solubilização de fosfatos (Hamdali et al., 2008). Já a promoção indireta do crescimento das plantas ocorre quando a bactéria diminui ou evita os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos (Glick, 1995).

O processo de interação entre uma planta e um microrganismo qualquer resulta na expressão de suscetibilidade ou de resistência, e reúne uma série coordenada de alterações bioquímicas a nível celular e molecular. Estas alterações não são permanentes e não podem ser transmitidas geneticamente a progênie, a menos que as modificações induzidas sejam a nível do genoma da planta. Sendo assim, a planta suscetível pode adquirir o comportamento de uma planta resistente frente ao patógeno, por um determinado período, através do emprego de microrganismo e/ou metabólitos, processo este denominado de resistência induzida (Bach, 1997).

Várias espécies de rizobactérias induzem sistematicamente as vias de defesa do hospedeiro, em partes distais das plantas, por meio da resistência

sistêmica induzida (RSI) (Lugtenberg e Kamilova, 2009; Van Wees et al., 2008; Pieterse et al., 2014). A RSI resulta em uma resposta elevada e mais eficiente a futuros ataques patogênicos e induz várias alterações, incluindo o acúmulo de compostos relacionados à defesa, morte celular localizada e reforços da parede celular (Pieterse et al., 2014).

A maioria das rizobactérias, como espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus*, medeia a RSI por meio da ativação das vias de sinalização de defesa do fito hormônio, incluindo uma ou ambas as vias do ácido jasmônico/etileno ou a sinalização dependente da via do ácido salicílico, mas eles não induzem a transcrição de PR-proteínas envolvidas na RSA (Resistência Sistêmica Adquirida) (Tarkka et al., 2008; Pieterse et al., 2014).

Em contraste, a indução de defesa de plantas por espécies de *Streptomyces* difere da RSI tradicional, pois envolve características de RSI e RSA, bem como a comunicação entre muitas vias diferentes de sinalização de fito hormônios (Kurth et al., 2014; Lehr et al., 2008; Conn et al., 2008; Tarkka et al., 2008). Desta forma, a ativação do sistema de defesa pelo estreptomiceto resulta com sucesso na supressão do fungo e também aliviam os custos de condicionamento associados à infecção, impedindo uma redução no nível de transcritos relacionados à fotossíntese (Kurth et al., 2014).

O mecanismo exato pelo qual as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas promovem o crescimento das plantas em diferentes culturas e sob diferentes condições ambientais não é totalmente compreendido. Algumas ou todas as características que promovem o crescimento das plantas não funcionam independentemente uma das outras, mas de maneira aditiva (Ahemad e Kibret, 2014). Como foi relatado nos estudos de Abdel-Fattah e Mohamedin (2000), onde actinobactérias estimularam a intensidade de formação de micorrizas em algumas plantas e que resultou no aumento do crescimento vegetal. Tokala et al. (2002) verificaram que uma estirpe de *Streptomyces lydicus* influenciava na nodulação em plantas de ervilha provavelmente aumentando o nível de infecção por *Rhizobium* spp.

Bactérias rizosféricas dos gêneros *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia* são comumente relatadas como sendo promotoras do crescimento de

plantas (Okon e Labandera-González, 1994; Glick et al., 1999). Porém, *Streptomyces* também pertencem às comunidades microbianas rizosféricas, mas apenas recentemente sua capacidade de agir como promotores de crescimento de plantas tem sido enfatizada (Dias et al., 2017).

Além disso, a natureza filamentosa e esporulante de *Streptomyces* permite que eles sobrevivam durante condições ambientais desfavoráveis. Sendo assim, eles parecem competir de forma mais eficiente contra muitos outros microrganismos presentes na rizosfera. Também produzem várias enzimas líticas durante seus processos metabólicos que são capazes de degradar polímeros insolúveis, como a quitina e a celulose (Bertram et al., 2004; Seipke et al., 2012).

3.6 *Streptomyces* e os compostos bioativos

A família Streptomycetaceae compõem-se de bactérias aeróbias, Gram-positivas, que rapidamente formam um micélio extensivamente ramificado. O micélio aéreo forma cadeias de três a muitos esporos. Os organismos produzem uma ampla variedade de pigmentos responsáveis pela cor do substrato e do micélio aéreo. Crescem numa faixa de pH de 5 a 11,5, são quimiorganotróficos com um metabolismo oxidativo (Kämpfer, 2006). Algumas espécies de *Streptomyces* são resistentes à seca e formam o artrósporo, e requerem menos umidade que outras bactérias. Alguns relatos descrevem que solos drenados apresentam mais *Streptomyces* do que solos argilosos (Gowdar et al., 2018). Devido a essas características esse gênero de bactérias tem sido extensivamente estudado para controle de doenças na agricultura (Rothrock e Gottlieb, 1984; Law et al., 2017; Khendkar e Deshpande, 2018; Yang et al., 2019).

Dos três gêneros de actinobactéria produtores de micélio (*Streptomyces*, *Thermobifida* e *Frankia*), *Streptomyces* recebeu atenção especial pois são abundantes e importantes no solo, onde eles desempenham ação na ciclagem do carbono preso em resíduos orgânicos insolúveis, particularmente de plantas e fungos, esta atuação é possibilitada pela produção de diversas enzimas hidrolíticas (Miyadoh, 1997). Além de produzirem uma diversidade de metabólitos secundários bioativos, que são de interesse na medicina e na indústria (Hopwood, 2007).

A maioria dos compostos bioativos microbianos descobertos se originou de

actinobactérias, responsáveis por cerca de dois terços dos antibióticos, incluindo aqueles em uso clínico (Baltz 2007; Raja e Prabakarana, 2011). Entre os 140 gêneros de actinobactérias descritos, apenas alguns são responsáveis por mais de 10.000 compostos bioativos em uso clínico. A espécie *Streptomyces* produz 7.600 compostos (74% de todos os actinomycetales), enquanto as actinobactérias raras representam 26%, no total, 2500 compostos (Adegboye e Babalola, 2013). O primeiro e mais importante produto de *Streptomyces* são os antibióticos e desde 1955, este gênero tem sido o principal fornecedor de novos antibióticos (Watve et al., 2001; Dastager et al., 2009; Donald et al., 2022). São a fonte de substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, antivirais, inseticidas, pesticidas e herbicidas, além de substâncias farmacológicas como imunomoduladores (imunossupressores e agentes imunoestimuladores), substâncias vasoativas e agentes neurológicos (Hopwood, 1999; Petrosyan, 2003; Kurtboke, 2012). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais importantes de *Streptomyces*, como proteases, lipases, celulasas, amilases, pectinases e xilanases (Nascimento et al., 2002; Vonothini et al., 2008; Syed et al., 2009).

A capacidade dos *Streptomyces* em suprimir outros microrganismos foi observada pela primeira vez por Greig-Smith em 1917 (apud Jauri et al., 2016). Desde então, sua capacidade de produzir antibióticos chamou a atenção de vários cientistas, incluindo químicos de produtos naturais, pesquisadores farmacêuticos, fitopatologistas e bioquímicos. A produção de antibióticos juntamente com a produção de outros metabólitos secundários, toxinas, biosurfactantes, compostos voláteis, agregam à capacidade de competição a qual é uma estratégia importante em interações interespecíficas, podendo suprimir oponentes microbianos. Esta característica sugere o seu uso no combate de patógenos vegetais de suas plantas hospedeiras (Hibbing et al., 2010).

Investigações mostram que actinobactérias endofíticas produzem no tecido da planta pelo menos três tipos de substâncias antagônicas: antibióticos, enzimas e sideróforos (Trejo-Estrada et al., 1998). Por isso diferentes trabalhos indicam que há uma grande vantagem na utilização de espécies de *Streptomyces* no biocontrole de fitopatógenos em diversas culturas (Sahli e Abdulkhair, 2012; Shen et al., 2016; Sangdee et al., 2016; Toumatia et al., 2016; Monteiro et al., 2017;

Wang et al., 2018; Newitt et al., 2019). Além disso, existem estudos que utilizaram várias cepas de *Streptomyces* inoculadas em planta modelo *Arabidopsis* mostrando aumento na biomassa vegetal (Palaniyandi et al., 2014; Cordovez et al., 2015). Em culturas como arroz, trigo, sorgo e tomate também foram relatados aumento na biomassa, indicando a capacidade destas actinobactérias em promover o crescimento destas plantas (Gopalakrishnan et al., 2013, 2014; Jog et al., 2014).

Com essa diversidade da produção de metabólitos secundários entre *Streptomyces* possibilitou a formulação de produtos para biocontrole como Mycostop (Verdera, Finlândia) e Actinovate (Natural Industries, Incorporated, Estados Unidos), com base em *S. griseoviridis* K61 e *S. lidicus* WYEC 108, respectivamente. Estes produtos citados são restritos a tratamentos do solo, mas pesquisadores vem discutindo que os compostos bioativos produzidos por esse gênero podem conferir proteção às partes aéreas das plantas com aplicação por pulverização. Como por exemplo, três metabólitos purificados sintetizados por *Streptomyces* spp. - sendo eles a polioxina D, estreptomicina e casugamicina - já são atualmente distribuídos como fungicidas foliares e bactericidas (Rey e Dumas, 2017).

3.7 Metabólitos secundários

Os metabólitos primários estão envolvidos na produção de biomassa e geração de energia e estão presentes em todas as células vivas, já os metabólitos secundários são produzidos por poucas espécies. Eles são produzidos por um metabolismo exclusivo e sua produção não apresenta previsibilidade para ocorrer (Williams et al., 1989). Metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular que podem ser classificados, de acordo com a forma como são biossintetizados na natureza, em alcalóides, fenilpropanóides, terpenóides e esteróides, policetídeos, ácidos graxos, aminoácidos, peptídeos especializados e hidratos de carbono especializados (Hanson, 2003). Eles podem atuar como moléculas sinalizadoras (hormônios), iniciar a simbiose com microrganismos benéficos, proteger as plantas do estresse abiótico e contribuir para aumentar os mecanismos de defesa das plantas contra doenças e predadores (Noman et al., 2020; Poveda et al., 2020).

A produção de muitos metabólitos secundários, incluindo antibióticos, está acoplada com a diferenciação morfológica onde é observado uma maior produção destes metabólitos durante a transição do crescimento vegetativo para o crescimento aéreo (Roessner e Scott, 1996). Microrganismos produtores de metabólitos secundários sintetizam essas moléculas bioativas e complexas na fase log e estacionária de crescimento. Entretanto, em actinobactérias, especialmente em *Streptomyces* estes metabólitos podem ser produzidos nas fases exponencial, estacionária e de morte (Donadio et al., 2002).

Actinobactérias sintetizam dois terços dos antibióticos microbianos, e destes, aproximadamente 80% são de isolados do gênero *Streptomyces*. Esta capacidade de *Streptomyces* em produzir compostos comerciais significativos, especialmente os antibióticos, é possivelmente devido ao DNA extragrande dessas bactérias (Ikeda et al., 2003; Kurtboke, 2012). Estes metabólitos, dependendo do ambiente, podem fornecer defesa (ou ataque), competição, sinalização ou interações entre espécies, aumentando assim a probabilidade de sobrevivência em um ambiente inóspito (Brachmann et al., 2013; Martinez et al., 2017)

3.8 Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa de alta resolução

Cromatografia a líquido é um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra baseado na polaridade de cada composto e sua afinidade com a fase estacionária, que consiste em uma fase fixa sólida ou líquida polar ou apolar ligada a partículas empacotadas em uma coluna, em uma fase móvel, que é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica (Snyder e Kirkland, 1979). Esses componentes são retidos pelas partículas sorventes da fase estacionária e movem-se lentamente com o fluxo da fase móvel. A diferença no tempo de retenção separa as amostras em seus componentes individuais, que podem então, ser analisados qualitativa e, quando possível, quantitativamente (Leite, 2002).

A técnica LC mais utilizada para a análise de amostras ambientais é a de fase reversa, a qual incorpora uma fase móvel polar e coluna cromatográfica com sorvente apolar, baseada em fases estacionárias de sílica com superfície

modificada com cadeias longas de alcanos, como a coluna com fase estacionária C18. A essas fases móveis são, comumente, incorporados aditivos a fim de melhorar o desempenho cromatográfico. Geralmente usa-se o ácido fórmico, quando as análises são realizadas no modo de ionização positivo, pois possui a acidez e a volatilidade necessária para que seja fornecido um excesso de prótons requerido nesse modo de análise. Já quando as análises não realizadas no modo de ionização negativo, são, comumente, utilizados sais voláteis como o acetato de amônio e o formiato de amônio (Bade, 2016).

Existem diferentes analisadores de massa, que são, basicamente sistemas capazes de separar e calcular a relação m/z (massa/carga) dos íons formados a partir analitos presentes na amostra. O analisador do tipo triplo-quadrupolo (QqQ) é uma abordagem comumente utilizada para análises de fármacos em amostras ambientais, porém, tem a capacidade limitada na identificação de compostos desconhecidos pois apresenta resolução de massa unitária. Dessa forma, a espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, *HRMS*) tem desempenho único e configura importante papel na identificação de compostos desconhecidos, pois permite o registro de cromatogramas no modo de varredura completa (*full-scan*) com alta exatidão em massa, tornando possível a procura seletiva baseada na massa exata. Compreende-se nessa classe, o analisador do tipo híbrido: quadrupolo – tempo de voo (*QTOF*) (Noguera-Oviedo e Aga, 2016).

UHPLC-QTOF MS (UHPLC-*HRMS*, do inglês *Ultra High Pressure Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry*), é uma técnica robusta, com alta especificidade e sensibilidade, é um equipamento de cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas com analisador de tempo de voo. Este equipamento permite realizar a identificação de compostos desconhecidos com alta resolução e precisão de massas. É indicado para elucidação estrutural de diferentes compostos orgânicos. Os sistemas de cromatografia a líquido que utilizam altas pressões propiciam separações com alta resolução, através da utilização de colunas empacotadas com partículas, normalmente, abaixo de 3 μm . Na espectrometria de massa de alta resolução, os analisadores de massa híbridos, como o sistema quadrupolo/tempo de voo (*QTOF MS*, do inglês *Quadrupole-Time of Flight*), permitem a aquisição de dados sob diferentes condições, obtendo informações úteis para fins de identificação,

elucidação e quantificação, além de permitir a identificação de compostos mesmo quando o padrão de referência não estiver disponível. Além disso, a pesquisa por novos compostos pode ser realizada a qualquer momento sem a necessidade de uma análise adicional (análise retrospectiva) (Boix et al., 2013; Hernández et al., 2011; Hernández et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Culturas microbianas

Os isolados de *Streptomyces* sp. 6(4) e R18(6), foram coletadas de raízes de plantas de tomate saudável, isolados por Oliveira et al. (2010), identificados por características morfológicas, caracterização por dureza da colônia (colônias duras), odor (cheiro de terra/geosmina), produção de esporos e coloração de Gram (Gram positiva) (Sinha et al., 2014). Os isolados também tiveram seu 16SrRNA gene sequenciado e confirmado ser do gênero *Streptomyces* (Oliveira et al., 2010; Borba et al., 2022). Estas amostras foram multiplicadas em meio ágar amido caseína - ACA (10 g amido; 0,3 g caseína; 2 g KNO₃; 2 g NaCl; 2 g K₂HPO₄; 0,05 g MgSO₄.7H₂O; 0,02 g CaCO₃; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; 15 g ágar e água destilada 1000 ml) e plugs do meio sólido com o crescimento bacteriano foram estocados em suspensão de glicerol 20% no freezer a -20°C. Estes isolados fazem parte da coleção de actinobactéria do Laboratório de Microbiologia Aplicada - ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os isolados de *P. tritici-repentis* (45, 27, 5-C1/08 e 11-C1/08) foram enviadas pela EMBRAPA Trigo - Passo Fundo, RS, os quais foram isolados de plantas de trigo com sintomas da mancha amarela. A sequência ITS foi amplificada com o par de primers ITS1 (5`-TCCGTA GGT GAA CCT GCG G-3`) e ITS4 (5`-TCC TCC GCT TAT TGATAT GC-3`), os produtos de PCR foram sequenciados e a análise BLAST confirmou a identidade destes isolados como *Pyrenophora tritici-repentis* (White et al., 1990). As amostras foram multiplicadas em meio V8-BDA (150 ml de suco V8 Campbell's, 10 g ágar, 10 g BDA (KASVI), 3 g CaCO₃, 850 ml de água destilada) e estocada em forma de discos de meio desidratado em tubos no freezer a -20°C. Estes isolados podem permanecer nestas condições por um ano.

4.2 Produção do inóculo fúngico

Os isolados de *Pyrenophora tritici-repentis* foram multiplicados em meio V8-BDA. Para a produção de conídios, as placas inoculadas foram acondicionadas em germinador J. Prolab JP-100 a 25°C no escuro por cinco dias. No quinto dia, as colônias foram cobertas com água destilada estéril e pressionadas suavemente com o fundo de um tubo de ensaio esterilizado (estresse do micélio). Removeu-

se o excesso de água e as placas foram novamente incubadas no germinador com luz contínua na mesma temperatura por mais 24 h. No sexto dia as placas foram incubadas a 13°C e escuro contínuo por mais 24 h. No sétimo dia foram retirados os conídios, com ajuda de um pincel e água destilada estéril com uma gota de Tween 20, essa suspensão foi peneirada para conter o excesso de micélio. Realizou-se a contagem de conídios e as concentrações foram ajustadas para 3.000 conídios/ml.

4.3 Produção de compostos antifúngicos em cultura submersa

Os *Streptomyces* spp. foram inoculados em 50 ml de caldo amido caseína e incubados a 28°C durante - 96 h para o isolado 6(4) e 144 h para o isolado R18(6) sob condições de agitação e aeração (115 rpm) após esse período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para um novo tubo, e este foi considerado o extrato bruto ou sobrenadante livre de células. Também foi realizada uma etapa de extração líquido-líquido com solvente acetato de etila. Foram realizadas três lavagens consecutivas do extrato bruto com o solvente numa proporção de 1:1 (v:v). A fase orgânica foi concentrada em um evaporador rotativo a uma temperatura de 40°C. Este foi ressuspensionado em 2 ml de tampão PBS (0,1 M e pH 7,0) e considerado o extrato concentrado.

4.4 Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica dos isolados de *Streptomyces* spp.

Em placas de ágar batata dextrose (140 g/L de batata branca com casca, 10 g/L dextrose, 15 g/L ágar mais 0,12 g/L de sulfato de estreptomicina) foram inoculados à distância de 1 cm da borda superior da placa cada um dos antagonistas separadamente, na borda inferior da mesma placa foi inoculado um disco de micélio previamente cultivado, de cada isolado fúngico (*Ptr* 5-C1/08; 27 e 45). As placas foram incubadas em estufa a 25°C por sete dias. Para cada isolado foram realizadas três repetições e o controle consistiu em placas inoculadas somente com o isolado fúngico. Ao final do experimento foi verificado a porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo, com a fórmula:

Inibição (%) = $[(R-r) / R \times 100]$, onde R representa o crescimento radial do fungo sem a presença do antagonista e r é o crescimento radial do fungo em

presença do antagonista.

A atividade antifúngica também foi avaliada utilizando o sobrenadante da cultura (aqui denominado de extrato bruto) de *Streptomyces* spp. frente a *P. tritici-repentis* com o método de difusão em poço de ágar. Para tanto, em placas de BDA foi espalhado, com alça de Drigalski, 100 µl de suspensão de esporos de cada isolado fúngico preparado previamente na concentração de 3×10^3 conídios/ml. Com o auxílio de um cortador cilíndrico de metal com 6 mm de diâmetro foram realizados poços no ágar (em cada placa foram feitos três poços). Nos poços foram colocados 100 µl dos extratos produzidos por cada um dos isolados de *Streptomyces* spp. e do consórcio. As placas foram mantidas em geladeira durante a noite. No dia seguinte foram transferidas para estufa de 25°C, fotoperíodo de 12 h por sete dias. Ao final do experimento verificou-se a formação de um halo ao redor dos poços e mensurado o seu tamanho em centímetros, indicando a inibição do crescimento micelial de *P. tritici-repentis*. Os dados dos experimentos foram avaliados utilizando ANOVA e as médias dos tamanhos dos halos foram comparadas por teste de Tukey ($P < 0,05$), programa SASM – Agri (Canteri et al., 2001).

4.5 Efeito do extrato bruto e concentrado dos isolados de *Streptomyces* spp. na germinação dos conídios de *Ptr*

O efeito do extrato bruto e concentrado na germinação dos conídios de *P. tritici-repentis* também foi verificado de forma microscópica, para observarmos com mais detalhes possíveis alterações morfológicas das hifas e conídios. Colocou-se em um micro tubo 100 µl de suspensão de conídios fúngicos preparados anteriormente em V8-BDA (3.000 conídios/ml) e misturados com 100 µl de extrato bruto ou concentrado. Desta mistura, 50 µl foram pipetados em um pedaço pequeno de BDA acondicionado em uma lâmina de vidro e em cima deste meio foi colocado uma lamínula. As placas com a cultura foram incubadas num germinador com fotoperíodo de 12 h durante sete dias. Após a incubação, as lâminas foram coradas com azul algodão e observadas sob microscópio óptico (modelo BX41 Olympus) e as imagens capturadas e analisadas pelo Software MShot Digital Imaging System.

4.6 Produção de ácido indolacético e sideróforos, solubilização de fosfato e redução de nitrato pelos isolados de *Streptomyces* spp.

O ensaio de solubilização de fosfato foi realizado seguindo o protocolo proposto por Nautiyal (1999). Placas contendo meio NBRIP foram inoculadas com os isolados de actinobactéria e incubadas a 28°C por 14 dias. O ensaio foi realizado em triplicata e a avaliação positiva foi determinada pela presença de halos sob o crescimento da colônia.

O ensaio de sideróforo foi realizado pelo método proposto Schwyn e Neilands (1987) modificado por Silva-Stenico et al. (2005). As cepas de *Streptomyces* spp. foram inoculadas em meio King B adaptado por Glickmann e Dessaux (1995) (1 g de peptona, 0,0575 g de K₂HPO₄, 0,075 g de MgSO₄, 0,75 g de glicerol e 250 ml de água destilada [pH 6,8]). Alíquotas de um ml foram coletadas a cada 48 h e colocados em tubos de microcentrifuga e centrifugados a 13.000 rpm por 5 min. Na sequência 500 µl do sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 500 µl de cromoazurol-S (CAS) o corante foi preparado com CAS, (60,5 mg de CAS em 50 ml de água MiliQ e adicionado 10 ml de solução FeCl₃; a solução foi então agitada, e uma solução de 72,9 mg de brometo de hexadeciltrimetilamônio [CTAB] previamente dissolvido em 40 ml de água foi lentamente adicionada, após a solução foi autoclavada durante 15 min.). A reação positiva foi indicada pela mudança de cor de azul para laranja ou amarelo durante um período de 15-30 min no escuro.

A avaliação da produção de ácido indolacético foi realizada pelo método proposto por Gordon e Weber (1951). Os isolados foram previamente cultivados em meio King B para auxinas (20 g/L peptona, 1,15 g/L K₂HPO₄, 1,5 g/L MgSO₄, 15 g/L Glicerol, 0,5 g/L de triptofano) e incubados a 28 °C sob agitação a 115 rpm. A cada 48 h durante 10 dias, 2 ml da cultura foram transferidos para um tubo e centrifugados a 13.000 rpm durante 5 min. A produção de auxina foi determinada transferindo 50 µl do sobrenadante para uma placa de 96 poços contendo 50 µl de reagente Salkowski (2,4 g de FeCl₃ e 84,2 ml de H₂SO₄, volume final de 100 ml). As placas de 96 poços foram armazenadas no escuro à temperatura ambiente durante 30 min, e a intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro com $\lambda = 520$ nm.

A capacidade de redução de nitrato foi avaliada inoculando tubos de vidro

contendo 5 ml de meio Bacto-Nitrato (3g/L extrato de carne, 5 g/L de peptona, 1g/L KNO_3 , pH 6,5) com inóculo de cada isolado. Três réplicas foram preparadas. Após um período de incubação (28°C por 7 dias), 200 μl de reagente nitrato A (α -naftilamina) e reagente B (ácido sulfanílico) foram adicionados em cada tubo. A presença de nitrito foi confirmada pelo desenvolvimento de uma cor vermelha após a formação de um sal diazônio causado pela reação entre os reagentes A e B.

4.7 Ensaio da folha destacada

Produção de plântulas: dez sementes de trigo da cultivar Ônix (OR sementes) foram plantadas em copos de plástico de 7 cm de diâmetro e mantidas em cabine de germinação com fotoperíodo de 12 h a 20°C até que a segunda folha fosse totalmente expandida. Algumas plântulas foram inoculadas com 5 ml dos propágulos de esporos (1×10^8 esporos/ml) de cada cepa – *Streptomyces* sp. 6(4), *Streptomyces* sp. R18(6) e consórcio dos dois isolados no momento da semeadura, e outras não foram inoculadas, conforme os tratamentos descritos na seção “Inoculação”.

Preparação das placas: as placas foram montadas de acordo com o protocolo de Perochon e Doohan (2016) com modificações: a primeira e a segunda folha foram cortadas em segmentos de 8 cm de comprimento e três segmentos foram colocados em cada placa de Petri de 15 cm de diâmetro contendo - 50 ml de ágar-água (10 g L^{-1}) e 100 mg L^{-1} benzimidazol (Sigma-Aldrich) utilizado para retardar a senescência (Arraiano et al., 2001).

Inoculação: 100 μl de cada extrato (bruto ou concentrado) produzidos pelos isolados de *Streptomyces* e o consórcio foi misturado em tubos com 100 μl da suspensão conidial de *Ptr* (isolado 45). Desta mistura, 10 μl foi inoculado no centro de cada segmento das folhas nas placas de acordo com cada tratamento: (1) folhas destacadas de plântulas de sementes inoculadas com propágulos de cada cepa + extrato bruto e *Ptr*; (2) folhas destacadas de plântulas de sementes inoculadas com propágulos de cada cepa + extrato concentrado e *Ptr*; (3) folhas destacadas de plântulas de sementes inoculadas com propágulos de cada cepa + *Ptr* sem extratos; (4) folhas destacadas de plântulas sem inoculação + extrato bruto e *Ptr*; (5) folhas destacadas de plântulas sem inoculação + extrato

concentrado e *Ptr*; e (6) Controle: *Ptr* nas folhas destacadas de plântulas saudáveis. O índice de doença foi mensurado dividindo em cinco classificações usando um escore de 0 a 5: 0 = sem sintomas, 1 = menos de 5% da folha com lesão, 2 = 6–15% da folha com lesão, 3 = 16-25% da folha com lesão, 4 = 25-50% da folha com lesão e 5 = >50% da folha com lesão. O índice de doença e a eficácia de controle foi calculado usando as seguintes equações: Índice de Doença = $100 \times (a \times 0) + (b \times 1) + (c \times 2) + (d \times 3) + (e \times 4) + (f \times 5) / 5 \times n$, onde a, b, c, d, e, f correspondem ao número de folhas com os escores 0, 1, 2, 3, 4 e 5, e n é o total de folhas examinadas. Eficácia de controle (%) = $100 \times (C-T) / C$, onde C é o índice de doença das folhas de trigo somente com *Ptr* e, T é o índice de doença das folhas de trigo depois do patógeno e o tratamento. O desenho experimental foi organizado em blocos completamente casualizados com três replicatas e três folhas em cada placa. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados de cada tratamento foram analisados por análise de variância (ANOVA) com P-valor de 0,05 no programa SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

4.8 Ensaio em casa de vegetação

O experimento foi realizado em uma casa de vegetação localizada nas dependências do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de maio a junho de 2021. O ensaio foi organizado em copos plásticos (500 ml) com substrato comercial Humusolo® mais vermiculita expandida na proporção de 1:1. Em cada copo, dez sementes de *Triticum aestivum* cv Ônix, suscetível a manchas foliares e ferrugem (OR Sementes) foram semeadas seguindo a descrição de cada tratamento:

- 1) Sementes inoculadas na semeadura com 5 ml de propágulos de esporos de cada isolado de *Streptomyces*;
- 2) Sementes inoculadas na semeadura com 5 ml de propágulos de esporos de *Streptomyces* + spray foliar do sobrenadante livre de células de cada *Streptomyces* nas folhas antes do patógeno.

Controle não tratado – *Ptr* pulverizado na parte aérea.

Controle negativo – sementes sem tratamento, apenas água.

Todas as plantas exceto o controle negativo, com 14 dias após o plantio,

com duas folhas totalmente expandidas, foram pulverizadas com a suspensão de *Ptr* (concentração mínima de 3.000 conídios/ml) usando um pulverizador manual. O sobrenadante livre de células dos antagonistas foi aplicado nas folhas em torno de 2 horas antes da aplicação do patógeno, para que as plantas estivessem um pouco mais secas. Depois da inoculação, os vasos foram cobertos com sacos plásticos para manter alto nível de umidade durante 48 h. Depois disso, a cada dois dias as plantas eram regadas com água se necessário.

Para a avaliação, após sete dias da inoculação com início dos sintomas, a segunda folha de uma planta, escolhida aleatoriamente, de cada vaso foi selecionada para o acompanhamento da evolução da mancha. Esse acompanhamento foi realizado por fotografia a cada dois dias até completar sete dias. No total foram avaliadas sete folhas por tratamento. A porcentagem da área necrótica e clorótica foi estimada com software ImageJ. No final do experimento, as plântulas foram retiradas e secas em estufa a 50°C para aferirmos o peso seco das plantas. O desenho experimental foi inteiramente casualizado com sete replicatas por tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas por teste Scott-Knott com $P < 0,05$ em software SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

4.9 Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa de alta resolução

A presença de compostos com atividade antifúngica no sobrenadante livre de células previamente liofilizado foi monitorada utilizando um sistema Shimadzu Nexera X2 UHPLC acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução Impact II QTOF (BrukerDaltonics). O sistema UHPLC foi equipado com uma coluna analítica de fase reversa mantida a 40°C. A fase móvel era uma mistura de acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,1% (eluente A) e água acidificada com ácido fórmico a 0,1% (eluente B), a uma vazão de 0,35 ml.min⁻¹. O gradiente de eluição foi de 5% A (condição inicial) a 98% A, em 35 min, com manutenção por 5 min, voltando a condição inicial em 4 min e sendo mantida por mais 6 min, totalizando um tempo de análise de 50 min. O espectrômetro de massa QTOF foi operado no modo de ionização positiva, nas seguintes condições: capilar a 4000 V, nebulizador a 40 Bar, gás de secagem a 9 L.min⁻¹ e temperatura do gás de

200°C. O sistema QTOFMS foi operado no modo de aquisição de dissociação induzida por colisão de banda larga (bbCID), que forneceu espectros MS e MS/MS ao mesmo tempo. Todas as informações do MS foram registradas na faixa m/z de 50 a 1500, utilizando uma taxa de varredura de 2 Hz. O modo bbCID permite a operação com duas energias de colisão diferentes: uma energia de colisão baixa de 10 eV e uma energia de colisão alta de 20 eV (para obter espectros MS/MS). Todos os dados suspeitos e possíveis composições elementares para íons com um desvio de ± 5 ppm, foram avaliados usando software DataAnalysis 4.2.

4.10 Concentração inibitória mínima

O sobrenadante livre de células, filtrado em filtro estéril de 0,22 μm (KASVI) e posteriormente liofilizado, foi pesado e em seguida ressuspendido em 3 ml a amostra do 6(4) e em 2 ml a amostra do R18(6) com água ultrapura autoclavada. Sendo assim a concentração inicial foi calculada, e na placa o gradiente de concentração seguiu a seguinte ordem para o 6(4): 114 mg/ml, 57 mg/ml, 28,5 mg/ml, 14,25 mg/ml, 7,125 mg/ml, 3,56 mg/ml. Para o R18(6) o gradiente de concentração foi: 151,75 mg/ml, 75,87 mg/ml, 37,93 mg/ml, 18,96 mg/ml, 9,48 mg/ml, 4,74 mg/ml. O inóculo fúngico foi previamente preparado conforme o protocolo relatado no ítem 4.2 e a concentração final de conídios foi de 8×10^3 conídios/ml. O procedimento do CIM foi realizado de acordo com o protocolo M38-A (CLSI, 2002), com 100 μl do inóculo fúngico mais 100 μl do caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com as diluições do sobrenadante. RPMI puro foi o controle negativo, e o inóculo fúngico sem o sobrenadante dos antagonistas foi o controle positivo. A temperatura de incubação foi de 25°C para o crescimento adequado do fungo. Após 96 h de incubação foi realizado a leitura da placa e retirados de cada poço 10 μl e depositados em lâminas de vidro coradas com azul de algodão para observação em microscópio das alterações no crescimento fúngico.

4.11 Novos isolados de actinobactéria

A fim de isolar novas cepas de actinobactéria provenientes de plantas de trigo, foram coletadas amostras de rizosfera, raiz e parte aérea de plântulas de trigo das cultivares Marfim (Biotrigo) e Ônix (OR sementes), as sementes destas

cultivares foram desinfestadas por lavagem com hipoclorito de sódio 2% por 2 min, seguido de álcool 70% por 2 min., e abundante lavagem com água destilada estéril e cultivadas em copos plásticos de 400 ml com substrato Humusolo e tempo de crescimento de 14 dias em cabine de germinação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, e foram regadas com água quando necessário.

Das amostras da região rizosférica foram feitas diluições seriadas até diluição 10^{-4} e dispensados 100 μl em placas de ACA mais 0,5% de cloranfenicol e também, foram semeados em meio ISP2 (Apêndice 1). As amostras de raízes foram coletadas e desinfestadas por lavagem com hipoclorito de sódio 2% por 2 min, seguido de álcool 70% por 2 min., e abundante lavagem com água destilada estéril. Após desinfestação as raízes foram cortadas em pequenos segmentos de 3 cm e acondicionadas nos meios de cultura citados anteriormente. Pedacos do caule e folhas também foram cortados e acondicionados nestes meios de cultura para selecionar o crescimento de actinobactérias endofíticas destas regiões.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por sete dias. Após o crescimento das colônias, foram observadas características específicas do crescimento de actinobactérias e em seguida foram feitas repicagens para obter colônia pura no meio ACA. Com as colônias selecionadas, prosseguiu-se com coloração de Gram e identificação morfológica dos isolados de acordo com o Manual Bergey (Locci, 1989). Estes isolados passaram por testes bioquímicos para verificar a produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfato e redução de nitrato segundo os protocolos citados anteriormente (item 4.6).

Estes isolados também foram submetidos ao pareamento de culturas e difusão em poço de ágar, conforme protocolos citados anteriormente, para verificar a atividade antifúngica frente a *P. tritici-repentis*. Antes do ensaio de difusão em poço de ágar foi necessário realizar uma curva de crescimento dos novos isolados de actinobactéria (cultivados em Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de Caldo Amido Caseína incubados sob agitação de 115 rpm e 28°C) para saber em qual ponto ocorreria a produção dos metabólitos por estes isolados. Para tanto, a cada 24 h foram coletadas alíquotas do crescimento durante sete dias. Estas alíquotas no volume de 100 μl foram inoculadas em poços de 6 mm de diâmetro cortados no meio BDA, previamente inoculado com 100 μl do inóculo de *Ptr* em 3.000 esporos/ml. As placas foram incubadas em germinador com 12 h de

fotoperíodo e 25°C por sete dias. A antibiose foi confirmada pela formação de halos de inibição do crescimento micelial ao redor do poço no ágar.

Um experimento de folha destacada também foi executado para verificar a atividade antifúngica destes isolados frente *Ptr* em folhas de trigo. As condições foram as mesmas dos demais ensaios de folha destacada citadas no item 4.7.

Um experimento em germinadora com fotoperíodo foi executado para verificar o potencial em promover o crescimento das plantas de trigo. Em copos plásticos de 300 ml com areia e vermiculita autoclavados, semeou-se 10 sementes de trigo da cultivar Ônix previamente desinfestadas em cada vaso e seguiram-se os seguintes tratamentos:

- 1) Testemunha – sementes regadas apenas com água destilada autoclavada até o início da emergência das folhas, então iniciou-se a rega a cada dois dias com solução nutritiva Sarruge mais nitrato de amônio em concentração de 100%, a composição destas soluções consta no Apêndice 1.
- 2) Sementes inoculadas na sementeira com 5 ml de propágulos de cada um dos isolados (MR2, MR3 e ônix) separadamente. Após emergência das plântulas, iniciou-se a rega com solução nutritiva de Sarruge mais nitrato de amônio diluídos em 50%.
- 3) Sementes inoculadas na sementeira com 1 ml de propágulos de cada um dos isolados, para formar um consórcio. Após emergência das plântulas, iniciou-se a rega com solução nutritiva de Sarruge mais nitrato de amônio em 50%

O experimento foi composto por quatro vasos por tratamento que foram mantidos por duas semanas após as plântulas estarem completamente expandidas. Ao final do experimento foi verificada a taxa de germinação, aferições de altura e em seguida estas plantas foram secas em estufa de 50°C por uma semana e aferidos as massas secas das plantas em cada tratamento.

5. ARTIGOS

5.1. Artigo 1

Evaluation of *Streptomyces* spp. strains as potential biocontrol agents for *Pyrenophora tritici-repentis*

Este artigo foi publicado na Revista Biocontrol Science and Technology

5.2. Artigo 2

Este artigo foi submetido ao comitê editorial da revista BioControl

Biological control of *Pyrenophora tritici-repentis* by *Streptomyces* spp.

Priscila Monteiro Pereira¹, Flávio Martins Santana², Alexsandro Dallegrove³, Sueli Van Der Sand¹.

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas, Campus Universitário, Capão do Leão, RS, Brazil.

³Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

5.3. Resultados não apresentados na forma de artigo.

5.3.1. Novos isolados

Foram obtidos dois isolados da rizosfera da cultivar Marfim denominados de MR2 e MR3 e um isolado da rizosfera da cultivar Ônix denominado de ônix. Estas foram parcialmente caracterizadas morfológicamente e bioquimicamente. Na Tabela 1 estão contidas as informações referentes aos testes bioquímicos aplicados e a atividade antifúngica destes isolados frente a *Ptr*. Na Tabela 2 resume a caracterização morfológica dos isolados.

Todos os isolados apresentaram odor de geosmina, semelhante ao cheiro de terra molhada, tinham culturas secas, enrugadas e rígidas no meio ISP2, e apresentaram formação de cadeia de esporos observados por microscopia, conforme mostra a Figura 1.

O único isolado que apresentou atividade antifúngica frente *Ptr* foi o ônix no método de difusão em poço de ágar (Figura 2), onde a atividade foi verificada a partir do quarto dia de cultivo e manteve até o sétimo dia avaliado. Os demais não apresentaram atividade antifúngica em nenhum ensaio nas condições aplicadas. Devido a esse resultado, seguiu-se a verificação da atividade antifúngica com o sobrenadante livre de células do isolado ônix em folha destacada, porém a atividade antifúngica não foi detectada neste experimento, pois não demonstrou diferença com o controle positivo.

Devido o perfil de produção de outros compostos que podem influenciar na promoção de crescimento vegetal conforme mostra a Tabela 1, estes isolados foram submetidos ao teste de promoção de crescimento vegetal em cabine de germinação (BOD). Neste experimento foi possível observar que as plantas de sementes inoculadas tiveram melhor porcentagem de germinação, vigor e crescimento em relação ao controle negativo, conforme mostra a Tabela 3.

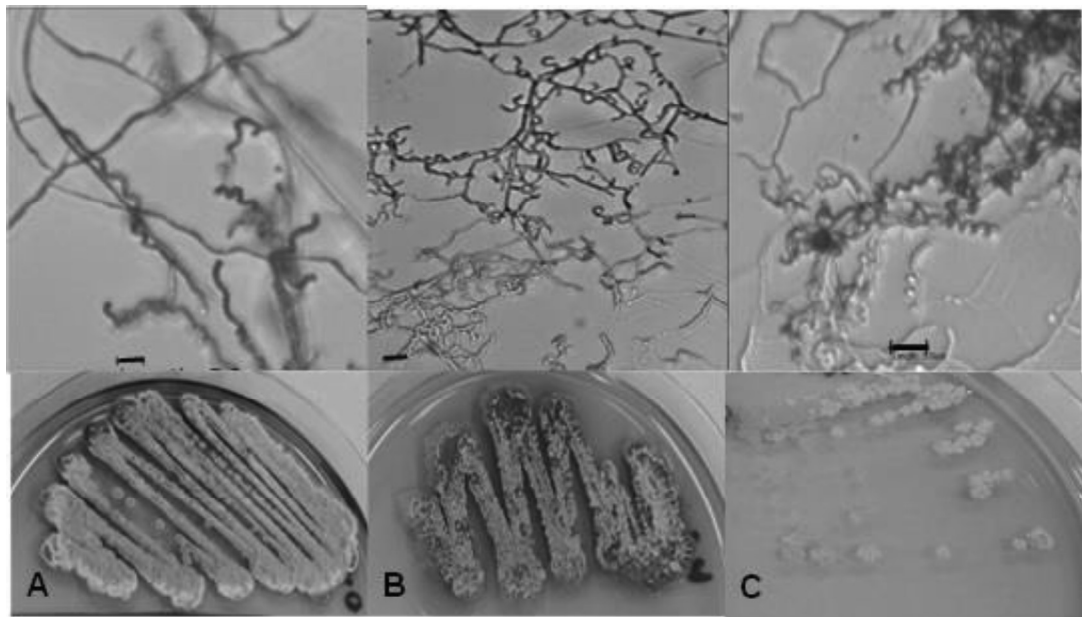


Figura 1. Tipos de cadeia de esporos (figuras de cima) e morfologia colonial dos isolados de actinobacteria (figuras de baixo). A) ônix; B) MR2; C) MR3. Escala bar: 5 μ m.

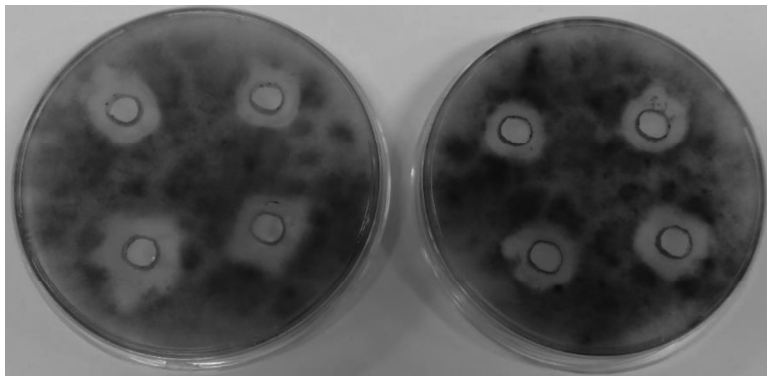


Figura 2. Halos de inibição do crescimento micelial de *P. tritici-repentis* em presença do extrato livre de células do isolado ônix.

Tabela 1. Produção de compostos relacionados a promoção de crescimento vegetal e resultado da atividade antifúngica frente a *P. tritici-repentis*.

Isolado	AIA (µg/ml)	Produção de Sideróforo	Redução de Nitrato	Solubilização de fosfato	Difusão	
					em poço de ágar	Pareamento de culturas
ônix	13,18	-	-	-	+	-
MR2	14,95	+	-	+	-	-
MR3	10,78	+	+	+	-	-

(+) positivo para o teste; (-) negativo para o teste.

Tabela 2. Características morfológicas e culturais dos isolados de actinobactéria.

Isolado	Micélio aéreo (ISP2)	Massa de esporos (AC)	Produção de pigmentos (AC)	Cadeia de esporos (ISP2)	Gênero
ônix	Cinza- esverdeado	Verde	Verde escuro	Espiral	<i>Streptomyces</i>
MR2	Cinza- castanho	Marrom	Castanho	<i>Retinaculiaperti</i>	<i>Streptomyces</i>
MR3	Creme	Creme	Incolor	Espiral	<i>Streptomyces</i>

ISP2: Meio de cultura *International Streptomyces Project-2 Medium*; AC: Caldo Amido Caseína

Tabela 3. Promoção de crescimento das plântulas de trigo de sementes inoculadas com novos isolados de actinobactéria.

Isolado	Germinação (%)	Altura (cm)	Massa seca (mg)
Ônix	95	32,67	26,45
MR2	90	31	23,93
MR3	85	30	29,18
Consórcio	80	35,33	26,90
Controle negativo	70	25	21,96

6. DISCUSSÃO GERAL

Na busca por novas tecnologias e métodos de controle de pragas e doenças para diminuir o uso extensivo de fungicidas sintéticos que frequentemente levam à resistência dos fitopatógenos, resíduos nos produtos finais e no ambiente, os microrganismos agentes de controle biológico e seus metabólitos surgiram como alternativas seguras para o controle de patógenos nas lavouras.

As actinobactérias do gênero *Streptomyces* estão presentes principalmente no solo e desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes. A sua capacidade de produzir enzimas e compostos bioativos vem sendo estudados há anos e já são utilizados por diversos setores como indústria farmacêutica, química e agrícola (Baltz, 2007). Desta forma, vê-se nos *Streptomyces* spp. e seus metabólitos um grande potencial como excelentes agentes para controlar diversos fitopatógenos fúngicos e bacterianos em várias culturas agrícolas (Vurukonda et al., 2018).

O gênero *Streptomyces* do grupo das actinobactérias é o mais relatado como capaz de suprimir doenças em plantas (Filonow e Lockwood, 1985; Baogen, 1996; Raguchander et al., 1997; Jog et al., 2014; Wang et al., 2022). Em especial a interação de *Streptomyces* spp. com plantas de trigo demonstrou capacidade para controle de doenças e promoção de crescimento vegetal (Jog et al., 2014; Wang et al., 2018; Akbari et al., 2020). Newitt et al. (2019) relataram que essa capacidade está relacionada com a habilidade de produzir diversos metabólitos secundários que adicionalmente permite a competição pelo nicho e fontes de carbono que são exsudados pelas plantas.

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, verificamos que estes isolados de *Streptomyces* spp. - 6(4) e R18(6) – já demonstraram interação com as plantas de trigo, sendo capazes de colonizar as suas raízes e contribuir para controle de *Bipolaris sorokiniana* nas sementes e na raiz e contribuiu para o ganho de massa seca total da planta (Monteiro et al., 2017).

Nos tratamentos aplicados no atual estudo, foi possível observar o estímulo do crescimento vegetal mesmo com a presença do fitopatógeno nas plantas de trigo. Por meio dos testes bioquímicos foi detectado a produção de sideróforo pelo

isolado 6(4), capacidade de solubilizar fosfato pelo R18(6) e a produção de AIA pelos dois isolados. Estes compostos por si só são relatados como moduladores da defesa e crescimento saudável das plantas (Palaniyandi et al. 2014; Viaene et al. 2016; Patel et al. 2018). Desta forma, podemos inferir que as plantas de trigo de sementes tratadas com estes isolados tiveram o seu crescimento favorecido pela ação destes compostos liberados pelos microrganismos inoculados.

A aplicação dos metabólitos nas folhas em conjunto com a inoculação dos propágulos na semeadura veio da premissa de que os microrganismos naturais do solo dificilmente colonizam partes distais das plantas ou aparecem em menor abundância (Bodenhause et al. 2013). Como mencionaram Bai et al. (2015) e Zarronaindia et al. (2015) em experimentos comparativos, comunidades microbianas entre folhas e raízes em *Arabidopsis* e videira revelaram que Actinobacteria na endosfera dos órgãos acima do solo de *Arabidopsis* são duas vezes menos abundantes, e em folhas da videira, estavam completamente ausentes.

Portanto, visando melhorar a eficiência do controle do fitopatógeno *Pyrenophora tritici-repentis*, que é um patógeno foliar altamente destrutivo em plantas de trigo, os metabólitos produzidos pelos isolados de *Streptomyces* spp. foram testados na parte aérea das plantas. Inicialmente investigamos se com a extração com acetato de etila do sobrenadante concentraria melhor os metabólitos e teria maior efeito sobre *Ptr*. Para isto, utilizamos o método da folha destacada, pois nos permitiria observar de forma pontual o efeito destes extratos sobre o fitopatógeno simulando o ambiente natural. Como também, neste primeiro momento o produto da extração nos resultaria em menor volume de solução não seria possível aplicar no modelo de plantas inteiras.

Desta forma, conseguimos observar que para o isolado 6(4) não ocorreu diferença entre os dois tipos de extratos na efetividade contra o fitopatógeno, indicando que a quantidade do metabólito responsável pelo controle do fungo estava em quantidade suficiente mesmo na solução bruta, de forma mais diluída.

Já para o isolado R18(6) a extração com acetato de etila ocasionou diminuição da efetividade, indicando que este solvente pode não ser o ideal para extrair completamente os metabólitos deste isolado. Concluimos então, que para plantas inteiras o sobrenadante da cultura foi suficiente para controlar os efeitos

da mancha amarela causada pela infecção de *P. tritici-repentis*.

No experimento em folha destacada do primeiro artigo foi mencionado que ainda não tinha sido possível concluir se ocorreu efeito aditivo em inocular as sementes com os antagonistas e posterior aplicação dos metabólitos nas folhas. Mas, no segundo experimento, com plantas inteiras concluímos que ocorreu de fato a melhora do controle biológico quando adicionado os metabólitos sobre as folhas de modo preventivo, principalmente em relação aos valores de massa seca da parte aérea que foi estatisticamente igual ao controle negativo (plantas saudáveis).

Os resultados deste trabalho, sugerem que os metabólitos produzidos por estes *Streptomyces* além de modular a defesa da planta, exerceram antibiose frente a *P. tritici-repentis*. Segundo Hajlaoui et al. (1994), a antibiose é considerada bastante vantajosa no controle biológico de doenças porque o antibiótico se difunde rapidamente na natureza, não sendo cumulativo no ambiente. Mesmo assim, estes compostos induzem má-formação das hifas apicais como atrofiamento, protuberâncias e distorções, impedindo o completo desenvolvimento do fitopatógeno (Raguchander et al., 1997). Leelasuphakul et al. 2008, observaram que microrganismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido. E esta observação nos deixa mais claro do porquê de haver uma melhora no controle da doença ao utilizar os metabólitos nas folhas e não somente a inoculação via semente e raiz.

Estas alterações no crescimento e desenvolvimento das hifas foram verificadas no experimento em placa (microcultivo e CIM) e indicaram que devido a estas alterações o patógeno não conseguiu se desenvolver completamente na folha e liberar as toxinas responsáveis pela formação da mancha amarela. A partir dos resultados da CIM (concentração inibitória mínima), é necessário ainda, verificar se a inibição da germinação dos conídios de *Ptr* nas maiores concentrações do sobrenadante é um dano irreversível, tendo em vista que nas menores concentrações, vários tipos de distorções e alterações foram observados no desenvolvimento das hifas, indicando um dano irreversível. Porém, ainda não ficou muito claro o porquê de nas menores concentrações é que parece ocorrer a

ruptura da parede celular. Provavelmente essas alterações são dose-dependentes, e que existe uma concentração específica capaz de alterar a permeabilidade celular e causar estes danos. Mas estes detalhes precisam ser melhor investigados em um próximo momento.

A análise do sobrenadante livre de células por espectrometria de massas de alta resolução indicou a presença de muitos compostos, dentre eles, até o momento foi possível confirmar a presença de erucamida e bengamida. Este equipamento não possui uma biblioteca acoplada ao sistema para identificação dos compostos, por isso foi necessário fornecer uma lista de compostos já conhecidos e relatados na literatura.

Erucamida é uma amida de ácido graxo, que já foi isolada de plantas (Kim et al., 2018), animais (Hamberger e Steinhagen, 2003) e microrganismos (Tamilmani et al., 2018), mas sua atividade biológica exata ainda permanece incerta. Bengamida é uma família de compostos orgânicos do metabolismo secundário de esponja do mar *Jaspis* sp. (Quiñóá et al., 1986) e posteriormente descoberto também em myxobacteria Gram-negativa (Johnson et al., 2012). Os relatos da presença desta substância em extratos de *Streptomyces* é bem recente e escasso, em nossa análise percebemos forte presença desta substância no sobrenadante, mas não conseguimos muitas informações na literatura para embasar essas observações. Portanto, há necessidade de mais análises dos metabólitos de *Streptomyces* que se associam com plantas. Notamos em nossas pesquisas que ainda o banco de dados para os compostos produzidos por *Streptomyces* está em expansão e este cenário indica um campo a ser explorado.

Todavia, é importante salientarmos que os efeitos observados dos metabólitos sobre o fitopatógeno não devem advir apenas destes compostos identificados, pois o espectro gerado mostrou a presença de muitos outros compostos que podem estar agindo em conjunto, mas que ainda não foi possível confirmar sua fórmula molecular e subsequentes análises complementares que nos permitam indicar de qual composto se trata. Do mesmo modo, a produção de enzimas também são importantes ferramentas no controle de fungos, como as quitinases e glucanases e que já tiveram sua produção comprovada nestes mesmos isolados de *Streptomyces* em estudos anteriores pelo nosso grupo de pesquisa (Minotto et al., 2016).

As plantas de sementes inoculadas com os propágulos das cepas de *Streptomyces*, sem pulverização dos metabólitos nas folhas, responderam com menor severidade da mancha amarela em relação ao controle não tratado, isto nos indica que pode estar ocorrendo uma indução de resistência. Verhagem et al. (2010) descreveu que a prévia inoculação de bactérias benéficas na rizosfera, determinado como *priming*, é um processo que induz a resistência sistêmica (da sigla em inglês *ISR - Induced Systemic Resistance*), onde as plantas adquirem maior resistência ao ataque de patógenos.

Entretanto, observamos que as plantas apenas inoculadas na semeadura não se desenvolveram tão bem como as plantas duplamente tratadas. Conforme Conn et al. (2008) demonstraram que *priming* por actinobactérias compartilham rotas de ISR e SAR (*Systemic Acquired Resistance*). Porém, as plantas inoculadas precisam encontrar um balanço sutil entre os custos e benefícios das respostas de defesa para maximizar o seu desempenho, tanto a indução da SAR por patógenos quando a iniciação de ISR por bactérias não patogênicas vêm com custos de adequação para a planta (Bostock, 2005). Isso corrobora com os dados obtidos neste trabalho, pois as plantas apenas inoculadas na semeadura tiveram menor ganho de massa seca comparadas com o controle negativo (sem patógeno) e com as plantas de tratamento duplo. Em contrapartida, observamos que as plantas inoculadas na semeadura e posteriormente pulverizadas com os metabólitos (tratamento duplo) tiveram diminuição dos custos energéticos para o seu crescimento, pois os dados de massa seca nestes tratamentos foram iguais estatisticamente às plantas saudáveis.

Os *Streptomyces* sp. 6(4) e R18(6) são originários de raízes saudáveis de tomateiro, mas que demonstraram significativa atividade tanto antifúngica quanto de promoção de crescimento em plantas de trigo. A fim de encontrar um isolado com potencial antimicrobiano da própria comunidade endosférica e/ou rizosférica das plantas de trigo, buscamos isolar actinobactérias destas plantas. Desta forma, foi possível isolar mais três actinobactérias da rizosfera, que foram parcialmente caracterizadas para a confirmação de gênero.

Como observado, nos resultados dos experimentos para estes novos isolados a produção de compostos envolvidos na promoção direta do crescimento vegetal foi investigada e demonstraram resultados potenciais. Ainda que não tenha sido

possível maximizar a produção dos compostos antifúngicos neste momento, os compostos relacionados com a promoção de crescimento de plantas identificados nos isolados MR2 e MR3 tem grande vantagem no processo de fertilização do solo. A rizosfera pode muitas vezes conter altos níveis de carbono, nitrogênio e outros minerais. No entanto, alguns destes nutrientes e minerais, especialmente fosfatos, permanecem em formas complexas ou precipitadas que não podem ser utilizadas pelas plantas, sendo assim, essas actinobactérias em conjunto podem aumentar a disponibilidade destes nutrientes para as plantas em associação. Apesar de nestes experimentos realizados, estes isolados não apresentarem melhor atividade antifúngica do que os isolados 6(4) e R18(6), posteriormente seria interessante buscar combinações entre eles e a otimização dos meios de cultivo para investigação da produção de metabólitos benéficos para o processo de biocontrole de fitopatógenos nas plantas de trigo.

Por fim, a partir destas evidências relatadas neste trabalho foi possível concluir que os isolados de *Streptomyces* sp. 6(4), R18(6) e o consórcio entre eles, mesmo sendo isolados de plantas de tomate, demonstraram um perfil de produção de metabólitos com propriedades antifúngicas que contribuíram para o controle de *P. tritici-repentis* em plântulas de trigo. E a inoculação destes isolados nas sementes mais a aplicação dos metabólitos na parte aérea preventivamente demonstrou nítido benefício na promoção de crescimento das plantas tratadas mesmo em presença do fitopatógeno. Portanto, são fortes candidatos para formulação de um biofungicida.

Como perspectivas, ainda são necessários testes de toxicidade para certificar a segurança destas moléculas para saúde humana e animal. Purificar e completar as análises dos compostos do extrato, como as técnicas de HPLC e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Pode-se também investigar com abordagens moleculares se a expressão das toxinas de *Ptr* são de fato silenciadas pela presença dos isolados de *Streptomyces* na planta de trigo para confirmar a indução de resistência. E para completar o estudo é necessário ainda, buscar uma formulação adequada para aplicação em campo e investigar a permanência da efetividade da atividade antifúngica nestas condições.

7. CONCLUSÕES

1. Ocorreu antagonismo e atividade antifúngica dos isolados e dos metabólitos de *Streptomyces* sp. 6(4) e R18(6) e do consórcio frente ao fungo fitopatogênico *Pyrenophora tritici-repentis*.
2. A metodologia utilizada da folha destacada foi eficiente e permitiu diferenciar a capacidade dos extratos brutos e concentrados em suprimir *P. tritici-repentis* nas folhas de trigo.
3. O extrato bruto e concentrado do *Streptomyces* sp. 6(4) impediram de forma eficaz o total desenvolvimento de *P. tritici-repentis* nas folhas de trigo.
4. Os extratos do isolado R18(6) variaram em relação a atividade antifúngica e o extrato bruto foi o melhor em controlar *P. tritici-repentis*.
5. O extrato bruto do consórcio também alterou o desenvolvimento de *P. tritici-repentis* e impediu o completo desenvolvimento do patógeno nas folhas de trigo.
6. Diferentes concentrações do sobrenadante livre de células tiveram distintas alterações sobre a germinação dos conídios de *Ptr*. Para o sobrenadante do isolado 6(4), a maior concentração o efeito foi fungistático e nas menores concentrações o efeito foi fungicida. Para o isolado R18(6) os conídios germinaram sem alterações visíveis no micélio em todas as concentrações testadas.
7. Em plantas inteiras estes isolados também contribuíram para controlar *P. tritici-repentis* e diminuíram a área foliar lesionada.
8. O tratamento duplo (inoculação no sulco da semeadura mais pulverização dos metabólitos na parte aérea de forma preventiva) além de controlar a doença, contribuiu para o ganho de massa seca da parte aérea, indicando

promoção de crescimento vegetal.

9. A técnica de cromatografia a líquido e espectrometria de massa de alta resolução foi eficiente e indicou uma variedade de compostos presentes no sobrenadante do cultivo das actinobactérias. Os compostos identificados, até o momento, foram erucamida e bengamida, são substâncias com propriedades antimicrobianas relatadas na literatura.

8. REFERÊNCIAS

- ABCbio. Biodefensivos. Borsari, AP, Claudino, M. In: **MERCADO E PERCEPÇÃO DO PRODUTOR BRASILEIRO**. Agroanalysis - outubro 2018. Disponível em: <<https://www.abcbio.org.br/informativos/publicacoes/>> Acesso em: abril de 2020.
- Abdel-Fattah GM, Mohamedin AH. 2000. Interaction between a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brawn scales. *Biol Fertil Soils* 32: 401- 09.
- Adegboye MF, Babalola OO. 2013. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education** (A. Méndez-Vilas, Ed.) In: *Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites*. Formatex. pp 786-795.
- Agrolink. **Argentinos criam seu primeiro fungicida biológico para trigo**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/argentinos-criam-seu-primeiro-fungicida-biologico-para-trigo_200811.html> Acesso em: setembro de 2021.
- Ahemad M, Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26:1–20.
- Akbari A, Gharanjik S, Koobaz P, Sadeghi A. 2020. Plant growth promoting *Streptomyces* strains are selectively interacting with the wheat cultivars especially in saline conditions, *Heliyon* 6 (4): e03445-3675.
- Andrie MR, Pandelova I, Ciuffetti LM. 2007. A Combination of Phenotypic and Genotypic Characterization Strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* Race identification. *APS Publications*. 97(6): 694-701.
- Ann EH, Eilenberg J. 2018. **Natural Enemies: An Introduction to Biological Control**. 2 Ed. Cambridge University Press.
- Annonne J. 1998. **Tan spot of wheat in Argentina: importance and prevailing disease management strategies**. In E. Duveiller, H.J. Dubin, J. Reeves & A. McNab (Eds.). *Proceedings of the International Workshop Helminthosporium Diseases of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot* (pp. 339–345). 9–14 February 1997, Cimmyt, El Batán, México México, DF.
- Arraiano LS, Brading PA, Brown JKM. 2001. A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. *Plant Pathol.* 50:339-346.
- Bade RTDN. 2016. **Advanced analytical tools for the investigation of licit and illicit drug residues in water**. 326 f. Tese (Doutorado Internacional). Universitat Jaume I,

Espanha.

- Bai Y, Müller DB, Srinivas G, et al. 2015. Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota Nature. 528:3649.
- Baibakova EV, Nefedjeva EE, Suska-Malawska M, Wilk M, Sevriukova GA, Zheltobriukhov VF. 2019. Fungicidas Modernos: Mecanismos de Ação, Resistência Fúngica e Efeitos Fitotóxicos. Pesquisa e Revisão Anual em Biologia, 32(3):1-16.
- Bacaltchuk, B. 1999. **Estratégias para tornar a triticultura mais competitiva no Brasil.** In: CUNHA, G. R. (Org.). Trigo 500 anos. Passo Fundo: Embrapa Trigo. pp 13-18.
- Bach, EE. 1997. **Distinção morfológica e isoenzimática de Bipolaris spp. e Drechslera tritici-repentis do trigo; aspectos bioquímicos das interações e indução de resistência.** Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP. Brasil.
- Baltz RH. 2007. Antimicrobials from actinomycetes. Back to the future. Microbe. 2:125-131.
- Bankina B, Gaile Z, Balodis O, Bimsteine G, Katamadze M, Kreita D, Paura L, Priekule I. 2014. Harmful winter wheat diseases and possibilities for their integrated control in Latvia. Plant Science. 64(7): 615–622.
- Baogen G. 1996. **Production and uses of Biopesticides in China.** In: Advances in Biological Control of Plant Diseases. Wenhua T, Cook RJ & Rovira A (eds.). China Agriculture University Press, Beijing. pp 332-334.
- Baumgratz EI, Mera de CMP, Fiorin JE, Castro de NLM, Castro de R. 2017. Produção de trigo. A decisão por análise econômica. Revista de Política Agrícola. 26(3):8-21.
- Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol 84:11–18.
- Bertagnolli VV. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de Pyrenophora tritici-repentis e reação de genótipos de trigo para mancha-amarela-da folha.** 2018. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 6 set. 2018. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/1551>. Acesso em: Julho de 2022.
- Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothhaft H, Saier MH Jr, Titgemeyer F. 2004. In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of Streptomyces coelicolor A3(2). J Bacteriol. 186:1362–1373.
- Bockus WW, Claassen MM. 1992. Effects of crop-rotation and residue management-practices on severity of tan spot of winter-wheat. Plant Dis. 76(6): 633–636.
- Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. 2013. Bacterial Communities Associated with

- the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 8(2): e56329.
- Boix C, Ibáñez M, Sancho JV, Niessen WMA, Hernández F. 2013. Investigating the presence of omeprazole in waters by liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry: Degradation experiments. J. Mass Spectrom. 48:1091–1100.
- Bosch van den F, Oliver R, Berg van den F, Paveley N. 2014. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. Annu Rev Phytopathol. 52:175–195.
- Bostock RM. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the Line Between Cost and Benefit. Ann Rev Phytopathol. 43:545-80.
- Brachmann AO, Brameyer S, Kresovic D, Hitkova I, Kopp Y, Manske C, et al.. (2013). Pyrones as bacterial signaling molecules. Nat Chem Biol. 9:573–578.
- Byerlee D, Traxler G. 1995. National and International Wheat Improvement Research in the Post-Green Revolution Period: Evolution and Impacts. Am J Agr Econ. 77(2): 268-278.
- Canteri MG, Althaus RA, Virgens Filho JS das, Giglioti EA, Godoy CV. 2001. SASM-Agri - Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan.
- Carrillo-Castañeda G, Juárez Muños J, Peralta-Videa JR, Gomez E, Tiemannb KJ, Duarte-Gardea M, Gardea-Torresdey JL. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. Adv Environ Res. 6:391-99.
- Carmona MA, Ferrazini M, Barreto DE. 2006. Tan spot of wheat caused by *Drechslera tritici-repentis*: detection, transmission, and control in wheat seed. Cereal Res Commun. 34(2–3):1043–1049.
- Challis GL, Hopwood DA. 2003. **Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (Suppl. 2), 14555–14561
- Conn VM, Walker AR, Franco CM. 2008. Endophytic Actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interact. 21:208–218.
- Conab. **Análise mensal, Trigo.** Maio de 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-trigo>. Acesso em: Julho de 2022.
- Cordovez V, Carrion VJ, Etalo DW. 2015. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. Front Microbiol. 6:1081.
- CropLife Brasil. 2021. **Produtos disponíveis por ativo biológico.** Disponível em

- <https://croplifebrasil.org/conceitos/conheca-os-protagonistas-dos-produtos-biologicos-disponiveis-no-brasil/> Acesso em: setembro 2021.
- Dastager GS, Agasar D, Pandey A. 2009. Production and partial purification of amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Microbial Biotechnol.* 36:189-194.
- De Wolf ED, Effertz RJ, Ali S, Francl LJ. 1998. Vistas of tan spot research. *Canadian J Plant Pathol.* 20(4): 349–444.
- Deising HB, Reimann S, Peil A, Weber WE. 2002. **Disease management of rusts and powdery mildews**. In F. Kempken (ed.), *The mycota*, vol. XI. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp.243-269.
- Dias MP, Bastos MS, Xavier VB, Cassel E, Astarita LV, Santarém ER. 2017. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiol Biochem.* 118: 479–493.
- Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M, Puglia AM. 2002. Microbial Technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol.* 99: 187-98.
- Donald L, Pipite A, Subramani R, Owen J, Keyzers AR, Taufa T. 2022. *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. *Microbiol Res.* 13(3):418-465.
- Dubin H J. 1983. Occurrence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the Andean countries of South America. *Plant Dis.* 67:1040.
- FAO. 2018. **The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050**. Summary version. Rome. 60 pp.
- Farias AR. et al. 2016. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento: potencial de produção de trigo no Brasil a partir de diferentes cenários de expansão da área de cultivo**. 1 ed. Passo Fundo: Embrapa, p 40.
- Fernandes JMC, Picinini EC. **Controlando as doenças de trigo na hora certa**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, dez. 1999. (Embrapa Trigo.Comunicado Online, 22). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co22.htm. Acesso em: 19 ago. 2020.
- Fernandez MR, Clarke JM, DePauw RM. 1994. Response of durum wheat kernels and leaves at different growth stages to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Dis.* 78: 597-600
- Filonow AB, Lockwood JL. 1985. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69:1033-1036.
- Gilchrist SL, Fuentes SF, la Isla de Bauer M de L. 1984. Determinacion de fuentes de resistencia contra *Helminthosporium tritici-repentis* bajo condiciones de campo e

- invernadero. *Agrociencia* 56: 95-105.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 41:109-17.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM. 1999. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**; Imperial College Press: London, U. pp. 1–13.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61:793-796.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Vidya MS et al. 2013. Plant growth promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. *SpringerPlus.* 2:574.
- Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Kudapa H, Katta K, Varshney RK. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiol Res.* 169: 40-8.
- Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 26:192-195.
- Gowdar SB, Deepa H, Amaresh YS. 2018. A brief review on biocontrol potential and PGPR traits of *Streptomyces* sp. for the management of plant diseases. *J Pharm Phytoch.* 7(5): 03-07.
- Hajlaoui MR, Traquair JA, Jarvis WR, Bélanger RR. 1994. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Science and Technology.* 4(2):229-37.
- Hamberger, A., and Stenhagen, G. (2003). Erucamide as a modulator of water balance: new function of a fatty acid amide. *Neurochem. Res.* 28:177–185.
- Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y. 2008. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl Soil Ecol.* 40:510–17.
- Hanson JR. 2003. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
- Hernández F, Ibáñez M, Gracia-Lor E, Sancho JV. 2011. Retrospective LC-QTOF-MS analysis searching for pharmaceutical metabolites in urban wastewater. *J Sep Sci.* 34: 3517–3526.
- Hernández F, Ibáñez M, Botero-Coy AM, Bade R, Bustos-López MC, Rincón J, Moncayo A, Bijlsma L. 2015. LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá,

- Colombia. *Anal Bioanal Chem.* 407:6405–6416.
- Hibbing M, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. 2010. Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 8:15–25.
- Hopwood DA. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: From in vivo through in vitro to in silico (review article). *Microbiology.* 145:2183-2202
- Hopwood DA. 2007. **Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers.** Oxford University Press, New York, NY.
- Hosford RM Jr. 1971. A form of *Pyrenophora trichostoma* pathogenic to wheat and other grasses. *Phytopathol.* 61: 28-32.
- Hosford RM Jr. 1982. **Tan spot.** Pages 1-24. In RM Hosford Jr.,Ed.. *Tan Spot of Wheat and Related Diseases.* North Dakota State University. pp 116.
- Hwang BK, Lim SW, Kim BS, Lee JY, Moon SS. 2001. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenyl acetic acid and sodium phenyl acetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol.* 67:3730-3745
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology.* 21(5):526-531.
- Jauri PV, Altier N, Kinkel LL. 2016. **Streptomyces for Sustainability.** In: Castro-Sowinski S. (eds) *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability.* Microorganisms for Sustainability, vol 1. Springer, Singapore.
- Johnson TA, Sohn J, Vaske YM, White KN, Cohen TL, Vervoort HC, Tenney K, Valeriote FA, Bjeldanes LF, Crews P. 2012. Myxobacteria *versus* sponge-derived alkaloids: The bengamide family identified as potent immune modulating agents by scrutiny of LC-MS/ELSD libraries. *Bioorg. Med. Chem.* 20:4348–4355.
- Jog R, Pandya M, Nareshkumar G et al. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiol.* 160:778–88.
- Jorgensen LN, Olsen IV. 2007. Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. *Crop Protection.* 24(11):1606-1616.
- Kämpfer P. 2006. **The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy.** In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes.* Springer, New York.
- Khendkar AS, Deshpande AR. 2018. Isolation and screening of *Streptomyces* for biocontrol potential against *Rhizoctonia bataticola* infection of soybean. *Indian J Appl Microbiol.* 21(1):78-86.
- Kholi MM, Mehta YR., Diaz De Ackermann M. 1982. **Spread of tan spot in the Southern**

- Cone region of South America.** In L.J. Francl, J.M. Krupinsky, and M.P. McMullen (Eds.). Proceedings of the Second International Tan Spot Workshop. pp 25.
- Kim, C. R., Kim, H. S., Choi, S. J., Kim, J. K., Gim, M. C., Kim, Y. J., et al. (2018). Erucamide from radish leaves has an inhibitory effect against acetylcholinesterase and prevents memory deficit induced by trimethyltin. *J. Med. Food.* 21:769–776.
- Kremer M, Hoffmann GM. 1992. Effect to *Drechslera tritici-repentis* as the cause of wheat yellow leaf spot disease on kernel yield and dry matter production. *J Phytopathol.* 99: 509-605.
- Kurtboke DI. 2012. Biodiscovery from rare actinomycetes: An eco-taxonomical perspective. *Appl Microbiol Biotech.*93(5):1843-1852
- Kurth F, Mailander S, Bonn M, Feldhahn L, Herrmann S, Grosse I, Buscot F, Schrey SD, Tarkka MT. 2014. Streptomyces-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. *Mol Plant Microbe Interact.* 27:891–900.
- Lacomte C, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Robert F, Steinberg C. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. 101:17-30.
- Lamari L, Bernier CC. 1989. Evaluation of Wheat Lines and Cultivars to tan Spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] Based on Lesion Type. *Canadian J Plant Pathol.* 11: 49-56.
- Lamari L, Strelkov SE. 2010. Minireview The wheat/ *Pyrenophora tritici-repentis* interaction: progress towards an understanding of tan spot disease. *Canadian J Plant Pathol.* 32:4-10.
- Larran S, Simón MR, Moreno MV, Santamarina Siurana MP, Perelló A. 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Bio Control* 92:17–23.
- Law WFJ, Ser HL, Khan mT, Chuah LH, Pusparajah P, Chan KG, Goh BH, Lee LH. 2017. The Potential of Streptomyces as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Front. Microbiol.* 8(3): 1-7.
- Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuechitt S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 48(1):113-121.
- Lehr NA, Schrey SD, Hampp R, Tarkka MT. 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol.*177:965–976.
- Leite F. 2002. **Validação em análise química.** 5ª edição. Editora Átomo, Campinas, São

Paulo.

- Locci R. 1989. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. *Streptomyces* and related Genera. Baltimore (MD): Williams and Wilkins.
- Loughman R, Deverall BJ. 1986. Infection of resistant and susceptible cultivars of wheat by *Pyrenophora tritici-repentis*. Plant pathology, New York, 35: 443-450.
- Luz WC, Da Hosford Jr RM. 1980. Twelve *Pyrenophora trichostoma* races for virulence to wheat in the Central Plains of North America. Phytopathol. 70: 1193-1196.
- Maciel JLN, Sbalcheiro CC, Lau D, Santana FM, Costamilan LM, Lima MIPM. 2020. **Doenças da cultura do trigo no Brasil**. Revista Plantio Direto. Edição 174:10-17. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1122395/doencas-da-cultura-do-trigo-no-brasil>. Acesso em: Julho de 2022.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Sundaram S, Sa T. 2009. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. Microbiol Res. 164(1):114–20.
- MAPA. **Controle Biológico**. In: Mercado de biodefensivos cresce mais de 705 no Brasil em um ano. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/centrais-de-conteudo/audios/momento-agro/mercado-de-biodefensivos-cresce-mais-de-70-no->. Acesso em: setembro de 2021.
- Martinez G, Regente M, Jacobi S, Del Rio M, Pinedo M, de la Canal L. 2017. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. Pestic Biochem Physiol. 140: 30–35.
- Minotto E, Milagre L, Spadari C, Feltrin T, Ballarini AE, Germani JC, Salamoni SP, Van Der Sand S. 2016. Screening endophytic actinobacteria with potential antifungal activity against *Bipolaris sorokiniana* and growth promotion of wheat seedlings. African Journal of Microbiology Research. 10(36):1494–1505.
- Misra AP, Singh, RA. 1972. Pathogenic differences amongst three isolates of *Helminthosporium tritici-repentis* and the performance of wheat varieties against them. Indian Phytopathol. 25: 350-353.
- Miyadoh S. 1997. **Atlas of actinomycetes**. Asakura Publishing Co, Tokyo, Japan.
- Monte E. 2001. Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology. Int J Microbiol. 4:1–4.
- Monteiro P, Borba M, Van Der Sand ST. 2017. Evaluation of the Antifungal Activity of *Streptomyces* sp. on *Bipolaris sorokiniana* and the Growth Promotion of Wheat Plants. J Agric Sci. 9(12):229-240.
- Moreno MV, Stenglein SA, Perelló AE. 2012. ***Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot: a review of intraspecific genetic diversity**. In: Caliskan M (ed.)

- Genetic Diversity / Book 2. INTECH Publisher, Rijeka, Croatia, pp 297–330.
- Mota MS, Gomes CB, Souza Junior IT, Moura AB. 2017. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Braz J Microbiol.* 48:62–70.
- Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Girio FM, Bon EPS, et al. 2002. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian Cerrado soil. *Enzyme Microb Technol.* 31:549-555.
- Nautiyal CS. 1999. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 70:265-270.
- Newitt JT, Prudence SMM, Hutchings MI, Worsley SF. 2019. Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using *Streptomyces*. *Pathogens.* 8(2):78.
- Noguera-Oviedo K, Aga DS. 2016. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *J. Hazard. Mater.* 316:242–251.
- Noman A, Aqeel M, Qasim M, Haider I, Lou Y. 2020. **Plant-insect-microbe interaction: a love triangle between enemies in ecosystem.** *Sci Total Environ.* 699:134181.
- Okon Y, Labandera-González C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years of worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem.* 26:1591–1601.
- Oliveira de MF, Germano M, Van Der Sand ST. 2010. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Res Microbiol.* 161:365.
- Palaniyandi SA, Damodharan K, Yang SH, Suh JW. 2014. *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *J Appl Microbiol.* 117:766–73.
- Papavizas G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann Rev Phytopathol.* 23:23–54.
- Patel JK, Madaan S, Archana G. 2018. Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops. *Microbiol Res.* 215: 36–45.
- Patten CL, Glick BR. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* 68(8):3795–3801
- Perelló A, Moreno V, Mónaco C, Simón MR. 2008. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. *Bio Control*, 53:895–904.
- Perelló A, Moreno V, Simon MR., Sisterna M. 2003. Tan spot of wheat infection at different

- stages of crop development and inoculum type. *Crop Prot.* 22:157–169.
- Perelló A, Simón MR, Arambarri AM, Cordo C. (2001a) Greenhouse screening of the saprophytic resident microflora for control of leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L). *Phytoparasitica*, 29:341–351.
- Perelló A, Mónaco C, Cordo C. 1997. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* in controlling leaf blotch of wheat (*Septoria tritici*) under in vitro and greenhouse conditions. *J Plant Dis Plant Protec.* 104: 588–598
- Perelló A, Simón MR, Arambarri AM. 2002. Interactions between foliar pathogens and the saprophytic mycoflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. *J Phytopathol.* 150:232–243.
- Perelló A, Simón MR, Sisterna M., Cordo C, Arambarri AM. 2001b. Microflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Buenos Aires Province (Argentina) and its possible significance in biological control of foliar pathogens. *J Plant Dis Plant Protec*, 108: 459–471.
- Perelló AE, Dal Bello GM. 2011. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biological inducers under field conditions. *Ann Appl Biol.* 158(3): 267-274.
- Perochon A, Doohan FM. 2016. Assessment of wheat resistance to *Fusarium graminearum* by automated image analysis of detached leaves assay. *Bioprotocol.* 6(24):1-7.
- Petrosyan P, Gartia-Varela M, Luz-Madrigal A, Huitron C, Flores ME. 2003. *Streptomyces mexicanus*, a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*53:269-273.
- Pfender WF, Zhang W, Nus A. 1993. Biological Control to Reduce Inoculum of the Spot Pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in Surface-borne Residues of Wheat Fields. *Phytopathol.* 83:371-375.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM . 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol.*5(5):308–316.
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.*52:347–375.
- Poveda J, Eugui D, Velasco P. 2020. Natural control of plant pathogens through glucosinolates: an effective strategy against fungi and oomycetes. *Phytochem Rev.* 19(4):1045-1059.
- Preininger C, Sauer U, Bejarano A, Berninger T. 2018. Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 7265-82.

- Quiñoà E, Adamczeski M, Crews P. 1986. Bengamides, heterocyclic anthelmintics from a *Jaspidae*. marine sponge. J. Org. Chem. 51:4494–4497.
- Raguchander T, Jayashree & Samiyappan R. 1997. Management of Fusarium wilt of banana using antagonistic microorganisms. J. Biol Control. 11:101-105.
- Raja A, Prabakarana P. 2011. Actinomycetes and drug-an overview. Science Alert. 1:72-84.
- Raymond PJ, Bockus WW, Norman BL. 1985. Tan spot of winter wheat: procedures to determine host response. Phytopathol.75: 686-690.
- Reis EM, Casa RT, Danelli ALD. 2011. **Doenças do trigo: mancha-amarela da folha**. São Paulo: Bayer S.A. pp 18.
- Reis EM. 1994. **Manual de identificação e de quantificação de doenças do trigo**. Passo Fundo: Agroalpha, pp 59.
- Rey T, Dumas B. 2017. Plenty is no Plague: Streptomyces Symbiosis with Crops. Trends Plant Sci. 22(1): 30-37.
- Roman DL, Voiculescu DI, Filip M, Ostafe V, Isvoran A. 2021. Effects of Triazole Fungicides on Soil Microbiota and on the Activities of Enzymes Found in Soil: A Review. Agriculture 11(9):893.
- Ronis A, Semaškiene R. 2011. Relationship of AUDPC values of tan spot and Stagonospora glume blotch with grain infection in winter and spring wheat. Zemdirbyste. Agriculture. 98(1):11–18.
- Roessner CA, Scott AI. 1996. Genetically engineered synthesis of natural products: from alkaloids to corrins. Annual Review of Microbiology. 50: 467-90.
- Rothrock CS, Gottlieb D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can J Microbiol.30:1440–1447.
- Sahli AAA., Abdulkhair MW. 2012. Biocontrol of Fusarium udum diseases for some wheat cultivars by *Streptomyces spororaveus*. Afr J Micro Res. 6(1): 190-196.
- Sangdee A, Kornphachara S, Srisawat N. 2016. In vitro screening of antagonistic activity of soil *Streptomyces* against plant pathogenic fungi and assessment of its characters. J Agr Tech. 12(1):173-85.
- Santana FM, Sbalcheiro CC, Moffat C, Oliver R. 2017. **Infiltração da toxina Ptr toxa em plântulas de trigo, visando o screening de cultivares com presença/ausência do gene de sensibilidade TSN1**. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE, 11.; FÓRUM NACIONAL DE TRIGO, 2017, Cascavel. Resumos expandidos.Cascavel: Coodetec. pp.141-145.
- Schilder AMC, Bergstrom GC. 1990. Variation in virulence within the population of

- Pyrenophora tritici-repentis* in New York. *Phytopathol* 80: 84-90
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 160:47-56.
- Secex. **Importação do trigo.** 2020. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/importacoes-do-trigo-diminuem-em-fevereiro-devido-dolar-elevado/>> Acesso em: Abril de 2020.
- Seiber JN, Coats J, Duke SO, Gross AD. 2014. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *J Agric Food Chem.* 62:11613-19.
- Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings MI. 2012. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 862–876.
- Sinha R, Singh S, Srivastava P. 2014. Studies on process optimization methods for rapamycin production using *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 37(5):829–840.
- Shabeer A, Bockus WW. 1988. Tan spot effects on yield and yield components relative to growth stage in winter wheat. *Plant Dis* 72:599–602.
- Shen T, Wang C, Yang H, Deng Z, Wang S, Shen B, Shen Q. 2016. Identification, solid-state fermentation and biocontrol effects of *Streptomyces hygroscopicus* B04 on strawberry root rot. *Appl. Soil. Ecol.* 103: 36-46
- Sherwood RT, Vance CP. 1980. Resistance to fungal penetration in gramineae. *Phytopathology.* 70: 273-279.
- Shimizu, M. 2011. **Endophytic actinomycetes: Biocontrol agents and growth promoters.** In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*; Maheshwari, D.K., Ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA. pp. 201–220.
- Shiferaw, B, Smale M, Braun H, Duveiller E, Reunolds M, Muricho G. 2013. Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Sec.* 5: 291–317.
- Silva-Stenico ME, Pacheco FTH, Rodrigues JLM., Carrilho E, Tsai SM. 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol Res,* 160, 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.03.007>
- Singh PK, Hughes GR. (2006) Genetic Similarity among Isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* Causal Agent of Tan Spot of Wheat. *J Phytopathol.* 154: 178-184.
- Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. 1979. **Introduction to Modern Liquid chromatography.** 2° edição. John Wiley & Sons, Inc, United States of America.
- Syed DG, Dayanand A, Pandey A. 2009. Production and partial purification of amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J. Ind. Micr. & Biotech.* 36:189-194.
- Tamilmani, E., Radhakrishnan, R., and Sankaran, K. 2018. 13-Docosenamide release by

- bacteria in response to glucose during growth-fluorescein quenching and clinical application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:6673–6685.
- Tarkka MT, Lehr NA, Hampp R, Schrey SD. 2008 Plant behavior upon contact with Streptomycetes. *Plant Signal. Behav.* 3: 917–919.
- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol.* 68(5):2161-71
- Toumatia O, Compant S, Yekkour A, Goudjal Y, Sabaou N, Mathieu F, Sessitsch A, Zitouni A. 2016. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *S Afr J Bot.* 105: 234-39.
- Trejo-Estrada SR, Sepulveda IR & Crawford DL. 1998. In vitro and in antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World J. Microbiol & Biotechnol.* 14:865-872.
- Tronsmo A. 1986. **Use of *Trichoderma* spp. in biological control of necrotrophic pathogens.** In: *Microbiology of the Phyllosphere.* Eds N.J. Fokkema and J. Van den Heuvel. Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 348–362
- USDA. **Wheat Sector at a Glance.** Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/topics/crops/wheat/wheat-sector-at-a-glance/>> Acesso em: dezembro de 2019.
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol.* 11:443–448.
- Vassey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* 255:571-586.
- Veiga MM. et al. 2006. **Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil.** *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 22(11):2391- 2399.
- Viaene T, Langendries S, Beirinckx S, Maes M, Goormachtig S. 2016. *Streptomyces* as a plant's best friend? *FEMS Microbiol Ecol.* 92:119.
- Vonothini G, Murugan M, Sivakumar K, Sudha S. 2008. Optimization of protease production by an actinomycete strain PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afric J Biotechnol.* 7(18):3225-3230.
- Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E. 2018. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences.* 19(4).
- Wang H, Fu L, Meng J, Ding R, Wang Y, Wang X, Han C, Li L, Zhu C. 2022. Antagonistic

- activity and biocontrol effects of *Streptomyces* sp. CX3 cell-free supernatant against blueberry canker caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Crop Prot.* 162: 106072.
- Wang X, Zhang M, Gao J, Pu T, Bilal M, Wang Y. 2018. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. *Biol Control.* 127:78-84.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol.* 176:386-390.
- Wheat Atlas. 2016. **Global distribution of wheat mega environments**. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), El Batan (Mexico). Disponível em: <http://wheatatlas.org/megaenvironments>. Acesso em: Maio de 2022.
- Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products.* 52(6): 1189-1208.
- Wright H, Sutton JC. 1990. Inoculum of *Pyrenophora tritici-repentis* in relation to epidemics of tan spot of winter wheat in Ontario. *Can J Plant Pathol.* 12:149–157.
- Yang Y, Zhang S-wen, Li K-tai. 2019. Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi. *World J Microb Biot.* 35:145.
- Zadoks JC. 1992. The costs of change on plant protection. *J Plant Prot.* 9:151-159.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research.* 14(6): 415–421).
- Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S, Bokulich NA, Mills DA, Martin G, Taghavi S, van der Lelie D. 2015. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio.* 6(2):e02527-14.
- Zhang C, Zhou T, Xu Y, Du Z, Li B, Wang J, Zhu L. 2020. Ecotoxicology of strobilurin fungicides. *Sci Total Environ.* 742:140611.
- Zouaoui SA, Megherbi-Benali A, Toumi BF, Ouair D. 2018. Contribution to the study of the antifungal potency of the seeds of *Chenopodium quinoa* wild against two phytopathogenic fungi of the barley: *Pyrenophora tritici-repentis* and *Rhynchosporium secalis*. *Bulletin de La Societe Royale Des Sciences de Liege.* 87:100–111.

9. APÊNDICES

1. Composição dos meios de cultura e soluções:

ACA – Ágar amido caseína

Amido – 10 g
Caseína – 0,3 g
KNO₃ – 2,0 g
NaCl – 2,0 g
K₂HPO₄ – 2,0 g
MgSO₄.7H₂O – 0,05 g
CaCO₃ – 0,02 g
FeSO₄.7H₂O – 0,01 g
Ágar – 15 g
Água destilada -1000 ml

AC – Caldo Amido Caseína

Mesma composição do ACA sem acrescentar o Ágar.

BDA – Ágar Batata Dextrose

Batata branca com casca – 140 g
Dextrose – 10 g
Ágar – 15 g
Água destilada – 1000 ml
Sulfato de estreptomicina – 0,12 g (dissolver em um pouco de água autoclavada e acrescentar no meio de cultura morno antes de verter nas placas).

V8-BDA

Suco V8 (Campbell's) – 150 ml
Ágar – 10 g
BDA comercial – 10 g
CaCO₃ – 3 g
Completar com água destilada – 850 ml

ISP2

Peptona – 5 g
Extrato de levedura – 3 g
Extrato de malte – 3 g
Dextrose – 10 g
Ágar – 20 g

Solução Sarruge

Solução estoque (1 L)	Retirar da solução estoque para 1 L de solução de uso (concentração 100%)
KH_2PO_4 – 136,1 g	1 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 246,4 g	2 ml
CaCl_2 – 111,1 g	5 ml
KCl – 74,6 g	5 ml
Fe EDA (1M) – 10 ml	1 ml
Solução de micronutrientes:	1 ml
H_3BO_3 – 2,86 g	
ZnCl – 0,1 g	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,04 g	
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 g	

*Completar o volume com água destilada autoclavada.

Solução de Nitrogênio

Solução estoque (1L): NH_4NO_3 – 20 g (diluir completamente e armazenar em frasco âmbar).

Solução de uso: retirar 7,14 ml da solução estoque e completar volume com água destilada autoclavada. (armazenar em frasco âmbar)

Tampão PBS

Solução 10x:

NaCl – 80g

KCl – 2g

Na_2HPO_4 – 14,4g

KH_2PO_4 – 2,4g

Água destilada - 1000 ml

Solução de uso:

Retirar 100 ml da solução 10x para 900 ml de água destilada, autoclavar para ter solução estéril.