

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

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR  
ACTINOMICETOS PARA O BIOCONTROLE DE  
*Bipolaris sorokiniana***

**Elisandra Minotto**

Bióloga – UFPel

Mestre em Fitossanidade/Fitopatologia - UFPel

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre, RS – Brasil

Março de 2014

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

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR  
ACTINOMICETOS PARA O BIOCONTROLE DE  
*Bipolaris sorokiniana***

Bióloga – UFPel  
Mestre em Fitossanidade/Fitopatologia - UFPel

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau  
de doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, RS – Brasil  
Março de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Minotto, Elisandra  
CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR  
ACTINOMICETOS PARA O BIOCONTROLE DE *Bipolaris*  
*sorokiniana* / Elisandra Minotto. -- 2014.  
177 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

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, 2014.

1. Controle biológico. 2. Metabólitos secundários.  
3. *Streptomyces*. 4. fitoptógenos. 5. *Bipolaris*  
*sorokiniana*. I. Van Der Sand, Sueli Teresinha ,  
orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Sueli T. Van Der Sand pela orientação, pela paciência e por acreditar na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e em especial a professora Marisa da Costa.

Às colegas, amigas e alunas de iniciação científica do laboratório de Micologia Ambiental: Luciana, Kimberly, Verônica e Ana Elisa pelo convívio e por participarem ativamente no desenvolvimento deste projeto.

À todos os colegas de laboratório que conviveram comigo durante esse período, em especial à Michelle Mann, Cristina Spadari, Marcela Proença, pela amizade, companheirismo e incentivo.

Ao Colega Diego Defferrari do Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular pela disponibilidade, auxílio e pelos esclarecimentos químicos.

Às colegas e amigas Francielle Bucker, Thaisa Feltrin e Martha Trindade pelo auxílio no desenvolvimento prático deste projeto, e principalmente pelo apoio técnico e psicológico a mim dedicados nesta jornada.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial a Sayonara Peixoto Rosa.

Aos meus pais, Leonilda Terezinha Minotto e Valdir Minotto, e irmão, Eleandro pelo grande incentivo, pelo carinho e dedicação.

Ao meu noivo, Conrado de Oliveira Gamba, pelo seu amor, incentivo, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

À CAPES pelo auxílio financeiro ao longo destes quatro anos.

# CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR ACTINOMICETOS PARA O BIOCONTROLE DE *Bipolaris sorokiniana*

Autor: Elisandra Minotto<sup>1</sup>

Orientador: Sueli Teresinha Van Der Sand

## RESUMO

As actinobactérias endofíticas estão presentes nos tecidos das plantas e, por meio da produção de metabólitos ativos, às protegem e auxiliam em condições de estresse. Esses microrganismos tem sido amplamente estudados no controle de doenças fitopatogênicas, como a mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana*. Este fungo é o agente causal da podridão comum da raiz, manchas foliares, morte de plântulas e ponto preto das sementes de trigo e cevada, causando redução significativa na produtividade. Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram avaliar a virulência de isolados de *B. sorokiniana* e a atividade antifúngica de actinobactérias contra este fitopatógeno. Os antagonistas com elevada atividade contra o fitopatógeno foram caracterizados quanto à produção enzimática, fisiologia, condições de crescimento e produção de metabólitos, bem como sequenciamento do 16S rRNA para identificação dos antagonistas. A caracterização parcial dos metabólitos foi realizada por meio de sistemas de Cromatografia de Camada delgada (CCD) contendo diferentes solventes. Os resultados mostraram que os isolados de *B. sorokiniana* apresentaram elevada virulência às plântulas e sementes de trigo, sendo que a maior agressividade foi relatada à semente. Por outro lado, 69,6% das actinobactérias apresentaram elevada atividade antifúngica contra isolados de *B. sorokiniana* em meio sólido, e 17% a mantiveram em cultura submersa. A maior produção ocorreu a 30°C após 72h de incubação, para a maioria dos isolados. A detecção da produção de catalase, amilase, pectinase, lipase e esterase foi observada para a maioria das actinobactérias (100, 95,6, 91,30, 95,6, 100%, respectivamente). Enquanto que a degradação de caseína, carboximetilcelulose e gelatina foi realizada por 60,8, 34,78 e 47,82% dos isolados, respectivamente. Os isolados 6(2), 6(4), 16(3) e R18(6), selecionados devido à elevada atividade antifúngica e enzimática, apresentaram reação positiva para produção de compostos voláteis, quitinase e glucanase, sideróforos, fixação de nitrogênio, AIA e colonização de raízes. Somente isolado R18(6) não apresentou capacidade de solubilizar fosfatos. A caracterização molecular determinou que estes isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*. Os metabólitos produzidos pelo isolado R18(6) foram mais estáveis a mudanças de temperatura e pH, bem como para a ação das proteases e EDTA, quando comparado aos demais. Os solventes acetato de etila e hexano foram mais eficientes na extração de metabólitos do extrato bruto, porém a melhor separação de metabólitos em CCD foi obtida com misturas de solventes.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (177p.). Março de 2014

# CHARACTERIZATION OF COMPOUNDS PRODUCED BY ACTINOMYCETES TO BIOLOGICAL CONTROL OF *Bipolaris sorokiniana*<sup>2</sup>

Author: Elisandra Minotto  
Advisor: Sueli Teresinha Van Der Sand

## ABSTRACT

Endophytic actinobacterias are present in plant tissues and by means of active metabolites they protect and help them in stress conditions. These microorganisms have been widely used in the control of phytopathogenic diseases, such as the spot blotch caused by *Bipolaris sorokiniana*. This fungus is a causal agent of common root rot, leaf spots, death of seedlings and black point of the seeds of wheat and barley, causing significant reduction in productivity. In this context, the aim of this study was to evaluate the virulence of the *B. sorokiniana* isolates and the antifungal activity of actinobacterias against this phytopathogen. The antagonists with the higher activity against the phytopathogen were characterized taking in consideration their physiology, enzyme production, growth conditions and metabolites production and 16S rRNA sequencing for identification of the antagonists. Partial characterization (nós não purificamos) of the metabolites was performed using thin layer chromatography (TLC) systems containing different solvents. The results showed that the isolates of *B. sorokiniana* have a high virulence on wheat seed and seedlings, however the greater aggressiveness was observed to seed. On the other hand, 69.6% of actinomycetes showed high antifungal activity against of *B. sorokiniana* isolates on solid medium, and 17% maintained this behavior in submerged culture. The highest yield happened, for most isolates, when grown at 30°C with agitation after 72h of incubation. The detection of catalase, starch, pectin, lipase and esterase production was observed for most of the actinomycetes (100, 95.6, 91.30, 95.6, 100%, respectively). While the hydrolysis of casein, carboxymethylcellulase and gelatin was performed by 60.8, 34.78 and 47.82% of the isolates, respectively. Isolates 6(2), 6(4), 16(3) e R18(6), selected due to the high antifungal and enzyme activity, showed a positive reaction for the production of volatile compounds, chitinase and glucanase, siderophores, nitrogen fixation, AIA and colonization of the roots. Only the isolated R18(6) showed no ability to solubilize phosphates. Molecular characterization of the isolates determined that they belong to the genus *Streptomyces*. The metabolites produced by isolate R18 (6) were more stable to temperature and pH changes, as well to the action of proteases and EDTA, when compared to the others. The solvents ethyl acetate and hexane were more efficient for the extraction of the metabolites from the crude extract, however a better separation of the metabolites in the TLC was obtained with mixture of solvents.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (177p.) March, 2014.

## Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
1.1. Mancha marrom .....	9
1.2. Controle biológico .....	13
1.3. Actinobactérias .....	17
1.4. Actinobactérias endofíticas e rizosféricas .....	19
1.5. Compostos biologicamente ativos .....	23
1.6. Referências Bibliográficas.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3. RESULTADOS .....	34
CAPÍTULO 1 .....	35
VIRULENCE OF MONOSPORIC AND POLYSPORIC <i>Bipolaris sorokiniana</i> ISOLATES UNDER CONTROLLED CONDITIONS .....	35
1. Abstract .....	37
2. Introduction.....	37
3. Materials And Methods.....	39
3.1. Origin of microorganisms .....	39
3.2. Monosporic cultures .....	40
3.3. Fungal inoculum preparation.....	41
3.4. Virulence assay.....	41
3.5. Statistical analysis.....	42
4. Results.....	43
4.1. Analysis of the pathogenic action of monosporic and polysporic isolates .....	46
5. Discussion .....	50
6. Acknowledgements .....	53
7. References .....	53
CAPÍTULO 2 .....	57
ENZYME CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA FROM TOMATO PLANTS.....	57
Enzyme characterization of endophytic actinobacteria from tomato plants	58
Elisandra Minotto <sup>1</sup> ; Luciana Pasqualini Milagre <sup>1</sup> ; Martha Trindade Oliveira <sup>2</sup> ; Sueli Teresinha Van Der Sand <sup>1*</sup> .....	58
1. Abstract .....	58

2. Introduction.....	59
3. Materials and methods .....	61
3.1. Enzymatic activity characterization .....	61
3.1.1. Amylase production .....	61
3.1.2. Pectinase production .....	62
3.1.3. Cellulase production .....	62
3.1.4. Lipase and esterase production.....	62
3.1.5. Protease production (caseinase and gelatinase).....	63
3.1.6. Catalase production.....	63
3.2. Evaluation of enzymatic activity .....	63
4. Results.....	63
4.1. Enzymatic characterization .....	64
4.1.1. Amylolytic activity .....	64
4.1.2. Pectinolytic activity .....	65
4.1.3. Lipolytic activity.....	66
4.1.4. Esterase activity .....	66
4.1.5. Caseinase activity.....	67
4.1.6. Cellulase activity.....	69
4.1.7. Gelatinase and catalase activity .....	69
5. Discussion .....	69
6. Acknowledgements .....	76
7. References .....	76
CAPÍTULO 3 .....	83
IN VITRO BIOCONTROL POTENTIAL OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA AGAINST <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	83
1. Abstract .....	85
2. Introduction.....	86
3. Material and methods .....	87
3.1. Microorganisms.....	87
3.2. Antifungal activity .....	87
3.3. Production of antifungal compounds in submerged culture.....	88
3.4. Antifungal activity of the crude extract.....	89
3.5. Pairing of cultures and volatile compounds.....	89
3.6. Enymatic and physiological characterization.....	90



3.7.	Production of chitinase and $\beta$ -1,3-glucanase .....	90
3.9.	Production of siderophores .....	91
3.10.	Production of indole-3-acetic acid (IAA).....	91
3.11.	Nitrogen fixation.....	92
3.12.	In vitro colonization of wheat seedling roots by actinomycete isolates 92	
4.	Results.....	93
4.1.	Antifungal activity .....	93
4.2.	Production of antifungal compounds in submerged culture.....	94
4.3.	Antifungal activity of the crude extract.....	95
4.4.	Pairing of cultures and volatile compounds.....	97
4.5.	Chitinase and glucanase activities .....	99
4.6.	Physiological activity .....	100
4.7.	Production of indole-3-acetic acid .....	101
4.8.	Colonization of roots of wheat seedlings.....	101
5.	Discussion .....	102
6.	References .....	106
7.	Acknowledgments .....	112
	CAPÍTULO 4 .....	113
	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO EXTRATO BRUTO PRODUZIDO POR ISOLADOS DE <i>Streptomyces</i> SP. COM ATIVIDADE CONTRA <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	113
1.	Resumo .....	114
2.	Introdução.....	116
3.	Materiais e métodos .....	118
3.1.	Micro-organismos .....	118
3.3.	Estudo taxonômico .....	119
3.4.	Curva de produção de metabolitos bioativos .....	120
3.6.	Estabilidade dos extratos centrifugados frente a diferentes temperaturas.....	121
3.7.	Estabilidade dos extratos centrifugados frente ao pH.....	122
3.8.	Estabilidade dos extratos centrifugados frente a enzimas .....	122
3.9.	Estabilidade a diferentes concentrações de EDTA .....	123
3.10.	Análise estatística dos dados de estabilidade dos compostos antifúngicos.....	123

3.11.	Extração de metabólito do extrato centrifugado dos isolados.....	123
3.12.	Cromatografia em camada delgada e bioautografia .....	124
4.	Resultados.....	125
4.1.	Análise da sequência do rDNA 16S dos isolados de actinobactérias	125
4.2.	Estudo morfológico e bioquímico .....	128
4.3.	Curva de produção de metabólitos bioativos .....	131
4.4.	Estabilidade dos extratos centrifugados a temperatura .....	132
4.5.	Estabilidade dos extratos centrifugados frente ao pH.....	135
4.6.	Estabilidade dos extratos centrifugados frente à enzimas .....	136
4.7.	Estabilidade dos extratos centrifugados à diferentes concentrações de EDTA	137
4.8.	Extração de metabólito do extrato bruto de actinobactérias .....	138
4.9.	Cromatografia em camada delgada .....	139
5.	Discussão .....	141
6.	Referências Bibliográficas .....	146
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL.....	150
5.	CONCLUSÕES .....	160
6.	PERSPECTIVAS .....	162
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	163

## Relação de Tabelas

### Capítulo 1

**Table 0-1:** Origin of *Bipolaris. sorokiniana* isolates from different regions in Brazil and other countries. ....40

**Table-2:** Analysis of variance between the treatment groups monosporic and polysporic isolates and control, for the variables abnormal and non-germinated seeds, black point of seed, leaf spot/germinated seeds, and coleoptile lesion/germinated seeds. ....44

### Capítulo 2

Table 1 Enzymatic index from caseinase and cellulase activity of actinobacteria isolates assessed based on the degradation of milk casein and of carboxymethylcellulose, respectively, incubated at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. .... 68

### Capítulo 3

Table 1 Inhibition of *Bipolaris sorokiniana* isolates growth (%) by volatile compounds produced by actinomycetes. .... 99

Table 2 Physiological activity (phosphate solubilization, siderophore production, nitrogen fixation) of actinomycete isolates grown at different incubation temperatures. .... 101

### Capítulo 4

Tabela 1 Relação de oligonucleotídeos utilizados para caracterização molecular dos isolados de actinobactérias. Oligonucleotídeos a partir da sequência parcial do rRNA 16S de *Streptomyces* sp MTCC8377. .... 119

Tabela 2 Características fenotípicas e bioquímicas que diferenciam os isolados 6(2), 6(4) e R18(6) das espécies intimamente relacionadas. .... 129

Tabela 3 Estabilidade da Atividade antifúngica (AR%) de compostos presentes no extrato bruto de isolados de *Streptomyces* submetidos a tratamento térmico, em diferentes temperaturas e períodos de incubação. .... 134

Tabela 4 Estabilidade de compostos antifúngicos (AR%) presentes no extrato bruto de isolados de Streptomyces, após tratamento com enzimas proteolíticas por duas horas. ....	137
Tabela 5 Atividade antifúngica (mm) do extrato centrifugado de isolados de Streptomyces, após tratamento com diferentes concentrações de EDTA. Dados entre parênteses representam a atividade residual (AR%). ....	138
Tabela 6 Atividade antifúngica (mm) do extrato bruto de isolados de Streptomyces, após extração com diferentes solventes orgânicos. ....	139
Tabela 7 Fator de retenção (Rf) do extrato bruto e do extrato centrifugado de isolados de Streptomyces, após revelação por diferentes métodos. ....	140

## Relação de Figuras

### Capítulo 1

Figure 1 Ordination chart for *B. sorokiniana* isolates in terms of virulence variables constructed based on the principal components analysis and correlation as a measure of similarity between the variables. (A) seed to abnormal and non-germinated seeds (GA); (B) black point of seed (SR); (C) leaf spot/germinated seeds (LS); (D) coleoptile lesion/germinated seeds (CL). The percentage of variation in each axis and the variables that correlated with at least one of the two axes is indicated. C: Control, M: Monosporic isolate, P: Polysporic isolate..... 47

Figure 2 Ordination chart for *B. sorokiniana* isolates in terms of virulence variables constructed based on the principal components analysis and correlation as a measure of similarity between the variables seed to abnormal and non-germinated seeds (GA), black point of seed (SR), leaf spot/germinated seeds (LS), and coleoptile lesion/germinated seeds (CL). The identification codes of isolates with high and low values are shown in axes I and II. Isolates presenting intermediate values were not labeled, and are identified by dots. The ellipsis I indicates isolates with low virulence, ellipsis II signals highly pathogenic isolates affecting mainly seeds, and ellipsis III indicates highly pathogenic isolates affecting mainly aerial parts..... 49

### Capítulo 2

Figure 1 Amylolytic activity of actinomycete isolates assessed based on the degradation of soluble starch after incubation at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ )..... 64

Figure 2 Pectinolytic activity of actinobacteria isolates assessed based on the consumption of citric pectin incubated at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ). ..... 65

Figure 3 Lipolytic activity of actinobacterium isolates assessed based on the consumption of Tween 20 at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ )..... 66

Fig. 4 Activity of actinomycetes against esterase assessed based on the consumption of Tween 80 at 25°C, 28°C, and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ )..... 67

### Capítulo 3

- Fig. 1. Antifungal activity of 23 actinomycetes against 22 *Bipolaris sorokiniana* isolates from different Brazilian regions, in the double-layer method. Results are expressed as antibiosis index (AI)..... 93
- Fig. 2 Production of antifungal compounds with inhibitory activity (cm) by actinomycetes in submerged culture at different incubation times and temperatures. A: Isolate 6(2); B: Isolate 6(4); C: Isolate 16(3); D: Isolate R18(6). \*Statistically significant means in the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ). ..... 95
- Fig 1 Antifungal activity (cm) of the crude extract of 16 actinomycetes against five isolates of *B. sorokiniana* isolates, under different incubation temperatures. \*Statistically significant means in the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ).....94
- Fig. 4 Pairing of actinomycetes cultures [6(2), 6(4), 16(3) and R18(6)] with *Bipolaris sorokiniana* cultures (98004, 98012, 98032, 98040 and 98041), showing the formation of an inhibition area.....95
- Fig. 5 Activity of chitinase and glucanase produced by actinomycete isolates at different incubation temperatures. \* Statistically significant means in the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ )..... 100

### Capítulo 4

- Figura 1 Dendrograma filogenético baseado em sequências parciais (<1300pb) do gene 16S rDNA que mostram relações entre isolados de *Streptomyces* e espécies tipo de *Streptomyces*. A: Isolado 6(2); B: Isolado 6(4); C: Isolado R18(6). Números em nós indicam níveis de suporte de bootstrap (%) com base em uma análise de neighbor-joining de 1000. A barra de escala indica a posição de substituição por nucleotídeo 0,01..... 127
- Figura 2 Curva de atividade antifúngica (mm), biomassa seca (mg) e pH de isolados de actinobactérias submetidos a diferentes condições de incubação. Os isolados 6(2) e 6(4) foram incubados a 30°C e o R18(6) a 25°C por 168 h em caldo AC. A: isolado 6(2), B: isolado 6(4), C: isolado R18(6) e D: curva de pH. .... 132
- Figura 3 Estabilidade de compostos antifúngicos (AR%) presente no extrato bruto de isolados de *Streptomyces*, submetidos a diferentes pHs por duas horas a 25°C. .... 135
- Figura 4 Autobiografia da placa de CCD mostrando atividade antifúngica do extrato concentrado de isolados de *Streptomyces*. O sistema constituiu-se de placas de sílica gel 60 F254, como fase estacionária, e eluente água:metanol:ácido acético (5:4:1), como fase móvel. A: isolado 6(2); B: isolado 6(4) e C: isolado R18(6). Setas indicam atividade antifúngica. .... 141

## INTRODUÇÃO GERAL

O trigo (*Triticum aestivum* L.) foi uma das primeiras espécies domesticadas pelo homem e tem sido, desde então, fundamental na base alimentar da humanidade, ocupando o primeiro lugar em volume de produção mundial. De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014) a produção mundial de trigo atingiu um recorde de 708,5 milhões de toneladas na safra de 2013. A produção brasileira para a safra 2013/2014 deverá alcançar 5,798 milhões de toneladas (CONAB, 2014), sendo a região sul responsável por 90% dessa produção. De acordo com dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento o consumo anual nacional em 2013 foi de 11 milhões de toneladas (MAPA, 2014).

Na agricultura, existem muitos fatores que podem causar danos ou redução da produtividade. As doenças são responsáveis pelas perdas mais expressivas na cultura do trigo, dentre elas destaca-se, a mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana*. Esse patógeno é capaz de provocar perdas econômicas que podem atingir até 80% da produção, além de infectar sementes,

que servirão como fonte de inóculo para o estabelecimento de focos iniciais da doença em outros ciclos e localidades de produção (Reis & Casa, 2005).

No Brasil, a presença da mancha marrom é considerada elevada e de grande impacto econômico. Para evitar perdas causadas por este patógeno o controle recomendado é a utilização de cultivares resistentes e rotação de culturas, além da aplicação de fungicidas, tanto para o tratamento de sementes como para a doença já estabelecida na lavoura. A dificuldade em controlar a mancha marrom é maximizada pela ampla distribuição do patógeno, grande diversidade genética e a associação com diversas plantas hospedeiras. Estes fatores associados à necessidade de se desenvolver alternativas menos agressivas ao ecossistema e economicamente viáveis para o produtor têm estimulado o desenvolvimento de novos métodos de controle, entre os quais está o controle biológico.

O biocontrole, pela aplicação de microrganismos benéficos ou do produto de seu metabolismo, tem sido apontado como uma alternativa importante e tecnicamente justificável, pois tem por finalidade de manter o equilíbrio do agroecossistema, fazendo com que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos (Grigoletti Júnior et al., 2005).

Na busca por novos produtos, os actinomicetos, principalmente o gênero *Streptomyces*, têm sido apontados com grande entusiasmo nas descobertas de novos agentes antifúngicos com potencial para emprego na agricultura. Essas bactérias são prolíficas produtoras de metabólitos secundários bioativos podendo ser utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos.



Levando em consideração os potenciais dessas bactérias como agentes de controle biológico para emprego na agricultura, este trabalho teve como principais objetivos: i) avaliar a severidade de isolados de *B. sorokiniana*, oriundos de diferentes regiões do Brasil e de outros países, à plântulas e sementes de trigo; ii) avaliar a atividade antifúngica de compostos ativos produzidos por actinobactérias contra isolados de *B. sorokiniana*, oriundos de diferentes regiões do Brasil; iii) caracterizar enzimática e fisiologicamente os isolados de actinobactérias com maior potencial antifúngico; iv) purificar e caracterizar parcialmente as substâncias bioativas produzidas pelas actinobactérias com potencial para uso no controle de *B. sorokiniana*.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O trigo tem sido fundamental na base alimentar da humanidade, ocupando o primeiro lugar em volume de produção mundial. Acredita-se que esta cultura seja originária de gramíneas silvestres, que se desenvolveram nas proximidades dos rios Tigre e Eufrates (Ásia), por volta dos anos 10.000 a 15.000 AC. Contudo, os primeiros registros encontrados datam de 550 AC, o que leva a concluir que já é cultivado a mais de 2000 anos (Brum & Heck, 2005).

No Brasil, o trigo foi introduzido pelos imigrantes portugueses em 1634, na Capitania de São Vicente, de onde foi difundido por todo o país (Osório, 1992). O crescimento do trigo no Brasil apresentou muitas dificuldades de adaptação devido à elevada acidez do solo e ao elevado índice de doenças fúngicas, como a ferrugem que destruiu os trigais. No Rio Grande do Sul o trigo foi introduzido em 1737, mas o aumento da produção ocorreu somente no século XIX, com a chegada dos imigrantes europeus que detinham o conhecimento de técnicas de cultivo (Osório, 1992).

O trigo é uma planta herbácea, monocotiledônea, fasciculada com a parte aérea formada por um conjunto de colmos, sua inflorescência é terminal

do tipo espiga e o fruto é do tipo cariopse (Osório, 1992). Botanicamente o trigo pertence ao gênero *Triticum* e a família Poaceae. Este gênero apresenta um grande número de espécies, sendo que a espécie *Triticum aestivum* L., trigo de panificação, é hoje a espécie mais cultivada, da qual são conhecidas mais de 20 mil variedades. Seu genoma é resultante da hibridização natural de três espécies diferentes, o que confere excepcional capacidade de adaptação às variadas condições ecológicas (Cunha et al., 1999).

Em nível mundial, o trigo é a cultura de grãos de maior produção anual. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2014) a produção mundial de trigo em 2013 foi de 708,5 milhões de toneladas, 7,4% a mais que o ano de 2012. Os maiores produtores são a União Europeia, China e Índia, juntos representam 50% da produção mundial.

No Brasil, o cultivo deste cereal é realizado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste sob os sistemas de irrigação ou de sequeiro (Embrapa Trigo, 2014). A produção nacional deste cereal para safra 2013/2014 está estimada em 5.470,9 mil toneladas, geradas por uma produtividade média de 2,631 Kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2014). Em nível regional, o Rio Grande do Sul registrou, nesta safra, uma produção 3,17 milhões de toneladas, representando 58% da safra nacional (CONAB, 2014). De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o consumo anual nacional em 2013 foi de 11 milhões de toneladas (MAPA, 2014).

O cultivo do trigo no Brasil está sujeito a limitações de ordem biótica e abiótica, tais como: condições climáticas adversas e solo, pragas e doenças.

As doenças causadas por fungos, bactérias e vírus ocupam posição de destaque entre os limitantes naturais desta cultura. Durante as últimas décadas, doenças provocadas por fungos foram causas de muitas frustrações e prejuízos para os agricultores. Dependendo do patógeno, cultivar e condições climáticas, as doenças fúngicas podem causar até 100% de perda na cultura do trigo (Mehta, 1993). Dentre os patógenos fúngicos, a espécie *Bipolaris sorokiniana* apresenta uma séria ameaça, pois pode causar perdas de até 80% na cultura do trigo (Reis & Casa, 2005, Tanaka et al., 2008).

### 1.1. Mancha marrom

Dentre as doenças fúngicas que acometem a cultura do trigo, destacam-se aquelas que incidem sobre a parte aérea e são causadas por fungos biotróficos como oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) e a ferrugem da folha (*Puccinia triticina*), e por fungos hemibiotróficos, como a mancha-marrom (*Bipolaris sorokiniana*) e a mancha-bronzeada (*Pyrenophora tritici-repentis*) (Funck et al., 2009). Estas últimas doenças são seguidamente referidas como manchas foliares (Bedendo, 1995).

O fungo *Bipolaris sorokiniana* é o agente causal da podridão comum da raiz, mancha marrom, morte de plântulas e ponto preto das sementes de trigo e cevada. Podendo, ainda, causar doença em centeio, aveia, triticale, sorgo e festuca (Tinline, 1988). O fungo apresenta os sintomas mais graves da doença nas culturas de trigo e cevada cultivada em áreas quentes e úmidas.

Na forma assexuada ou imperfeita, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In Sorok.), pertence à classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem

Moniliales e a família Dematiaceae (Alexopoulos & Mims, 1985). A forma sexuada ou teleomórfica, *Cochiobolus sativus* (Ito & Kurib), pertence à classe dos Ascomycetes, ordem Pleosporales e a família Pleosporaceae (Menezes & Oliveira, 1993). A forma perfeita raramente ocorre na natureza, não tendo ainda sido relatada no Brasil (Reis et al., 1997). Esta foi encontrada apenas na Zâmbia em 1988 (Kumar et al. 2002).

Na planta, a mancha marrom ou helmintosporiose desenvolve-se sobre folhas, bainhas, nós (lesões castanhas) e, às vezes, nos entrenós. Os sintomas manifestam-se, primeiramente, nas plântulas originadas a partir de sementes infectadas. O fungo cresce a partir da semente e coloniza o coleóptilo, no qual aparecem lesões castanhas escuras (Mehta, 1978). As lesões apresentam-se tipicamente ovaladas a oblongas, com bordos bem definidos, com 1-2 cm de comprimento e coloração marrom-escura a negra, podendo ser observadas também nas folhas, bainhas e colmos (Mehta, 1978). Essas manchas aumentam de tamanho e tornam-se tipicamente elípticas com abundante esporulação e margens cloróticas (Fetch & Steffenson 1994). Quando as lesões coalescem, a folha toda fica crestada e seca prematuramente (Mehta, 1978).

Nas sementes infectadas, originadas a partir de espigas doentes, observa-se a ponta da semente negra e muitas vezes sementes com aspecto enrugado (Luz, 1982a). Lesões castanho-escuros ocorrem, nos nós e, às vezes, entre-nós, podendo ocorrer estrangulamento, com conseqüente quebra e morte da planta (Mehta, 1978; Picinini & Fernandes, 1995). O fungo pode infectar também raízes, interferindo nos processos de absorção de água e nutrientes,

doença conhecida como podridão comum da raiz (Reis & Casa, 1998). A mancha marrom é considerada uma doença de grande impacto econômico, com elevada incidência e transmissão a partir de sementes podendo variar de 60 a 90% de perdas (CABI, 2000).

*B. sorokiniana* é um agente patogênico hemibiotrófico, ou seja, exerce uma fase biotrófica e uma fase subsequente necrotrófica. As fases de crescimento sucessivas são caracterizadas por: (i) penetração na cutícula e na parede celular, seguido pelo desenvolvimento de hifas no interior das células epidérmicas do hospedeiro (fase biotrófica), e (ii) invasão de hifas na camada mesofílica, seguido da epiderme e morte celular mesofílica (fase necrotrófica) (Kumar et al. 2002). Em casos raros, o patógeno penetra através dos estômatos. O colapso das células é provocado pela secreção de toxinas, pois as células morrem sem contato direto com hifas fúngicas, devido à infiltração de toxina nas folhas que provoca respostas necróticas indistinguíveis ao hospedeiro (Kumar et al. 2001).

Durante o processo de infecção o patógeno utiliza mecanismos físicos, através da formação de apressório, e químicos, com a produção de vários metabólitos tóxicos, identificados como sesquiterpenos. Estabeleceu-se que estes metabólitos tem importante papel na patogênese (Aggarwal et al. 2011; Agrawal et al. 2008; Jahani et al. 2012) e que as BS-toxinas são um fator determinante de virulência (Jahani et al. 2012). A necrose gerada no hospedeiro é consequência da secreção de toxinas liberadas pelo patógeno, que são sintetizadas a partir do farnesol (Kumar et al. 2001; Kumar et al. 2002) A toxina conhecida como prehelmentosporol é responsável pela inibição da ATPase

(Kumar et al. 2002). Outra toxina importante no processo de infecção é chamada de helmintosporol que afeta a permeabilidade da membrana, a fosforilação oxidativa e o bombeamento de prótons através da membrana plasmática. Nakajima et al. (1994), isolaram um composto chamado de sorokianina, capaz de inibir a germinação de sementes de aveia.

O fungo pode sobreviver na forma vegetativa em sementes infetadas, plantas voluntárias e saprofiticamente, em restos culturais de seus hospedeiros. Os principais agentes de disseminação são: sementes, ventos e respingos de chuvas, sendo os restos culturais as fontes de inóculo mais abundantes (Mehta, 1978; Sjöberg et al. 2007). Segundo observações feitas por Meronux & Pepper (1968), as células internas de alguns conídios de *B. sorokiniana* que caem no solo se transformam em clamidósporos, fato este que permite a sobrevivência do patógeno no solo, mesmo na ausência de hospedeiro e por um longo período de tempo.

Os principais métodos de controle recomendados para doenças causadas por *B. sorokiniana* são a rotação de cultura, eliminação de restos culturais, uso de cultivares resistentes e aplicação de fungicidas (Mehta, 1978, Reis & Casa, 2005). Inicialmente, o uso de cultivares resistentes apresentou-se como o método mais barato, o mais fácil e o mais seguro de controle de doenças, apresentando inclusive aumento de produtividade. No entanto, com o passar dos anos, novas raças e variantes do fungo surgiram, induzindo a quebrando a resistência e reduzindo a produtividade (Cunha & Trombini, 1999).

O controle de doenças fitopatogênicas é, em geral, realizada através da aplicação de fungicidas, os quais são bastante utilizados pelos agricultores

devido à sua facilidade de aplicação, aos resultados previsíveis e imediatos e à necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para a aplicação (Morandi & Bettioli, 2009).

Por outro lado, a crescente preocupação da sociedade com o impacto deste produtos utilizados na agricultura e seus efeitos sobre a cadeia alimentar, tem gerado intensos debates sobre o rumo da agricultura mundial e o uso de agrotóxicos. Esse cenário, tem levado muitos consumidores a buscar de mercados de alimentos livres de resíduos deixados pela aplicação de agrotóxicos. Dentre as alternativas mais discutidas, para a redução do uso dos produtos químicos na agricultura, está o controle biológico.

## **1.2. Controle biológico**

A utilização de microrganismos benéficos com o objetivo de aumentar a produtividade e controlar doenças de plantas é registrada de longa data. Os primeiros trabalhos envolvendo a introdução massiva de microrganismos antagonistas visando o biocontrole de doenças de plantas aconteceram no início do século XX. A partir desta data até o período atual, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de controlar doenças, causadas por fitobactérias, fungos patogênicos, nematóides e vírus, em diferentes culturas (Romeiro, 2005).

O controle biológico, apesar de pouco utilizado especialmente em grandes culturas, é amplamente empregado na produção de alimentos orgânicos para o controle de pragas e doenças e tem apresentado excelentes resultados. No entanto, segundo Atkinson & McKinlay, (1995) é necessário um amplo



conhecimento da ecologia dos sistemas para o sucesso do biocontrole. Bettiol & Ghini (2003), afirmam que o desenvolvimento da proteção de plantas em sistemas sustentáveis de cultivo, requer estudos sobre a estrutura e o funcionamento dos agroecossistemas, com atenção especial às condições nutricionais e a biota do solo, a biodiversidade funcional, e a outros fatores que permitam um adequado manejo dos sistemas produzidos.

Segundo Baker & Cook (1974) o controle biológico em relação a patógenos de plantas é dado pela redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, através de um ou mais organismos que não o homem. Os organismos que estão envolvidos no controle de doenças atuam por diferentes mecanismos para controle de doenças fitopatogênicas.

Pesquisas neste sentido estão sendo realizadas, e os resultados mostram que os microrganismos agem sobre os patógenos por mecanismos como antibiose, indução de resistência, competição, parasitismo, hipovirulência e predação (Hoffland et al., 1997; Melo 1998; Luz, 2002; Kilic-Erici & Yuen, 2004; Monaco et al., 2004, Wan et al., 2008).

As bactérias biocontroladoras estão entre os microrganismos com grande potencial para o controle de doenças de plantas, pois residem no rizosfera (Melo & Valarini, 1995, Amorim & Melo, 2002, Guo et al., 2004). Estes biocontroladores têm habilidade de suprimir patógenos do solo, ocorrem naturalmente e em elevadas populações na rizosfera, crescem em uma ampla faixa de condições ambientais e produzem uma ampla variedade de antibióticos, sideróforos e reguladores de crescimento (Melo, 1998).

Bactérias com potencial para o controle são capazes de controlar patógenos que causam manchas foliares, murchas, podridões de raízes, tombamento e destruição dos órgãos de reservas em diferentes culturas (Paulitz & Belanger, 2001; Tan, et al., 2006,). Conforme Erci & Yuen (2004), as bactérias testadas para o controle do patógeno *Bipolaris sorokiniana* inibiram o crescimento micelial e a germinação dos esporos, *in vitro* e, quando colocadas a campo foram capazes de diminuir a severidade da doença. Carissími et al. (2009) relataram que 5,74% das bactérias isoladas de sementes de trigo foram eficientes na produção de metabólitos que inibiram o crescimento *in vitro* de *B. sorokiniana*, todas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Sementes tratadas com bactérias biocontroladoras e infectadas por fungos como, *B. sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *Fusarium graminearum* e *Stagonospora nodorum* apresentaram baixa ou nenhuma incidência destes patógenos, proporcionando resultados semelhantes às sementes tratadas com fungicidas (Luz, 2001).

Várias pesquisas têm mostrado que actinomicetos são promissores agentes de biocontrole de doenças plantas. A eficácia destes organismos no biocontrole não se resume apenas à produção de metabólitos secundários, mas também a capacidade de colonizar tecidos vegetais, produzir enzimas que degradam a parede celular de fungos e exoesqueleto de insetos (Emmert & Handelsman 1999; Siddiqui & Mahmood, 1999; Doumbou et al. 2001; Paulitz & Belanger 2001; Whipps 2001; Weller et al. 2002).

As principais características desejáveis para um biocontrolador é que ele tenha capacidade de sobreviver em condições adversas, seja eficiente contra uma vasta gama de patógenos em várias plantas hospedeiras, preparado em

fórmulas de fácil armazenamento, tolerante a agrotóxicos e tratamentos físicos. Dentre as bactérias utilizadas para o biocontrole de doenças os isolados de *Bacillus*, *Pseudomonas* e alguns gêneros de actinomicetos são os mais citados e os que apresentam o maior número de características desejáveis (Bettioli, 1991).

As populações de actinomicetos são importantes componentes da comunidade microbiana, endofítica e rizosférica, de muitas plantas superiores. Estes estão sendo avaliados como agentes de controle biológico, principalmente por sua capacidade de interagir com as plantas ou mesmo com outras populações microbianas, mediante a produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (Moura & Romeiro, 1998; Gava et al., 2002; Cao et al., 2004).

Segundo Tan et al. (2006) as actinobactérias podem colonizar o interior da planta hospedeira, evitando concorrência com quaisquer outros microrganismos do solo. A proteção às raízes por actinomicetos deve-se à inibição do desenvolvimento de fungos potencialmente patogênicos através da produção de enzimas que degradam a parede celular de fungos ou produção de compostos antifúngicos (Goodfellow & Williams, 1983; Cao et al., 2004).

Os actinomicetos podem promover o crescimento das plantas pela produção de ácido 3-indol acético (AIA) para ajudar o crescimento de raízes ou produzir sideróforos para melhorar a absorção de nutrientes (Merckx et al., 1987). De acordo como Coombs et al., (2004) *Streptomyces* endofíticos podem melhorar a produção agrícola e reduzir o impacto da podridão de raiz e coroa em trigo.

### 1.3. Actinobactérias

As actinobactérias são um dos maiores Filos no domínio Bactéria, inferido a partir do seu padrão de ramificação filogenético do gene 16S rRNA (Garrity e Holt, 2001; Ludwig e Klenk, 2005). A separação do Filo, de outros táxons do Domínio Bactéria, é suportada por inserções/deleções em algumas proteínas, pela presença de uma grande inserção no 23S rRNA (Gao & Gupta, 2005; Gao et al., 2006) e por distintos arranjos de genes (Kunisawa, 2007).

O Filo Actinobacterias é constituído de bactérias Gram-positivas, aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias. A maioria destes microrganismos são quimio-organotróficos, os quais crescem em pH neutro, mas alguns são acidófilos ou alcalófitos. Outros, ainda, são halófilos e alguns são termófilos (Goodfellow, 2012). Caracterizadas pela formação de micélio no substrato e micélio aéreo em meios sólidos, apresentam elevado conteúdo guanina e citosina no seu genoma (50-70 mol %) (Goodfellow and Williams, 1983).

Os dados mais recentes sobre a classificação taxonômica do Filo Actinobacteria, apresentados no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2012, engloba cinco classes, 19 ordens, 50 famílias e 221 gêneros (Goodfellow, 2012), sendo *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, (Stackebrandt et al., 1997), *Coriobacteriia*, *Rubrobacteria* e *Thermoleophilia* as classes constituintes.

Os microrganismos da Classe Actinobacteria são amplamente distribuídas em habitats aquáticos e terrestres, incluindo habitats extremos, como sedimentos marinhos (Pathom-aree et al., 2006) e solos desérticos hiper-

áridos (Okoro et al., 2009). Eles estão comumente presentes no solo onde participam da decomposição da matéria orgânica e de moléculas recalcitrantes (Goodfellow e Simpson, 1983; Goodfellow e Williams, 1983). Outros são patógenos de plantas e animais, simbiontes, comensais ou habitantes do trato gastrointestinal (Goodfellow, 2010).

As actinobactérias contêm genomas circulares que transcrevem mais de 3300 genes (Bervanakis, 2008). A maioria destes genes codificam amplas sequências que são utilizadas durante uma complexa diferenciação morfológica e biossíntese de metabólitos secundários (Hopwood et al., 2000). Este filo inclui fenotipicamente diversos organismos com morfologia que variam de cocos a micélio altamente diferenciado.

A ordem *Actinomycetales* compreende 63 gêneros, constituindo aproximadamente 20-60% da população microbiana do solo (Ezziiyyane et al., 2004). Em geral, estão divididos em dois grupos, os “actinomicetos nocardioformes”, que apresentam micélio rudimentar seguido de fragmentação e o grupo “esporoactinomicetos” que exibem uma rede de micélio aéreo bem desenvolvido com esporos. Neste último grupo encontram-se os gêneros *Streptomyces*, *Actinoplanes* e *Microbispora*, entre outros (Araújo, 2001).

Estes microrganismos, especialmente os *Streptomyces*, destacam-se por apresentar um grande potencial na produção de compostos, como: antibióticos, antivirais e agentes anti-tumorais (Berdy, 2005; Newman e Cragg, 2007; Olano et al., 2009). Além dos compostos antimicrobianos de uso clínico, farmacológico, veterinário e agroquímico (Lechevalier, 1988; Sanglier, 1993), outros metabólitos secundários como enzimas, imunomoduladores e inibidores

de enzimas são produzidos por essas bactérias (Araújo, 1998). As actinobactérias filamentosas produzem cerca de 45% de todos os metabólitos secundários bioativos microbianos, sendo que aproximadamente 80% dos 7600 compostos são produzidos por estreptomicetos (Berdy, 2005). Apesar dessa incrível diversidade metabólica, estima-se que apenas cerca de 10% do número total de produtos naturais que podem ser sintetizados por estes organismos foram descobertos (Watve et al., 2001; Demain & Sanchez 2009).

#### **1.4. Actinobactérias endofíticas e rizosféricas**

Algumas actinobactérias são capazes de formar associações com plantas e colonizar seus tecidos internos. Isso se deve principalmente à sua capacidade de consumir diversas fontes de carbono orgânico, colonizar a rizosfera de plantas e produzir compostos ativos antagônicos a outro microrganismos ou substâncias promotoras do crescimento de plantas (Suzuki et al., 2000; Ilic et al., 2007).

Microrganismos endofíticos são definidos como: fungos ou bactérias, que durante todo ou parte do seu ciclo de vida, invadem os tecidos de plantas vivas e causam infecções não-aparentes e assintomática no interior tecidos vegetais, mas não causam sintomas de doença (Wilson, 1995).

Um importante nicho que tem sido explorado como fonte de novos actinomicetos são os tecidos de plantas superiores. Por definição estes microrganismos não causam aparentemente danos aos seus hospedeiros (Bacon et al., 2000; Strobel & Daisy, 2003; Tan & Zou, 2000), e representam provavelmente o arranjo biológico mais simples, em que a planta fornece

nutrientes para o microrganismo e este oferece alguma forma de proteção para a planta (Bacon et al., 2000; Strobel & Daisy, 2003; Tan & Zou, 2000).

Estes microrganismos podem viver em diferentes órgãos das plantas hospedeiras, principalmente nos espaços inter e intracelular (Qin et al. 2011). As raízes das plantas constituem um importante órgão de absorção de água e nutrientes, mas também liberam uma vasta gama de compostos carbonados de baixa massa molecular, os metabólitos secundários. A constante exsudação destes compostos das células radiculares, como aglutininas, lectinas, flavonóides e polissacarídeos são responsáveis pelo reconhecimento microrganismo-planta (Aguillar et al., 1988; Kijne et al., 1988) e o efeito rizosférico que culmina na colonização radicular por microrganismos (Chet et al., 1990; Kortemaa et al., 1994).

O fluxo de carbono é essencial para o funcionamento e manutenção da dinâmica da comunidade microbiana dentro da rizosfera (Toal et al. 2000), que é distinta da comunidade não-rizosférica do solo (Whipps & Lynch, 1986; Frey-Klett et al., 2005). De acordo com Kennedy & Smith (1995) a rizosfera é um ambiente física, química e biologicamente distinto do restante do solo, com elevada diversidade e atividade microbiana. Este ambiente constituído pela interface solo-raiz constitui um microcosmos dinâmico, onde os microrganismos, as raízes das plantas e os constituintes do solo interagem constantemente (Lynch 1990; Azcón-Aguilar & Barea, 1992; Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999).

Actinobactérias endofíticas tem sido relatadas habitando a rizosfera e os tecidos internos uma ampla variedade de plantas, incluindo tomateiro

(*Solanum lycopersicum* L.) (Germida et al., 1998), de batata (*Solanum tuberosum* L.) (Sturz et al., 1999), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Coombs & Franco, 2003; Siciliano et al., 1998), milho doce (*Zea mays* L.) (McInroy & Kloepper, 1995; Azevedo), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (McInroy & Kloepper, 1995), colza (*Brassica napus* L.) (Germida et al., 1998), arroz selvagem (*Oryza officinalis* L.) (Garbeva et al., 2001), e plantas cítricas (Araujo et al., 2001; Araujo et al., 2002).

De acordo com a literatura os actinomicetos frequentemente encontrados nos tecidos vegetais são *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora*, e *Nocardioides* (Castillo et al., 2002; Conn & Franco, 2004; Cao et al. 2004, 2005).

Algumas associações entre actinobactérias e plantas são bem caracterizadas, dentro da ordem Actinomycetales, onde há exemplos de espécies fitopatogênicas, simbióticas e endofíticas. De acordo com Tarkka & Hampp (2008), entre as centenas de espécies de *Streptomyces* descritas, poucas espécies são consideradas patogênicas a plantas. Estas espécies, *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. ipomoeae*, são agentes da sarna comum em batata e em outras culturas relacionadas (Loria et al., 1997). A patogenicidade está associada com a presença de uma ilha de patogenicidade (PAI) conservada e transmissível nos seus genomas (Bukhalid & Loria, 1997, Healy et al., 2000). Esta PAI codifica para a biossíntese de uma fitotoxina, a taxtomina, além de conter fatores de virulência, como o gene nec1 (Bukhalid et al., 1998; Loria et al. 1995).



No primeiro relato de isolamento e identificação de actinobactérias endofítica a partir de plantas trigo saudáveis no sul da Austrália (Coombs & Franco 2003) identificaram através do rDNA 16S e sequenciamento 49 isolados pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Nocardioides* spp. Os autores observaram ainda que, nenhum desses isolados, incluindo as cepas de *S. caviscabies* e *S. setonii*, apresentaram genes associados à patogenicidade (*nec1*) ou a produção da toxina taxtomina, indicando que eram não patogênicos (Coombs & Franco 2003).

Por outro lado, muitos *Streptomyces* endofíticos podem melhorar o rendimento das culturas por meio da proteção de seu hospedeiro contra patógenos. Estes microrganismos são conhecidos por sua capacidade de promover o crescimento de plantas e raízes através da produção de ácido indole-3-acético (IAA), ou através da produção de sideróforos para captação de ferro do ambiente, além de melhorar absorção de nutrientes (Leong, 1986). Tokala et al. (2002) observaram que a colonização de nódulos radiculares de ervilha eleva significativamente a taxa de fixação de nitrogênio. Estes microrganismos são também conhecidos pela sua atuação nos processos de compostagem, devido à capacidade de produção de enzimas capazes de degradar moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilanase e lignina (Crawford, 1988).

Segundo Tarkka & Hampp (2008) a produção de metabólitos secundários em estreptomicetos permite uma melhor adaptação ecológica, sendo que a característica mais marcante dessas bactérias é a capacidade de

produzir simultaneamente várias substâncias (metabólitos secundários) com ação sinérgica ou cooperativa.

### **1.5. Compostos biologicamente ativos**

As actinobactérias têm sido especialmente úteis para a indústria farmacêutica devido à sua capacidade, aparentemente ilimitada, de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. Milhares destes compostos já foram isolados e caracterizados e um grande número transformado em produto comercial para o tratamento de uma ampla gama de doenças humanas, veterinárias e agrícolas.

Dentre 22500 compostos biologicamente ativos extraídos a partir de microrganismos, até o momento 45% são produzidos por Actinobactérias, 38% por fungos e 17% por bactérias (Bérdy 2005; Demain & Sanchez, 2009). Segundo Bérdy (2005). Os Actinomycetales filamentosos produzem mais de 10 000 compostos bioativos, sendo que 7600 são derivados de *Streptomyces* e 2500 de espécies de actinomicetos raros.

A definição usual de produtos naturais, no mais amplo sentido, enfatiza que "são compostos químicos isolados a partir de diversos seres vivos" (Bérdy, 2005). Estes compostos podem derivar do metabolismo primário ou secundário de organismos vivos. Segundo Bérdy, (2005) os metabólitos primários (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e graxos) são comuns a todos os sistemas biológicos. Os metabólitos secundários são, no entanto, compostos extremamente diversificados química e taxonomicamente, de baixa

massa molecular ( $MW < 3000$ ) e com função diversificadas, presentes em organismos distintos e com características específicas.

Os metabólitos secundários representam uma importante parcela dos compostos naturais produzidos pelos microrganismos e geralmente apresentam algum tipo de atividade biológica. As características mais marcantes destes compostos são a incrível variedade de estruturas químicas únicas, a frequente ocorrência e versatilidade de atividades biológicas (Demain & Fang, 2000).

Compostos secundários isolados de microrganismos e que exibem atividade antimicrobiana, antitumoral e/ou antiviral são chamados de antibióticos. No entanto, de acordo com Bérdy, (2005) esta definição deve ser ampliada a todos os metabólitos secundários microbianos que regulam processos de crescimento, replicação e/ou exibem de algum tipo de resposta (regulatória, inibitória, estimulante) para células procarióticas ou eucarióticas em nível bioquímico, a uma concentração mínima.

A produção de metabólitos secundários geralmente precede o desenvolvimento de hifas aéreas, quando a taxa de crescimento dos filamentos diminuiu e a esporulação inicia (Bibb, 2005). Muitos dos dados publicados indicam que o sinal ambiental mais importante para desencadear o metabolismo secundário é dado pela ausência de nutrientes, principalmente de fosfato (Sola-Landa et al., 2003). Estas substâncias são produzidas por grupos taxonômicos restritos de microrganismos e geralmente são constituídos por uma mistura intimamente relacionada de famílias de produtos químicos (Hampp, 2008). Em particular, a habilidade de produzir um grande número de substâncias, quimicamente diferentes, está associada aos procariotos, actinomicetos

filamentosos, mixobactérias, *Pseudomonas* e cianobactérias, e aos fungos filamentosos, eucariotos (Donadio et al., 2002).

A biossíntese dos metabólitos secundários é derivada de precursores e de energia gerada através de vias metabólicas primárias (August et al., 1999). Os grupos de metabólitos secundários comumente distribuídos na natureza são a poliquetideos, terpenos, esteróides, ácido chiquímico e alcalóides (Herbert, 1989). A diversidade de estruturas geradas é o resultado de modificações e combinações de reações primárias de vias metabólicas (Hampp, 2008).

Segundo Bérdy, (2005) os metabólitos secundários parecem ser desnecessários para os produtores, não tendo qualquer função aparente no seu ciclo de vida. No entanto, de acordo com alguns pesquisadores a produção destes compostos provê um número importante de funções, beneficiando os organismos que os produzem (McCann & Pogell, 1979, Demain, 1995a, El-Tarabily et al., 2010) . Primeiramente, atuam como agentes químicos na destruição de outros microrganismos e aumentam aptidão e sobrevivência dos organismos produtores no seu ambiente natural (Demain, 1995a). Alguns metabólitos secundários auxiliam no transporte de íons metálicos disponibilizando-os em uma forma solúvel para que possa ser prontamente utilizada pelos microrganismos (Neilands, 1995).

Os actinomicetos são a fonte mais atrativa de novos metabólitos bioativos. Nas últimas décadas, a descoberta de novos metabólitos aumentou, entretanto, apesar do grande esforço dos pesquisadores, a ocorrência de novas moléculas químicas diminuiu (Bérdy 2005; Valanarasu et al. 2010). Aliado a este fato, o surgimento de novas doenças infecciosas, a resistência dos patógenos a

compostos existentes e a toxicidade de alguns medicamentos atualmente utilizados na medicina e na agricultura, tem alavancado a busca por novas fontes de compostos biologicamente ativos, especialmente de actinobactérias (Nicolaou et al., 2002). Na busca de novos compostos químicos com atividade biológica as espécies ubíquas tem sido extensivamente examinadas e vários estudos tem sido direcionados ao isolamento de actinomicetos incomuns em ambientes inexplorados (Zgoda & Porter, 2001; Castillo et al. 2006; Gandhimathi et al. 2009; Goudjal & Toumatia 2013;).

Os novos desafios na terapia de doenças e na agricultura, permitiram a renovação dos métodos clássicos de rastreamento de compostos (Bérdy 2005). Estes produtos naturais bioativos são frequentemente uma mistura de um número de compostos com estruturas e polaridades semelhantes. A separação destes, geralmente, inclui dois passos: a extração e a purificação. No processo de extração, os estudos concentram-se principalmente na aplicação solventes orgânicos e na intensificação dos processos de extração por meios físicos (Ren et al. 2013). As tecnologias cromatográficas são frequentemente os métodos mais empregados para a purificação de produtos naturais. Sua eficiência na separação do composto alvo é altamente dependente da sua adsorção e afinidade pela fase estacionária (Ren et al., 2013).

A utilização de métodos modernos de detecção de compostos naturais, tais como a espectrometria de massa permite a detecção e identificação de quantidades muito pequenas de substratos ambientais seguidos de extração orgânica (Esquenazi et al., 2009). Outras técnicas baseadas no rastreamento de alto rendimento de bibliotecas químicas poderão ser utilizada no futuro para o

isolamento e identificação de compostos orgânicos em misturas, embebendo potenciais inibidores em cristais de um substrato alvo desejado, seguido de análise do complexo inibidor-substrato (Simmons et al., 2010), bem como outros inúmeros avanços nessa área (Davies 2011).

### 1.6. Referências Bibliográficas

AGGARWAL, R.; GUPTA, S.; SINGH, V. B.; SHARMA, S. Microbial detoxification of pathotoxin produced by spot blotch pathogen *Bipolaris sorokiniana* infecting wheat. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 66–73, 2011.

AGRAWAL, D. K.; SAIKIA, D.; TIWARI, R.; et al. Demethoxycurcumin and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. **Planta Medica**, v. 74, n. 15, p. 1828–1831, 2008.

AGUILLAR, J. M. M.; ASHBY, A. M.; RICHARDS, A. J.; LOAKE, G. J.; WATSON, M. D.; SHAW, C. H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* by phaseoli towards flavonoids inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, St. Paul., v. 1345, p.2741- 2746.1988.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. In: AllenMJ (Ed) *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant-fungal Process* (pp 163–198). Routledge, Chapman & Hall Inc., New York. 1992.

BEDENDO, I.C. Manchas foliares. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (org.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p. 848-858, 1995.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005. Japan Antibiotics Research Association.

BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

BOWEN, G.D.; ROVIRA, A.D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1–102, 1999.

BRUM, A.L.; HECK, C.R. A economia do trigo no Rio Grande do Sul: Breve histórico do cereal na economia do estado. **Análise**, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p. 29-44, 2005.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters Applied Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 425–430, 2004.

CASTILLO, U. F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; et al. Biologically Active Endophytic Streptomyces from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 1, p. 12–19, 2006.

CHET, I.; ORDENTLICH, A.; SHAPIRA, R.; OPPENHEIM, A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant and Soil**, n. 127, p. 85-92, 1990.

CHRISTENSEN, J.J. The influence of temperature on the frequency of mutation in *Helminthosporium sativum*. **Phytopathology**, v.1,p.155-162, 1929.

CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Identification of seedborne *Dreschlera* species. **Fresia**, v.10, p.553-573, 1973.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos. SAFRA 2013/14. V.1, n.5. fevereiro/2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_02\\_11\\_15\\_22\\_20\\_boletim\\_graos\\_fevereiro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_11_15_22_20_boletim_graos_fevereiro_2014.pdf)>. Acesso em: fev. 2014.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; DENARDIN, N. D. Á.; SOARES, V. N.; SCHÄFER, J. T.; LUDWIG, J. Influence of bean seed microbiolization on the transmission of *Colletotrichum Lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, 30(2), 156-163, 2008.

CUNHA, G.R. El Niño- Oscilação do Sul e perspectivas climáticas aplicadas no manejo de culturas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.7, n.2,p.277-284, 1999.

DAVIES, J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. **Current opinion in chemical biology**, v. 15, n. 1, p. 5–10, 2011.

DEMAIN, ARNOLD L.; FANG, AIQI. The natural functions of secondary metabolites. In: **History of Modern Biotechnology I**. Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 1-39.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009. Japan Antibiotics Research Association.

EL-TARABILY, K. A.; ST. J. HARDY, G. E.; SIVASITHAMPARAM, K. Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. **European Journal of Plant Pathology**, v. 128, n. 4, p. 527–539, 2010.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew, Surrey Commonwealth Mycological Institute, 608p. 1971

EMBRAPA TRIGO. Trigo. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/>> Acesso em: fev. 2014.

ESQUENAZI, E.; YANG, Y.-L.; WATROUS, J.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry of natural products. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 12, p. 1521-1534, 2009.

FETCH, T. G. J.; STEFFENSON, B. J. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 3, p. 202–206, 1994.

FORCELINI, C.A. **Incidência, transmissão e controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo** (Tese de Mestrado). Piracicaba, SP. ESALQ. 1992. 114 p.

FUNCK, G. R. D.; FERNANDES, J.M.; PIEROBOM, C. R. Doenças foliares, área verde sadia e peso de grãos em diferentes cultivares de trigo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 4, n. 1, p. 03-10, 2009.

GANDHIMATHI, R.; SEGHAL KIRAN, G.; HEMA, T. A; SELVIN, J., RAVIJI, T. R., SHANMUGHAPRIYA, S. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA10. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 32, n. 6, p. 825-835, 2009.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; SABAOU, N.; BARAKATE, M.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 1821-1829, 2013.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; DOS SANTOS, Á. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, n. 12, p. 155–165, 2005.

HANSON, H.; BORLAUG, N.E. & ANDERSON, R.G. **Trigo en el tercer mundo**. México, Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo, 1982. 166p.



JAHANI, M.; AGGARWAL, R.; DUREJA, P.; SRIVASTAVA, K. D. Toxin production by *Bipolaris sorokiniana* and its role in determining resistance in wheat genotypes. **Indian Phytopathology**, v. 59, 2012.

JORGENSEN, J. H.; SHEWRY, P. R. Sources and genetics of resistance to fungal pathogens. **Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**, p. 441-457, 1992.

KENNEDY, A.C. The rhizosphere and spermosphere In: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG & Zuberer DA (Eds) **Principles and Applications of Soil Microbiology** (pp 389–407). Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1998.

KIJINE, J. Leciting-enhanced acumulation of manganese limite Rhizobium leguminosarumcells on pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**. v.170, p. 2994-3000, 1988.

KORTEMAA, H.; RITA, H.; HAAHTELA, K.; SMOLANDER, A. Root-colonization abiliy of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*- **Plant and Soil**, Wagenigen, v. 163, p. 77-83. 1994.

KUMAR, J.; HÜCKELHOVEN, R.; BECKHOVE, U.; NAGARAJAN, S.; KOGEL, K.-H. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 127–133, 2001.

KUMAR, J.; SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTRUSCHAT, H.; STEIN, E.; KOGEL, K. H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p. 185–195, 2002.

LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**; v.79, p. 399-405, 2001.

LUZ, W.C. Mancha marrom In: OSÓRIO, E. A. **Trigo no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1982a. p.525-529.

LYNCH, J. M. Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. **In the rhizosphere**. Ed. John Wiley and Sons, New York. p. 1–10, 1990

NAKAJIMA, H.; ISOMI, K.; HAMASAKI, T.; ICHINOE, M. Sorokinianin: A novel phytotoxin produced by the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 51, p. 9597-9600, 1994.

NICOLAOU, K.C.; SAFINA, B.S.; FUNKE, C.; ZAK, M.; ZECRI, F.J. Stereocontrolled synthesis of the quinaldic acid macrocyclic system of thioestrepton. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 11, p. 1937-1940, 2002.

MAPA. **Produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2013/10/ministro-da-agricultura-diz-que-pais-precisa-aumentar-producao-de-trigo>> Acesso em: fev. 2014.

MEHTA, Y.R. **Doenças do trigo e seu controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978, 190 p.

MEHTA, Y. R. **Manejo integrado de enfermidades del trigo**. Santa Cruz de la Sierra: Imprenta Landivar, S. R. L., 1993. 314 p.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, M.A. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária 1993. 227p.

MERONUX, R.A.; PEPPER, E.H. Clhamidospore formation in conidia of *Helminthosporium sativum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.58, p.866-1968, 1968.

OSÓRIO, E.A. **Trigo no Brasil**. Fundação Cargill. Campinas. 1992. 620p.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C.; IGNACZAK, J.C.; AMBROSI, I. Impacto econômico do uso do fungicida propiconazole na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.). **Fitopatologia Brasileira**. v.21, n.3, p. 362-368. 1996.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.-H.; XU, L.-H.; LI, W.-J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457–73, 2011.

QIN, S.; LI, J.; CHEN, H.; ZHAO, G.; ZHU, W.; JIANG, C.; XU, L.; LI, W. J. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6176–6186, 2009.

REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Transmissão de *Bipolaris sorokiniana* de sementes para órgãos radiculares e aéreos do trigo. **Fitopatologia Brasileira** v.18, p.76-81. 1993.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doenças do trigo. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2, p.631-638, 2005.

REN, Q.; XING, H.; BAO, Z.; SU, B.; YANG, Q.; YANG, Y.; ZHANG, Z. Recent advances in separation of bioactive natural products. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 9, p. 937–952, 2013.

SIMMONS, K. J.; CHOPRA, I.; FISHWICK, C. W. G. Structure-based discovery of antibacterial drugs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 501-510, 2010.

SJÖBERG, J.; MÅRTENSSON, A.; PERSSON, P. Are field populations of arbuscular mycorrhizal fungi able to suppress the transmission of seed-borne *Bipolaris sorokiniana* to aerial plant parts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, n. 1, p. 45–55, 2007.

TAN, H. M.; CAO, L. X.; HE, Z. F.; Su, G. J.; Lin, B.; Zhou, S. N. Isolation of Endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in Vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1275–1280, 2006.

TARKKA, M.; HAMPP, R. Secondary Metabolites of Soil Streptomyces in Biotic Interactions. In: P. Karlovsky (Ed.); **Secondary Metabolites in Soil Ecology SE - 6**. v. 14, p.107–126, 2008a.

TARKKA, M.; HAMPP, R. Secondary metabolites of soil Streptomyces in Biotic Interactions. **Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology**, p. 107, 2008b.

TINLINE, R.D. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. In: Ingram, D.S. & Williams, P.H. (Ed.) Advances in Plant Pathology. Genetics of Plant Pathogenic Fungi. California. **Advances in Plant Pathology**, v. 6, pp. 113-12, 1988.

TOLEDO, J., ROCA, R. H.; ESCÓBAR, R. E. Transmisión, persistencia y control químico de *Bipolaris sorokiniana* causante de la punta negra del grano en trigo. In: **CIAT. Informe Técnico. Proyecto de Investigación Trigo**. Santa Cruz de La Sierra, Bolivia. p.87-106, 1996.

VALANARASU, M.; KANNAN, P.; EZHILVENDAN, S.; GANESAN, G.; IGNACIMUTHU, S.; AGASTIAN, P. Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 20, n. 4, p. 290–297, 2010.

ZANATTA, Z. G. C. N. **Potencial de bactérias para biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. 2004. 67f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ZGODA, J. R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 221-225, 2001.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e os métodos específicos para cada um dos experimentos desenvolvidos neste trabalho estão descritos nos respectivos artigos, apresentados nos capítulos 1, 2, 3 e 4 que seguem desta Tese (RESULTADOS).

Este estudo foi realizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul no Laboratório de Micologia Ambiental (Lab. 209) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **3. RESULTADOS**

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os subtítulos deste capítulo correspondem aos títulos do artigo publicado e do artigo formatado de acordo com as normas do periódico escolhido para submissão.

## **CAPÍTULO 1**

### **VIRULENCE OF MONOSPORIC AND POLYSPORIC *BIPOLARIS* *SOROKINIANA* ISOLATES UNDER CONTROLLED CONDITIONS<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico African Journal of Microbiology Research

**Virulence of monosporic and polysporic *Bipolaris sorokiniana* isolates  
under controlled conditions**

**Elisandra Minotto<sup>at</sup>, Michele Bertoni Mann<sup>at</sup>, Eduardo Vélez-Martin<sup>b</sup>, Thaisa Feltrin<sup>a</sup>, Luciana Pasqualini Milagre<sup>a</sup>, Cristina Spadari<sup>a</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> *Post-graduation Program in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil and* <sup>b</sup> *Department of Ecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil.*

\*Corresponding author: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

† These two authors have contributed equally to this paper

## 1. ABSTRACT

*Bipolaris sorokiniana* may present considerable genetic diversity and highly variable virulence and virulence. The virulence of 99 *B. sorokiniana* isolates (27 polysporic and 72 monosporic isolates) from Brazil and other countries was assessed. The variables evaluated were abnormal and non-germinated seeds, seed rot, leaf spot, and coleoptile lesion. The Principal Component Analysis (PCA) was used to evaluate the similarity patterns between isolates considering the variables of virulence. Polysporic isolates presented higher virulence (over 60%), when compared with the monosporic isolates (43%) in all variables analyzed, except coleoptile injury. Of the isolates used to infect seeds, 8% presented the highest virulence value, with pathogenic action over 75% in all variables assessed. The correlation of *B. sorokiniana* isolates with virulence variables demonstrated that polysporic isolates were more virulent, especially in seeds, compared with aerial plant parts.

**Key words:** Virulence, *Triticum aestivum* L., spot blotch

## 2. INTRODUCTION

Wheat (*Triticum aestivum* L.) was one of the first plant species grown by man. Throughout history the species has had fundamental importance in mankind's food basis, and today it takes the first place in worldwide agricultural production figures (EMBRAPA, 2013). According to data published by the United Nations Food and Agriculture Organization, global wheat production is estimated to reach a record number of 708,5 million ton in the 2013 harvest (FAO, 2014). In Brazil,



wheat production is around 5,000 to 6,000 ton. The largest cultivated areas, accounting for 90% of the country's production, are in southern (states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná) and midwest Brazil (States of Mato Grosso do Sul, Goiás and Distrito Federal) (EMBRAPA, 2013).

As an agricultural product, wheat is subject to biotic and abiotic limitations, such as adverse climatic and soil conditions, pests and diseases. Among the limiting conditions, the phytopathogen *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (teleomorph, *Cochliobolus sativus*) stands out as the causal agent of common root rot, leaf spot, seedling blight and black point in seeds of both wheat and barley cultures, apart from diseases in rye, oat, triticale, sorghum and fescue (Tinline, 1961). However, the most severe symptoms of these diseases are observed in wheat and barley cultures in hot and humid regions, with significant production losses (Kumar et al., 2002).

Of a cosmopolitan nature, spot blotch caused by *B. sorokiniana* is estimated to affect 25 million hectares of wheat plantations worldwide to variable degrees, which accounts for 12% of the total area of the culture that is grown (Duveiller et al., 2005). Seeds infected with the pathogen are considered one of the most efficient means of transmission and dissemination of phytopatogenic agents and stand as the main survival mechanism of this fungus off season, representing the means by which hot spots of the disease remain active in the field (Forcelini, 1991). This fungus may also play a deleterious role in germination and in the establishment of cereal plantations, leading to aborted germination of seed, seed rot, necrosis and discoloration of aerial parts of infected plants, reducing seed viability (Neergard, 1979). Spot blotch has symptoms that usually

appear on the aerial parts of plants and take the form of oval necrotic lesions surrounded by chlorotic halos. This infection may reduce photosynthetic area and eventually to premature plant senescence (Ghazviniand et al., 2007).

Combined strategies to control *B. sorokiniana* in wheat and barley cultures have been recommended by Mehta (1998). These strategies include the use of resistant varieties, chemical control of soils, waste management and crop rotation. In spite of the fact that spot blotch is considered one of the most important diseases affecting wheat worldwide, control measures have not produced satisfactory results (Kumar et al., 2007).

In this scenario, the present study assesses the pathogenic potential of monosporic and polysporic *B. sorokiniana* isolates in wheat seeds and seedling under controlled conditions.

### **3. MATERIALS AND METHODS**

#### **3.1. Origin of microorganisms**

The fungal polysporic isolates from different regions in Brazil were provided by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Trigo (EMBRAPA- Trigo, Passo Fundo), while the other isolates used in this study were kindly provided by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT – Mexico). All isolates used were obtained from seeds and tissues of wheat plants. The biological material was deposited in the collection of the Environmental Mycology Laboratory, DMIP, ICBS, UFRGS. Ninety-nine *B. sorokiniana* isolates were used in the virulence assay, of which 27 were polysporic and 72 were monosporic isolates (Table 1).

**Table 1:** Origin of *Bipolaris. sorokiniana* isolates from different regions in Brazil and other countries.

Isolates code	Origin
98004 P, A, B, C	Cruz Alta, RS –Brazil
98007 P, A, C	Cruz Alta, RS -Brazil
98030 P, A, C	Cruz Alta, RS –Brazil
98032 P, A, B, C	Engenheiro Beltrão, PR –Brazil
CEV53 A, B	Guarapuava, PR –Brazil
98011 P, A, C	Lagoa Vermelha, RS –Brazil
98012 P, A, C	Lagoa Vermelha, RS –Brazil
98031 P, A, B, C	Nova Estância, PR –Brazil
98028 P	Pelotas, RS –Brazil
98025 P, A, C	Piratini, RS –Brazil
98026 P, B, C	Piratini, RS –Brazil
98042 P, A, B, C	Piratini, PR –Brazil
1992 B, C	Planaltina, GO – Brazil
98010 P, A, B, C	Santa Rosa, RS –Brazil
98041 P, A, B, C	União da Vitória, PR –Brazil
98023 P, A, B, C	União da Vitória, PR –Brazil
98013 P, A, B, C	União da Vitória, PR –Brazil
98017 A, B, C	Samambaia, PR –Brazil
CEV48 P, A, B, C	Tapera, RS –Brazil
98034 P, A, B, C	Unknown
NRRL5851 P, A, B, C	South Africa
CFO201 P, A, B, C	South Africa
A20 P, A, B, C	Canada
1965 P	Copenhagen- Denmark
BS15M2 P, A, B, C	Delicias, Chihuahua – Mexico
BS16M1 P, C	Delicias, Chihuahua- Mexico
BS18M2 P, A, B, C	Poza Rica, Vera Cruz-Mexico
CMO105 P, A, B, C	Mexico
BS52M1 P, A, B,	Monterrey-Nuevo Leon
CS1004 P, A, B, C	Hanoi-Vietnam

P: Polysporic *B. sorokiniana* isolate; A, B, and C: Monosporic *B. sorokiniana* isolate originated from the respective polysporic isolate; CEV: *B. sorokiniana* isolate from barley.

### 3.2. Monosporic cultures

The monosporic cultures were obtained from the aerial mycelia of the polysporic cultures grown on plates with potato dextrose agar (PDA). A 0.85% saline

solution was poured over the plated colonies, and the conidia were transferred to microcentrifuge tubes. The contents of tubes were homogenized thoroughly to achieve complete conidia release. The suspension was transferred to a Petri dish with PDA and incubated at room temperature for 2 h. Using a stereomicroscope with optical magnification of  $\times 40$ , the conidia were transferred using plates with PDA media. The plates were maintained at  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  until the complete colonies had developed, and then were stored at  $4^\circ\text{C}$ . Each spore culture was designated with a letter (A, B, and C) Tabela 1.

### **3.3. Fungal inoculum preparation**

*B. sorokiniana* isolates were multiplied in a culture medium prepared with vegetable broth and carrot agar specific for sporulation and incubated in a BOD stove for 10 to 15 days at  $25^\circ\text{C}$  in a 12-h photoperiod. To standardize the fungal inoculum, 5 mL sterile saline (0.85%) containing Tween 80 (0.1%) were added to colonies. Then, colonies were lightly streaked using a Drigalski spatula, spores were removed and the suspension was transferred to sterile glass test tubes. Final spore concentration was adjusted to  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  by counting conidia in a Neubauer chamber.

### **3.4. Virulence assay**

The virulence assay was carried out using the 99 *B. sorokiniana* isolates. Samples of 100 wheat seeds, cultivar BRS Buriti, which is considered moderately susceptible to leaf spot, were disinfected using ethanol 70% for 2 min, sodium hypochlorite 2.5% for 2 min and then washed three times with sterile distilled

water. Seed samples were then placed in tubes containing the previously adjusted spore suspension and left at room temperature for 24 h. After, seeds were incubated according to a modified version of the Blotter test method. Each 100-seed sample was divided in groups of 25 seeds that were placed one by one on wet filter paper sheets, accounting for four repeats. The sheets containing seeds were folded as a sachet, which was incubated in a seed germinator (JP-1000, J. Prolab) at 25°C in a 12-h photoperiod with controlled temperature and humidity for 10 days. Then, 10 days after seeding, wheat seeds and seedlings were individually assessed as to abnormal and non-germinated seeds, leaf spot, black point of the seed and coleoptile lesion. The assay was carried out as 10 steps, each of which included a control group of seeds not challenged with the *B. sorokiniana* infection. After the lesions were analyzed, all the tissues of the organs were submitted to re-isolation of the phytopathogen using culture conditions on dishes contain PDA medium and after growth analysis of the structures under the microscope was realized.

### **3.5. Statistical analysis**

A descriptive statistics of the pathogenic action of *B. sorokiniana* was carried out for the four variables, expressed as percent values: % to abnormal and non-germinated seeds (GA), % black point of the seed (BP), % leaf spot/germinated seeds (LS), % coleoptile lesion/germinated seeds (CL).

The differences in virulence degree between controls and groups of monosporic and polysporic isolates, for the variables analyzed, were assessed using the one-factor analysis of variance followed by an analysis of the

differences between treatments using the randomization test, as described by Pillar & Orlóci (1996).

The differences in virulence patterns between isolates based on the four variables assessed (GA, BP, LS and CL) was evaluated using the Principal Component Analysis (PCA) (Person, 1901).

The statistical analyses were carried out using the application R (R Development Team 2008) and the action interface for Excel (Estacamp, 2013). Normality of variables was tested using the Shapiro-Wilk test. The analyses of variance and multivariate analyses were made in the MULTIV (Pillar, 1997).

#### **4. RESULTS**

The data analyses of the four variables assessed indicated that the monosporic and polysporic isolates of *B. sorokiniana* strongly induced the diseases in wheat seed and seedlings, when compared to controls (Table 2).

**Table-2:** Analysis of variance between the treatment groups monosporic and polysporic isolates and control, for the variables abnormal and non-germinated seeds, black point of seed, leaf spot/germinated seeds, and coleoptile lesion/germinated seeds.

Variable	Treatment	N	Mean	median	Min	Max	SD	Lower	Upper
								Limit (LL mean)	Limit (UL mean)
Abnormal and non-germinated seeds <sup>(1)</sup>	C <sup>a</sup>	11	25.7	24	16	41	7.7	20.6	30.9
	M <sup>b</sup>	74	60.7	59.5	16	100	19.9	56.1	65.3
	P <sup>c</sup>	27	72.4	75.0	43	100	17.5	65.5	79.3
Black point of seed <sup>(2)</sup>	C <sup>a</sup>	11	13.2	10.0	0	44	16.1	2.3	24
	M <sup>b</sup>	74	83.9	100.0	0	100	27.0	77.6	90.1
	P <sup>c</sup>	27	97.4	100.0	61	100	8.1	94.2	100
Coleoptile lesion <sup>(3)</sup>	C <sup>a</sup>	11	9.3	0.0	0	83.3	24.8	0	26
	M <sup>b</sup>	72	60.7	67.9	0	100	34.3	52.6	68.8
	P <sup>b</sup>	26	69.0	82.0	0	100	34.1	55.3	82.8
Leaf spot <sup>(4)</sup>	C <sup>a</sup>	11	5.6	0.0	0	54.5	16.3	0	16.6
	M <sup>b</sup>	72	43.0	44.6	0	100	33.7	35.1	51
	P <sup>c</sup>	26	59.9	65.4	0	100	31.3	47.3	72.6

C: Control, M: Monosporic isolate, P: Polysporic isolate, N: Number of treatments, Min: Minimum seeds, Max: Maximum seeds, SD: Standard deviation. Groups followed by different letters differ significantly from one another based on the probabilities obtained by the pairwise randomization test: (1) P= 0.001 for C-M. P= 0.001 for C-P and P= 0.01 for M-P; (2) P= 0.001 for C-M. P= 0.001 for C-P and P= 0.009 for M-P; (3) P= 0.005 for C-M. P= 0.001 for C-P and P= 0.02 for M-P; (4) P= 0.001 for C-M. P= 0.001 for C-P and P= 0.296 for M-P.

The comparison between treatment groups (monosporic, polysporic and control isolates) revealed a significant difference between groups, when one same variable is considered. The exception was observed for coleoptile lesion, for which no significant difference was observed between monosporic and polysporic isolates (Table 2).

The action of single spore isolates on germination, showed a median of 59.5 seeds with to abnormal and non-germinated seeds, and the variation ranged from a minimum of 16 to a maximum of 100 seeds. The pathogenesis of polysporic isolates had a higher median, of 75 seeds with to abnormal and non-germinated seeds, and the variation ranged from a minimum of 43 and maximum 100 seeds (Table 2).

The highest virulence towards germination (values above the third quarter) was exerted by 18 monosporic isolates, with values over 73.25% of seeds to abnormal and non-germinated seeds, and by 6 polysporic isolates, with seed values over 84%.

The pathogenic action of *B. sorokiniana* isolates on wheat seeds led to high degree of deterioration, with a median value of 100 seeds with black point, both for monosporic and polysporic cultures. The data analyses showed statistically significant differences between all treatments. With polysporic cultures, a higher incidence of black point of the seed was observed. Mean number of seeds affected by black point after treatment with polysporic cultures was 97.4%, while monosporic cultures caused the disease in 83.9% and the black point of seed in controls was 13.2% (Table 2). On the other hand, 5.4% of monosporic isolates did not cause symptoms in seeds, and did not differ from



controls. All polysporic isolates caused black point of seeds, with the lowest value of 61% of seeds.

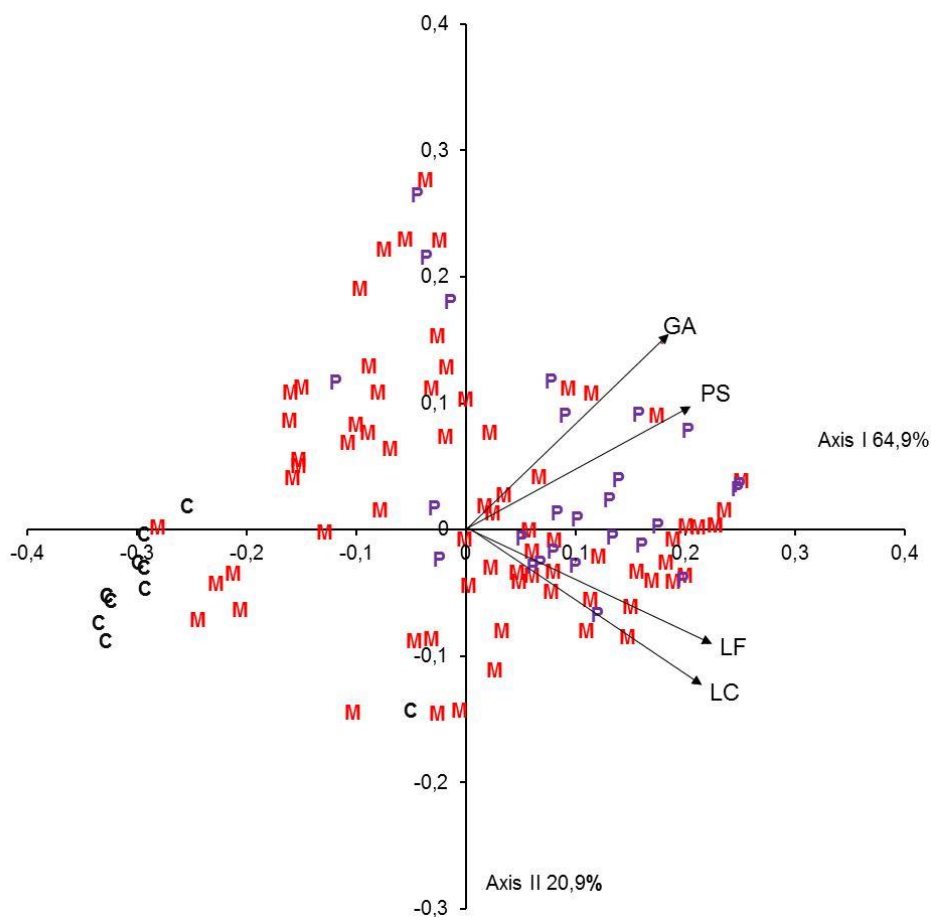
Coleoptile lesion caused by polysporic and monosporic *B. sorokiniana* isolates presented medians of 82% and 67.9%, respectively (between zero and 100%). The analysis of variance to compare groups indicated a significant difference between the control and the treatment groups, though this difference was not observed between monosporic and polysporic isolates (Table 2).

Incidence of lesions on leaf blades presented medians of 44.6% and 65.4% for monosporic and polysporic isolates, respectively (Table 2). Among the most virulent isolates that caused the symptom of leaf spot (above the third quarter), 18 were monosporic isolates, causing the effect in more than 69% of leaves, while six polysporic isolates triggered the effect in more than 79.8% of seeds.

#### **4.1. Analysis of the pathogenic action of monosporic and polysporic isolates**

The similarity pattern in the pathogenic action of isolates, based on the four variables evaluated simultaneously, is shown in Figure 1 and 2. Ordination axis I contains 64.9% of the total variation of virulence data, in which all variables exhibited high, positive correlation (GA = 0.71, PS= 0.79, LF = 0.87, and LC = 0.83) with this axis and the major contribution was that of leaf spot with 29.5% of the total variation in this axis. The position of isolates on axis I allows identifying the most virulent isolates, on the right, namely CEV48P, 98042P, 98042C and

CFO201B. Low virulence isolates are at the far end of the axis, especially 98012C, 98023B, 98026C, CFO201A and CS1004A (Figure 3)

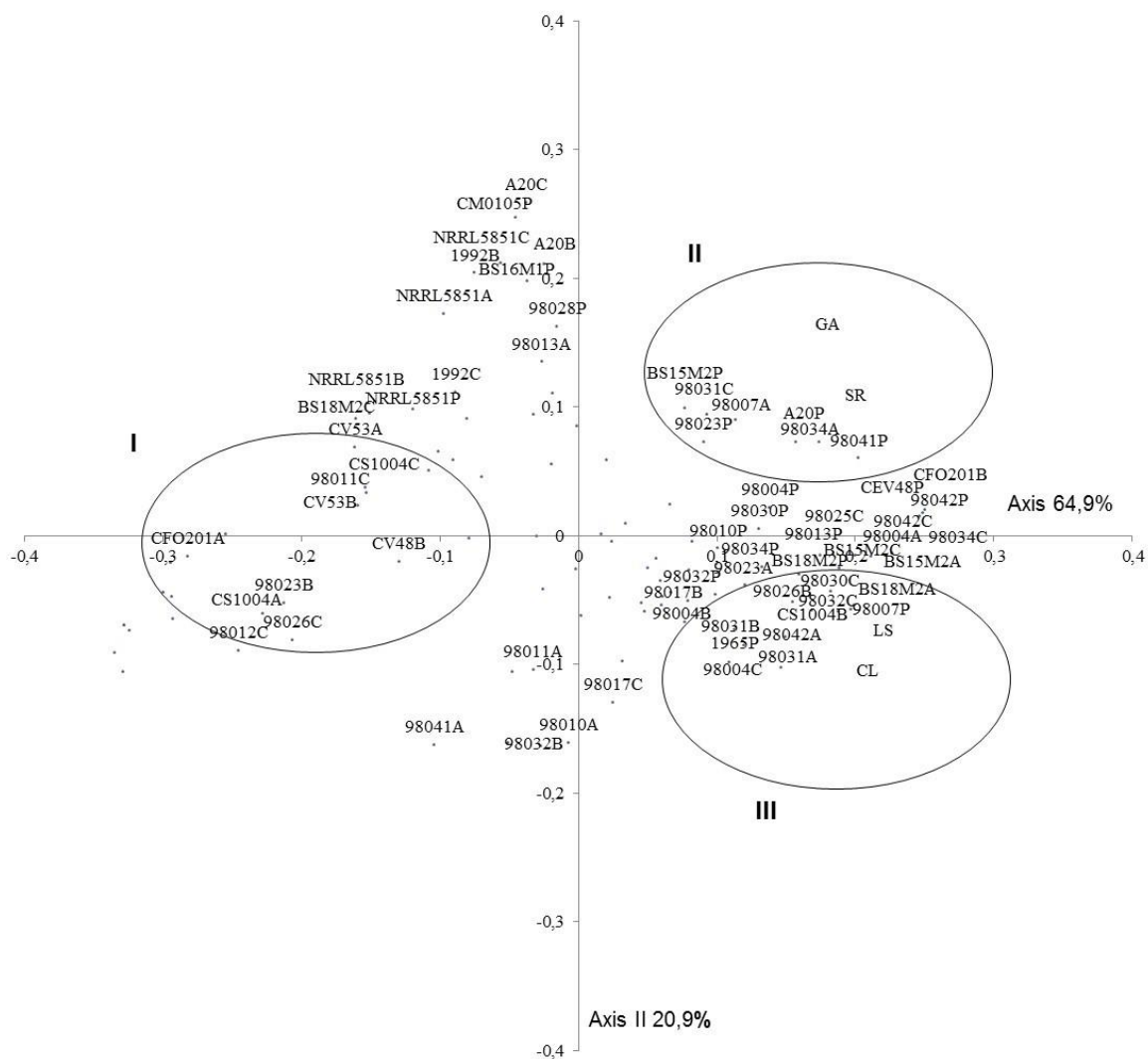


**Figure 1** Ordination chart for *Bipolaris sorokiniana* isolates in terms of virulence variables constructed based on the principal components analysis and correlation as a measure of similarity between the variables. Abnormal and non-germinated seeds (GA); Black point of seed (PS); Leaf spot/germinated seeds (LF); Coleoptile lesion/germinated seeds (LC). The percentage of variation in each axis and the variables that correlated with at least one of the two axes is indicated. C: Control, M: Monosporic isolate, P: Polysporic isolate.

Axis II contains 20.9% of the total variation in virulence data and allows differentiating the most pathogenic isolates to wheat seeds from the most pathogenic to the aerial parts of the plant. Abnormal and non-germinated seeds and black point of seed had positive correlation with axis II (0.58 and 0.36, respectively), while leaf spot and coleoptiles lesion presented negative correlation (-0.35 and -0.48 respectively). The highest contribution was given by the variable abnormal and non-germinated seeds, with 40.9%.

The ordination chart of isolates also reveals a clear distinction between control and monosporic and polysporic isolates (Figure 1). Also, single spore isolates presented higher variation in virulence degree, when compared to polysporic isolates. However, these were a little more specialized in terms of virulence, affecting more seeds than the aerial parts.

Of the isolates used to infect seeds, 8% presented the highest virulence, with pathogenic action over 75% for all variables assessed. The isolates with the highest and lowest scores in axis I and II were the most virulent when the four variables are considered as a set 98004A, 98025C, 98034C, 98042P, 98042C, CEV48P and BS15M2A (Figure 2). Black point of seed was observed in all monosporic and polysporic isolates, except for isolates 98031P, 98012C, 98041A and CFO201A. On the other hand, monosporic isolates 98012C, 98041A and CFO201A presented low virulence, with symptoms observed in less than 1% of wheat seedlings and seeds.



**Figure 2** Ordination chart for *Bipolaris sorokiniana* isolates in terms of virulence variables constructed based on the principal components analysis and correlation as a measure of similarity between the variables abnormal and non-germinated seeds (GA), black point of seed (PS), leaf spot/germinated seeds (LF), and coleoptile lesion/germinated seeds (LC). The identification codes of isolates with high and low values are shown in axes I and II. Isolates presenting intermediate values were not labeled, and are identified by dots. The ellipsis I indicates isolates with low virulence, ellipsis II signals highly pathogenic isolates affecting mainly seeds, and ellipsis III indicates highly pathogenic isolates affecting mainly aerial parts.

## 5. DISCUSSION

In general, microorganisms present high genetic diversity, leading to differences in morphology, physiology and virulence. Variations in the use of substrates, tolerance to determined temperature and pH ranges, production of toxins and other metabolites are among the manifestations of physiological distinctions in one population, which often result in variation of virulence of biotypes (Machado, 1980).

The most interesting aspects observed in the present study are associated with the wide pathogenic variability of *B. sorokiniana* isolates. Pathogenic action patterns based on conidial origin were established using the correlation ( $r = 0.5$ ) between the variable leaf spot and polysporic isolates for which we observed the highest values of pathogen virulence.

The pathogenic fungus *B. sorokiniana* uses all plant organs of winter cereals as substrate. For this reason, two distinct disease stages are discernible: the interference in photosynthesis, when the infection occurs in the aerial parts of the plant, and the interference in the search and absorption of water and nutrients, which is the stage that affects underground parts (Forcelini, 1991). Here, the presence of symptoms and the wide variation in this pathogen's virulence patterns are reported based on the analysis of virulence variables, which indicate that polysporic isolates are more virulent, with values over 60%, when compared with monosporic isolates, with values over 43% (Table 2). The monosporic cultures were used to reduce the effect of heterokaryosis, since one single conidium may be homokaryotic or present reduced variability, which makes it easier to identify pathotypes based on isolate virulence. This

characteristic may be linked with the different genes present in heterokaryotic cells of monosporic isolates, which in turn may manifest in different ways, depending on the quality and quantity of nuclei contained in cells and on the roles played by the environment and the host (Tinline, 1961). This may explain the wider effect spectrum of monosporic isolates on the virulence variables shown in Figure 3.

Pathogenicity tests carried out by Christensen (1925) using 37 monosporic *H. sativum* (*Cochiobolus sativus*) isolates indicated that 18 formed zones in BDA medium, which differed from the parental colony as to morphology and virulence. In a previous study, the virulence, morphology and growth rate in culture medium of 10 *B. sorokiniana* isolates from different regions in Brazil were analyzed in wheat. Wide variations in morphology and growth rates were observed between parental and re-isolated isolates. However, no relationship between morphological variability and virulence was detected between these two types of isolates (Oliveira et al., 1998) or origin of isolates (Valim-Labres et al. 1997).

The results obtained in the present study show that polysporic isolates exerted higher pathogenic action, predominantly in seeds, as compared to aerial parts. Often the pathogens that cause common root rot also cause different symptoms in one single plant species; however, most specific symptoms in one plant are regulated by infection time and soil conditions, mainly temperature and humidity (Wheeler & Rush, 2001). Our results also reveal that polysporic isolates, which presented high virulence levels in seed germination, did not show the same virulence indices in comparison with the respective monosporic isolates. For example, isolate 98041P inhibited germination in 97% of wheat seeds, while the

monosporic isolates generated from this polysporic strain reduced germination by approximately 50%. According to Mehta (1998), a likely source of variability may be inherent to the fungus itself, since its virulence may vary with time.

Duveiller & García Altamirano (2000) showed that *B. sorokiniana* isolates from different parts of a plant did not cluster according to virulence, when they were reinoculated. In this sense, the authors discovered that the number of leaf spot varies with the isolate used for inoculation, and that this isolate does not depend on the organ from where it was isolated (Duvellier & García Altamirano, 2000). Fetch & Steffenson (1999) observed variation in virulence patterns of *Cochliobolus sativus* in relation to barley cultivars and to the development stage of plants.

In the present study, we observed that the most severe symptoms were associated with germination and black point of the seed, with reduced germination and high levels of rot (Table 2). This condition is due to mainly the hemibiotrophic nature of *B. sorokiniana* and to the complex enzymatic apparatus it has, which is able to use any organ of a plant as nutritional substrate.

The incidence of *B. sorokiniana* in wheat seeds is often observed negatively, affecting germination and triggering the occurrence of symptoms in plants and seeds, and even causing the death of plants (Lasca et al., 1983). The association of the pathogen to seeds is an efficient mechanism of survival and dissemination, and is the main reason behind the outbreaks of epidemics in wheat production regions in Brazil (Goulart et al., 1990). According to Kumar et al. (2002), infections may be so severe that the infected plants wither, without producing one single seed. Under conditions that favor the pathogen's life cycle,

spikelets may be affected, causing seeds to dry out.

The virulence assays were carried out using the wheat cultivar BRS Buriti, which is moderately susceptible to leaf spot and is recommended for the establishment of wheat plantations in winter, in southern Brazil. In this sense, the use of *B. sorokiniana* isolates from different regions of Brazil and the world may indicate that virulence levels differ, which in fact was not observed. The results obtained did not afford to cluster *B. sorokiniana* isolates by geographic origin or the definition of similarity patterns in pathogenic action. Maraitte et al. (1998) analyzed 360 wheat leaf samples from 10 countries presenting symptoms of the disease, and did not observe specific relationships between virulence in terms of geographic origin and genotype.

## 6. Acknowledgements

We are grateful to Dr. Julie Nicol, Dr. Monica Mezzalama, Dr. Etienne Duveiller, and Dr. Henri Maraitte from CIMMYT; Dr. Kerry O'Donnell from USDA for kindly providing the *Bipolaris sorokiniana* samples from the other countries and to Dr. Ariano Prestes from EMBRAPA for providing the *B. sorokiniana* isolates from wheat seeds from Brazil. Also we thank CNPq for their scholarship and this study was financed by CAPES/PROF.

## 7. REFERENCES

- Christensen JJ (1925). Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. *Phytopathology*. 15: 785-795.
- Duveiller E, Garcia Altamirano I (2000). Virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates from



wheat roots, leaves and seeds in Mexico. *Plant Pathol.* 49: 235–242.

Duveiller E, Kandel YR, Sharma RC, Shrestha SM (2005). Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. *Phytopathology* 95: 248–256

EMBRAPA (2013). Trigo. Available at: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/>. Accessed 12/04/2013.

ESTATCAMP (2013). Action Versão 2.4. São Carlos: Estatcamp. Available at: <http://www.portalaction.com.br/content/download-action>. Accessed 15/04/2013.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Available at: <https://www.fao.org.br/>. Accessed March 2012.

Fetch TGJr, Steffenson BJ (1999). Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Dis.* 83: 213–217.

Forcelini CA (1991). Importância epidemiológica de fungos do gênero *Helminthosporium* em sementes de trigo e cevada. In: Menten JOM (ed) Patógenos em sementes detecção, Danos e Controle Químico, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz FEALQ, Piracicaba, Brazil, pp 179-219.

Ghazvini H, Tekauz A (2007). Virulence Diversity in the Population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Dis.* 91: 814-821.

Goulart ACP, Mesquita NA, Paiva FA (1990). Eficiência do tratamento químico de sementes de trigo no controle de *Pyricularia oryzae* e *Cochliobolus sativus* (*Heminthosporium sativum*). *Fitopatol. Bras.* 15: 302-305.

Kumar J, Schafer P, Huckelhoven R., Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S, Kogel KH (2002). *Bipolaris sorokiniana* a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Mol. Plant Pathol.* 3(4): 185–195.

- Kumar D, Chand R, Prasad L, Joshi AK (2007). A new technique for monosporic culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris sorokiniana*, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. *World J. Microbiol. Biotechnol* 23: 1647-1651.
- Kumar S, Singh R, Singh AK, Yadav SK, Grover M, Kumar PS, Kumar R (2013). Spot blotch - an emerging issue in South Asia. *Wheat Information Service Electronic Newsletter for Wheat Researchers*. 115: 2-10 [www.shigen.nig.ac.jp/ewis].
- Lasca CC, Brignani Neto F, Chiba S (1983). Eficiência de fungicidas em tratamento de sementes de arroz para controle de *Pyricularia oryzae* Cav. e *Phoma* sp. *Summa Phytopatol*. 9: 93-94.
- Machado AA (1980). Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. e variabilidade do método de inoculação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente. MSc dissertation, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba, Brazil.
- Maffia LA, Muchovej JJ, Maffia AMC (1988). Fundamentos epidemiológicos no estudo da transmissão de patógenos por sementes. In: 111 Simpósio Brasileiro De Patologia De Sementes. Campinas, Brazil: Fundação Cargill, pp 114-122.
- Maraite H, Di Zinno T, Longrée H, Daumerie V, Duveiller E (1998). Fungi associated with foliar blight of wheat in warmer areas. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A (eds) *Proceedings of the International Workshop on Helminthosporium Diseases of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*, El Batán, Mexico: El Batán, pp 293–300.
- Mehta YR (1998). Constraints on the integrated management of spot blotch of wheat. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A (eds) *Helminthosporium Blights of wheat: spot blotch and tan spot*, CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico, pp 18–27.
- Neergard P (1979). *Seed Pathology*. London: Macmillan.

- Oliveira AMR, Matsumura ATS, Prestes AM, Matos GS, Van Der Sand ST (1998). Morphological variability and virulence in isolates of *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatol. Bras.* 23: 349-353.
- Pearson K (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag.* 2: 559-572.
- Pillar VD, Orlóci L (1996). On randomization testing in vegetation science: multifactor comparisons of relevé groups. *Journal of Vegetation Science.* 7: 585-592.
- Pillar VD (1997). Multivariate exploratory analysis and randomization testing with *Multiv. Coenoses.* 12(2): 145-148.
- R Development Core Team (2008). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Shoemaker RA (1955) Biology, cytology, and taxonomy of *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Bot.* 33: 562–567.
- Tinline RD (1961). *Cochliobolus sativus* Drug resistant, color and nutritionally exacting mutants. *Can. J. Bot.* 40, 425-437.
- Valim-Labres ME, Prestes A, Van Der Sand ST, Matsumura ATS (1997). Variação no aspecto cultural morfológico e virulência em isolados de *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatol. Bras.* 22, 483-487.
- Wheeler T, Rush CM (2001). Soil inhabitant. In: Maloy OC, Murray TD (eds) *Encyclopedia of Plant Pathology*, John Wiley & Sons, New York, USA, pp 933-934.

## **CAPÍTULO 2**

### **ENZYME CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA FROM TOMATO PLANTS<sup>4</sup>**

---

<sup>4</sup> Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Journal of Advanced Scientific Research

## **Enzyme characterization of endophytic actinobacteria from tomato plants**

**Elisandra Minotto<sup>1</sup>; Luciana Pasqualini Milagre<sup>1</sup>; Martha Trindade Oliveira<sup>2</sup>;**

**Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>1\*</sup>**

\* Corresponding author: Dr. Sueli T. Van Der Sand, [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

<sup>1</sup> Laboratory of Environmental Mycology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Basic Health Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Basic Health Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

### **1. Abstract**

Endophytic actinobacteria produce active metabolites, protecting plant tissues against stress. Their compounds are widely used in human and veterinary pharmaceuticals and agriculture, and of several enzymes with biotechnological potential. The present study characterizes the enzymatic production of endophytic actinobacteria colonizing tomato plants. Twenty-three actinobacteria isolates were tested for the detection of amylase, pectinase, cellulase, lipase, esterase, caseinase, gelatinase and catalase, at three temperatures (25°C, 28°C and 30°C) for 7 days. Substrate hydrolysis and enzymatic index (EI) were determined. The results showed that mean EI of all actinobacteria isolates was between 0.8 and 7.1. Although 30°C was the temperature at which the highest number of isolates presented enzymatic activity, it was at 25°C that amylase, pectinase, lipase and esterase activity reached the highest mean EI. Catalase was produced by all actinobacteria, while lipase, esterase and pectinase activity was observed for at least 20

isolates, regardless the incubation temperature. However, the highest number of isolates able to hydrolyze gelatin and cellulose (8) was observed when growth was carried out at 30°C. The highest EI means were observed for the hydrolysis of lipases, while the lowest values were seen for the hydrolysis of cellulose.

**Keywords:** Actinomycetes, enzymatic production, extracellular enzymes.

## 2. Introduction

Actinobacteria are ubiquitous microorganisms widely distributed in natural ecosystems. The phylum comprises bacteria with high levels of guanine and cytosine in their DNA, whose morphology, physiology and relationship with oxygen follow considerably varied patterns [1]. These spore-forming Gram positive bacteria belong to the order Actinomycetes [2], and develop aerial mycelia, as well as in the substrate, when grown in solid media. They represent between 20% to 60% of the total population of microorganisms living in the soil [3, 4]. Another typical characteristic of these microorganisms is the production of an odor similar to that of wet earth [5]. Actinomycetes are also observed in several other natural environments, such as fresh and salt waters, the rhizosphere, root nodules and inner plant tissues, decomposing organic matter, sediments, animal feces, activated sludge, and food products [6].

Filamentous soil bacteria belonging to the genus *Streptomyces* are rich sources of a high number of bioactive natural products with biological activity, which are extensively used as pharmaceuticals and agrochemicals. Some important characteristics of the genus *Streptomyces* include (i) the ability to colonize the rhizosphere, (ii) efficient biocontrol of phytopathogenic fungi, (iii) production of siderophores and growth-

promoting substances *in vitro*, (iv) promotion of nodulation, and (v) an ancillary role in iron assimilation and nitrogen fixation by *Rhizobium* bacteroids in leguminous species [7, 8].

The biochemical heterogeneity, the ecological diversity and the exceptional capacity of these microorganisms to produce secondary metabolites make them an ideal target for the production of enzymes. Actinomycetes synthesize extracellular enzymes that hydrolyze complex macromolecules like proteins, starch, chitin, cellulose and lignocellulose in different habitats. Furthermore, according to Pereira et al. [9], some enzymes produced by actinomycetes are also able to degrade substances known to be resistant to the attack by most bacteria and fungi, such as organic nitrogen compounds, steroids, aromatic compounds, acetylene, rubber and paraffins.

The several metabolic and physiologic properties of actinomycetes are behind their involvement in organic matter recycling processes and in the bioremediation of environments contaminated with xenobiotics and hydrocarbons compounds. Additionally, these microorganisms take part in the conversion and production of biofuels [9] and act as important agents in the biocontrol of plant diseases [7] this ability is mainly due to their capacity to interact with other microbial populations, producing antibiotics and other secondary metabolites, with no damage to plants [10].

In this sense, based on the considerable economic and biotechnological importance that actinobacteria have as producers of large amounts of antibiotics and commercially interesting enzymes, the objective of the present study was to characterize the enzymatic activity profile of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants grown under different temperature conditions.

### 3. Materials and methods

#### Microorganisms

The endophytic actinobacteria isolates used in this work were obtained from tomato plant roots (*Lycopersicon esculentum*) collected in three cities in the state of Rio Grande do Sul, Brazil between 2005 and 2006 [8]. The isolates are deposited in the collection of microorganisms maintained by the Laboratory of Environmental Mycology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Basic Health Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

#### 3.1. Enzymatic activity characterization

In total, 23 endophytic actinobacteria isolates were evaluated for their capacity to produce extracellular enzymes. Enzyme production, by the actinomycetes, was detected using solid culture media with a specific substrate for each enzyme (amylase, pectinase, cellulase, lipase, esterase, caseinase, gelatinase and catalase) produced. Gelatinase was detected using a semisolid medium. Actinobacteria cultures grown for 7 days in casein starch agar (2.0 g KNO<sub>3</sub>, 2.0 g NaCl, 2.0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 g MgSO<sub>4</sub>, 0.02 g CaCO<sub>3</sub>, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>, 0.3 g casein, 10 g starch; 15 g agar; 1,000 mL distilled water) were inoculated using the spot method onto a Petri dish containing 20 mL of the specific culture media for each enzyme. After, dishes were placed in an incubator for seven days at 25°C, 28°C and 30°C in the dark. All assays were carried out in duplicate.

##### 3.1.1. Amylase production

The consumption of starch by endophytic actinobacteria was assessed as described by Conn et al. [11] Isolates were transferred to starch agar media containing 0.2% soluble



starch. After incubation, 10 mL lugol solution (aqueous solution of iodine and potassium iodide) were poured onto colonies. Amylase production was detected as a transparent halo around the colony that typically signals starch hydrolysis.

#### 3.1.2. Pectinase production

Pectinolytic activity was detected using trypticase soy agar (TSA) supplemented with 1% citric pectin. After incubation, 10 mL lugol solution was added to the colonies. Pectinase production was detected upon observation of a transparent halo caused by pectin hydrolysis, indicating positive pectinolytic activity.

#### 3.1.3. Cellulase production

Cellulase production was assessed using a minimal mineral salt medium [12] supplemented with 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) as the single carbon source. After incubation, cellulase production was detected adding a 0.1% solution of Congo red onto the colonies. After 15 min the solution was drained and media were washed with NaCl (1 M). After 30 min. the formation of an orange halo around the colony indicated cellulolytic activity.

#### 3.1.4. Lipase and esterase production

The lipase and esterase activity of the isolates was evaluated according to the method described by Sierra [13] using culture media containing Tween 20 (fatty acids C10) and Tween 80 (fatty acids C18), respectively. Culture media were sterilized and 1% (v/v) Tween 20 or Tween 80 previously sterilized by filtration was added. After incubation, dishes were stored at 4°C for 48 h to afford a better visualization of the halos. The production of lipase and esterase was confirmed upon observation of a whitish halo due to the formation of calcium crystals, contrasting with the transparent medium.

### 3.1.5. Protease production (caseinase and gelatinase)

The ability of actinomycetes to produce proteases was assessed using milk agar (solution A: 10.0 g low-fat powdered milk, 90 mL distilled water; solution B: 3.0 g agar, 97.0 mL distilled water) and gelatin agar medium (40.0 g gelatin, 3.0 g meat extract, 5.0 g peptone, 1,000 mL distilled water) to detect caseinase and gelatinase, respectively. After incubation, casein hydrolysis was observed as the presence of transparent zones surrounding the colonies. Gelatin hydrolysis was assessed in test tubes containing 4 mL specific medium and after incubation period the tubes were incubated under refrigeration at 4°C for 2 h upon confirmation of the liquid state of the medium.

### 3.1.6. Catalase production

Catalase production was assessed transferring actinobacterium isolates to nutrient yeast dextrose agar (NYDA) culture medium [14]. After a 7-day incubation period, 1 mL hydrogen peroxide 3% was added to colonies. Positive reaction was observed as the formation of bubbles upon addition of hydrogen peroxide [14].

## 3.2. Evaluation of enzymatic activity

Enzymatic activity was detected measuring hydrolysis halos and the colonies diameter on two directions. After, data were evaluated based on the determination of the enzymatic index (EI) expressed as the ratio hydrolytic halo diameter: colony diameter [15]. For catalase and gelatinase activity, only the presence of enzymatic activity was assessed. Enzymatic indices were submitted to variance analysis and the Tukey's correlation test ( $\alpha=0.05$ ), when necessary, to compare means using the Statistica 8 software.

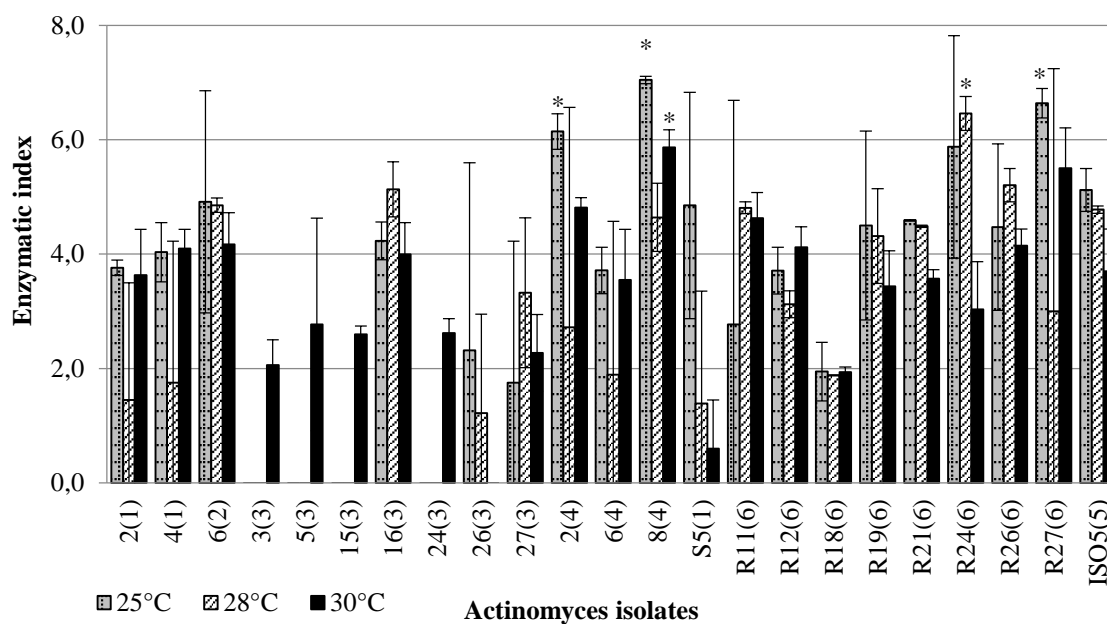
## 4. Results

#### 4.1. Enzymatic characterization

Extracellular enzyme activity by endophytic actinobacterium isolates in solid media and specific substrates was observed based on the presence hydrolytic halos.

##### 4.1.1. Amylolytic activity

Starch hydrolysis in the culture medium was observed for 73.91% of isolates grown at 25°C and 28°C, and for 95.65% of isolates cultured at 30°C. Each isolate was able to degrade starch in at least one of the incubation temperatures determined in this work (Fig. 1).



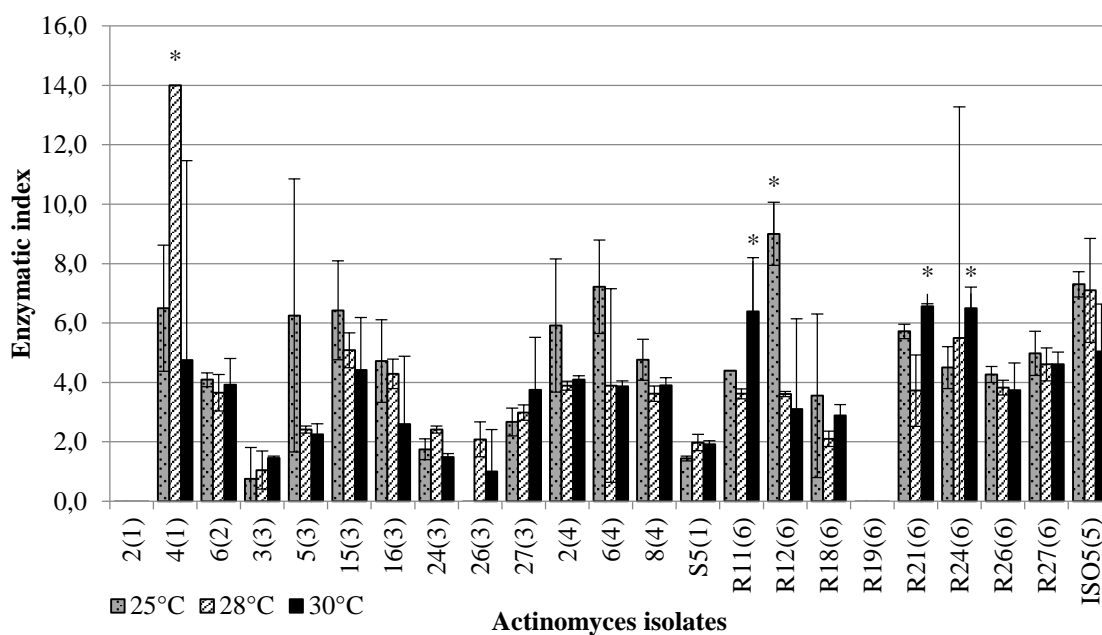
**Fig. 1** Amylolytic activity of actinomycetes isolates assessed based on the hydrolysis of soluble starch after incubation at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ).

Isolate 8(4) presented the highest amylolytic activity at 25°C and at 30°C, with EI of 7.04 and 5.86, respectively. High activity was observed for isolates 2(4) and R27(6), which showed statistically significant difference when grown at 25°C. For isolates

incubated at 28°C, the highest starch hydrolysis index was observed for isolate R24(6) (EI=6.46), which differed statistically from the other isolates. On the other hand, 17.39% of isolates incubated at 25°C and at 28°C and 4.34% of those incubated at 30°C did not present hydrolysis halo.

#### 4.1.2. Pectinolytic activity

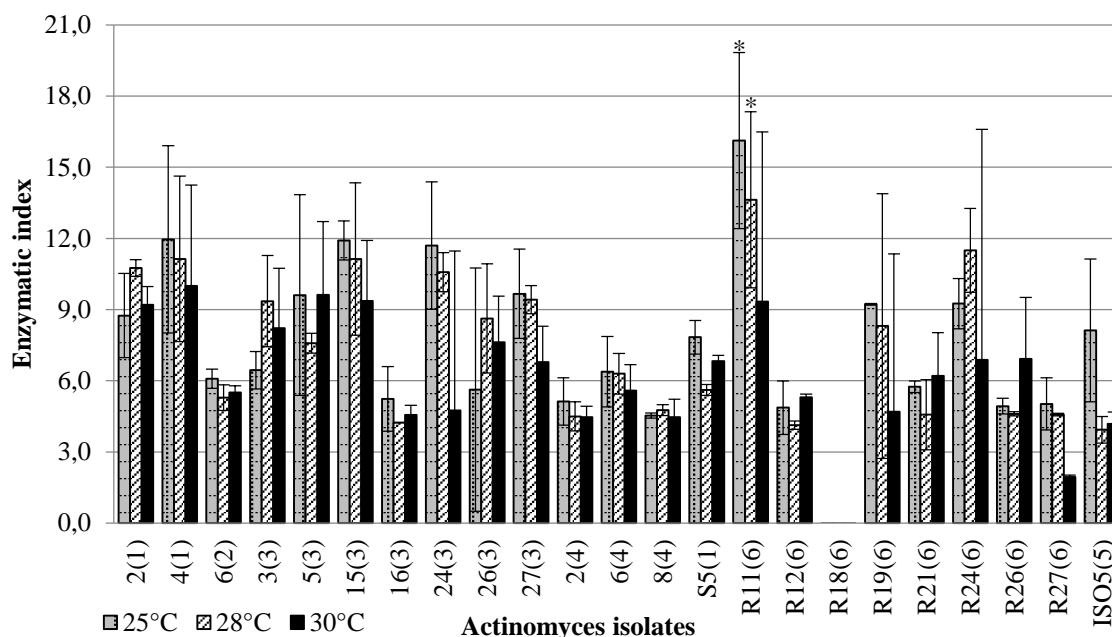
Most of the isolates show pectinolytic activity of the isolates 4(1) and R12(6) presented EI of 14.0 and 9.0 when grown at 28°C and 25°C, respectively. The lowest pectinolytic indices were observed when isolates were incubated at 30°C. Isolates R11(6), R21(6) and R24(6) presented the highest pectinolytic indices at 30°C, which did not differ significantly (Fig. 2). Also, 8.69% of isolates did not present pectinolytic activity at any temperatures used.



**Fig. 2** Pectinolytic activity of actinomyces isolates assessed based on the hydrolysis of citric pectin incubated at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.1.3. Lipolytic activity

Isolate R18(6) was the only isolate unable to degrade long-chain esters (Fig. 3) at all temperatures assayed. On the other hand, the highest EI values were observed for isolate R11(6) grown at 25°C and 28°C.

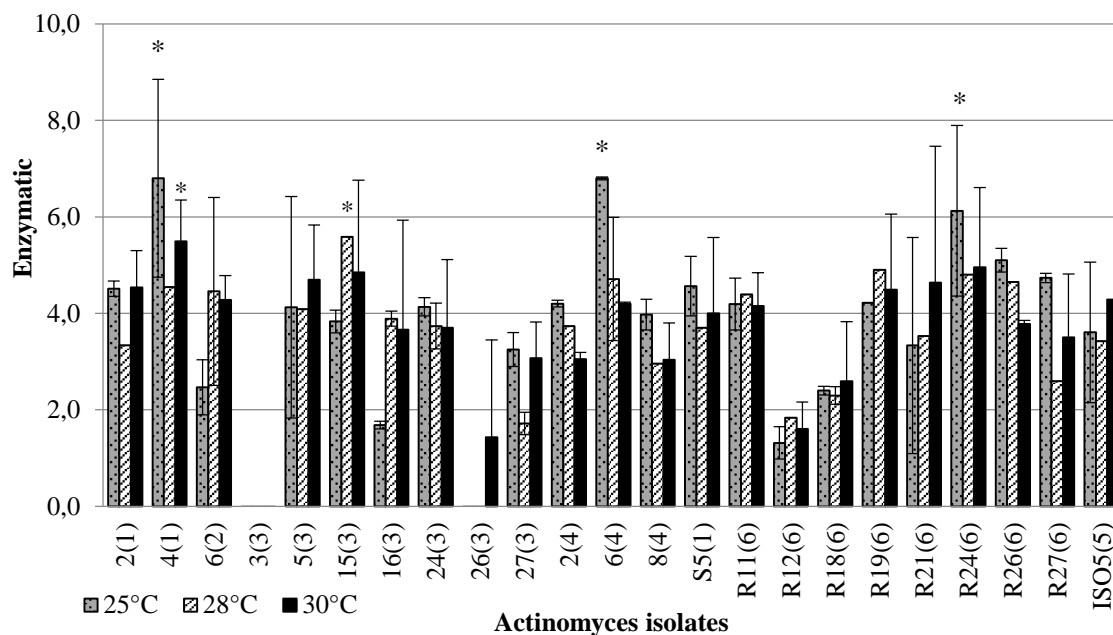


**Fig. 3** Lipolytic activity of actinomycetes isolates assessed based on the hydrolysis of Tween 20 at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.1.4. Esterase activity

Enzymatic indices in the esters hydrolysis assay were lower than those observed in the lipase hydrolysis assay. However, 91.30% of isolates were able to degrade simple-chain esters at the three temperatures stipulated. The exception was isolate 3(3), which did not present detectable activity, and isolate 26(3), which only degraded esters at 30°C (Fig. 4). The highest esterase production values were observed for isolates 4(1) (EI=6.8), 6(4)

(EI=6.8) and R24(6) (EI=6.1) cultured at 25°C. In the assays carried out at 28°C and at 30°C the highest indices were 5.58 and 5.59 for isolates 15(3) and 4(1), respectively (Fig. 4).



**Fig. 4** Esterase activity of actinomycetes isolates assessed based on the hydrolysis of Tween 20, at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days. (\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.1.5. Caseinase activity

Caseinase was detected based on the presence of hydrolysis halos in media containing casein as substrate. In total, 12 isolates (52.17%) degraded this substrate, considering all incubation temperatures. However, 11 isolates (47.82%) no presented caseinase activity at temperature tested. Therefore, the presence of caseinase was confirmed for endophytic actinobacteria in tomato plants, with isolate 6(2) presenting the highest EI ( $\geq 2.8$ ) at the three temperatures stipulated (Table 1)

Table 1 Enzymatic index from Caseinase and cellulase activity of actinobacteria isolates assessed based on the hydrolysis of milk casein and of carboxymethylcellulose, respectively, incubated at 25°C, 28°C and 30°C for 7 days.

<b>Actinobacterium</b>	<b>Caseinase</b>			<b>Cellulase</b>		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
<b>2(1)</b>	1.74	0.56	1.55	3.43	1.89	2.06
<b>4(1)</b>	0.88	0.00	0.00	3.05	3.75*	3.77*
<b>6(2)</b>	2.80*	3.04*	2.78*	0.00	0.00	0.00
<b>3(3)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>5(3)</b>	0.00	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00
<b>15(3)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>16(3)</b>	1.35	1.73	1.94	0.00	0.00	0.00
<b>24(3)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>26(3)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>27(3)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>2(4)</b>	1.35	1.62	1.75	0.00	0.00	0.00
<b>6(4)</b>	1.87	1.47	1.85	0.00	0.00	0.00
<b>8(4)</b>	1.38	1.51	1.82	0.00	0.00	0.00
<b>S5(1)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>R11(6)</b>	1.38	1.35	1.41	0.00	0.00	0.00
<b>R12(6)</b>	0.00	0.00	0.00	1.64	2.33	2.37
<b>R18(6)</b>	0.00	0.00	0.00	2.70	2.55	3.30*
<b>R19(6)</b>	0.00	2.07	0.00	3.70	3.84*	4.18*
<b>R21(6)</b>	1.85	1.58	1.48	0.00	0.00	0.00
<b>R24(6)</b>	0.00	2.03	0.00	4.08*	4.04*	4.14*
<b>R26(6)</b>	1.92	1.53	1.87	3.20	0.00	0.63
<b>R27(6)</b>	1.66	1.87	1.74	0.00	0.00	0.00
<b>ISO5(5)</b>	2.26	1.89	2.05	0.00	1.67	0.89

(\*) Different means according to the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4.1.6. Cellulase activity

Of the 23 isolates tested, 30% of the isolates grown at 25°C and at 28°C were able to degrade the CMC present in the culture medium. Of the isolates cultured at 30°C, 34,78% exhibited this characteristic. Isolate ISO5(5) presented activity when incubated at 28°C and 30°C, while isolate R26(6) presented activity when incubated at 25 and 30°C (Table 1).

Isolate R24(6) presented  $EI \geq 4$ , the highest observed, independently of the incubation temperature. However, this index did not differ significantly from the index presented by isolates 4(1) and R19(6) incubated at 28°C and 30°C, and from that one obtained for isolate R18(6) at 30°C.

#### 4.1.7. Gelatinase and catalase activity

Gelatinase activity was observed for an increasing number of isolates with increasing incubation temperatures (from 25°C to 30°C). The enzyme was produced by 8.69% (isolates 15(3) and 26(3)), 26.08% (isolates 5(3), 15(3), S5 (1), R12(6), R21(6), R27(6)) and 34.78% (isolates 3(3), 15(3), 27(3), 6(4), 8(4), S5(1), R12(6), R26(6)) of isolates grown at 25°C, 28°C and 30°C, respectively. For isolate 15(3), the production of this enzyme was very efficient, being able to degrade gelatin at all temperatures stipulated. A distinct behavior was observed for catalase, for which all isolates (100%) reacted with hydrogen peroxide.

## 5. Discussion

Actinomycetes are characterized by the ability to produce a large variety of secondary biologically active metabolites, such as vitamins, enzymes and antibiotics [6]. These microorganisms or their enzymes have an array of biological, industrial and



environmental applications, like polymer hydrolysis, synthesis of chemicals, soil decontamination, biological control of diseases, and decomposition of organic matter.

The actinomycete isolates analyzed in the present study exhibited mean EI between 0.8 and 7.1, considering the three temperatures stipulated and the enzymes investigated. According to Fungaro and Maccheroni [16], EI values above 1.0 indicate enzymes with biotechnological potential. The hydrolysis of specific substrates by actinobacteria presented higher mean EI values when incubation was carried out at 25°C, while the highest number of isolates presenting activity was observed when incubation was conducted at 30°C. This may be due to the different nutritional and environmental demands of each isolate has concerning the optimal conditions to produce a given enzyme or other secondary metabolites. Variation in the production of enzymes by actinobacteria was reported by Duarte [17] in a study that found that temperature changes in the incubation of actinobacteria in the soil interferes with the capacity to produce enzymes, which is specific in terms of enzymatic activity. The author also observed that, except for gelatinase and lipase, the enzymatic activity amylase, caseinase, pectinase and cellulose were detected in a wide range of temperatures (25°C to 40°C). The results of the present study confirm this variation, showing that the hydrolysis of different specific substrates is associated with incubation conditions. In this sense, the mesophile or thermophile character and the niche of isolates has to be considered in this kind of investigation. According to Gomes et al. [18], there is a narrow relationship between the niche taken by a microorganism and its intra- and extracellular enzymatic profile.

The hydrolysis of starch, the most important organic compound in terms of energy storage, formed by two glucose polymers (amylose and amylopectin), was observed for 100% of isolates grown at three temperatures in the present study (Fig. 1). The occurrence

of amylase in actinomycetes is commonly observed in *Nocardia* and *Streptomyces* [19]. Our results are similar to the findings by Karanja et al. [20] who observed the amylolytic hydrolysis with EI between 3.4 and 5.2 for all *Streptomyces* species isolated from soils in Kenya. Ayhsa et al. [21] reported an EI of 1.2 for *Actinomyces pyogenes*. The hydrolysis of this substrate by actinobacteria was also reported by Rodrigues [22], who analyzed the production of extracellular enzymes by 188 actinomycete isolates, observing a predominance of the genera *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Streptomyces* and *Terrabacter* in the hydrolysis of starch. Sousa et al. [23], in a study on the role of *Streptomyces* isolates in the growth promotion of plants and in the biological control of phytopathogens, observed that the isolates investigated produced amylase, lipase and catalase.

Pectinases are present in plants and microorganisms, such as bacteria, yeasts and filamentous fungi [24]. These enzymes are used mainly in the juice, food [25] and paper [26, 27] industries. These enzymes are important for plants, since they play an important role in cell wall extension [28], infections [29], apart from helping in the maintenance of ecological balance due to their ability to decompose and recycle plant waste. In the present study, 90.30% of isolates hydrolyzed citric pectin, with the highest EI observed for actinomycetes grown at 25°C (Fig. 2). Duarte [17] observed similar results in a study that evaluated the hydrolysis of citric pectin by actinobacteria isolated from soil, with a direct relationship between the rise in temperature from 25°C to 30°C and the drop in the number of isolates that produced the enzyme. In a study that characterized the production of pectinases by *Penicillium oxalicum*, Santi [30] observed that the optimal temperature for the production of polygalacturonase was 32°C, while for pectin lyase and pectinesterase optimal values were observed at 28°C. According to Gummandi and Panda [31] the presence of several pectins in plant cells requires microorganisms to produce

pectinases with different mechanisms of action to degrade these compounds. Considering that endophytic bacteria used in the present study are mesophiles and that the pectin lyase degrades specifically the citric pectin, it is possible to suggest that the lyase in these isolates acts in the production of this enzyme at an optimal temperature of 25°C.

Cellulose is the most abundant polysaccharide in the plant biomass, accounting for between 20% and 50%, and is degraded by several enzymes produced by a number of microorganisms, such as cellulases [32, 33]. These microorganisms play an important role in the decomposition of organic matter, mineralization of nutrients and in the promotion of plant growth. They also may act as agents in the biocontrol of some phytopathogenic Oomycetes, like *Phytophthora* and *Pytium*, whose cellulose content in cell wall is between 17% and 35% [34].

Here, 26.08% of endophytic actinobacteria collected from tomato plants produced cellulases, independently of incubation temperature (Table 1). It is known that actinobacterium isolates from compost piles produced cellulases when incubated at temperatures between 35°C and 37°C [35, 22]. Similar results were obtained by Sousa et al. [23] in studies that observed a high number of actinobacteria (over 95%) able to produce cellulases by hydrolysis of microcrystalline cellulose in the medium, when incubation temperature was  $28\pm 2^\circ\text{C}$ . Therefore, the detection of a low number of endophytic actinomycetes (8) isolated from tomato plants that were able to degrade cellulose in the present study may be linked to the use of CMC, a specific substrate, and to incubation temperatures (25°C, 28°C, and 30°C). It is possible to speculate that these isolates may show a better result for CMC hydrolysis when incubated at higher temperatures, since the number of isolates producing cellulase increased with temperature (Table 1) or more that CMC was not a good substrate for these isolates, some other assays

must be done using different substrates in order to confirm this behavior of the isolates. Schrempf and Walter [36] observed that *Streptomyces reticuli* produces cellulases only when grown in microcrystalline cellulose, and that growth in glucose, glycerol or CMC inhibits the production of these enzymes, which present optimal activity at 55°C and neutral pH. Li et al. [37, 38] reported the production of cellulases by *Streptomyces* spp. that present excellent activity at the 50°C-55°C temperature range. *Streptomyces rochei* produces endoglucanases and  $\beta$ -glycosidase when grown at 42°C [39].

Of the *Streptomyces* species isolated by Ramirez and Cocha [40], 92% presented cellulolytic activity in CMC in filter paper. Wirth et al. [41] analyzed 39 *Streptomyces* isolates, 11 degraded pure, amorphous or crystalline cellulose, 11 degraded colloidal forms but did not hydrolyze native and crystalline cellulose, and only 17 isolates were able to hydrolyze CMC. Similar results were observed by Wachinger et al. [42] in a study that analyzed 160 isolates: 100% hydrolyzed soluble cellulose, but only 15% hydrolyzed microcrystalline cellulose.

In the present study, of the 23 tested isolates to detect the production of lipases and esterases, over 91% were able to degrade long-chain and short-chain esters at a 25°C-30°C temperature range. These results confirm the findings by Rodrigues [22] in a study that investigated actinobacteria from a compost pile. Lipases (olive oil) and esterases (Tween 80) were produced by 44% and 88% of isolates, respectively. In another study on soils impacted with oil-derived hydrocarbons but without history of contamination with hydrocarbons, the production of lipase and esterase by actinomycetes isolated from the soil was higher than 80%, while the actinomycetes isolated from contaminated soils presented hydrolysis rate 10% higher from the results obtained with the actinomycetes from the non contaminated soil [17].

The biotechnological potential of *Streptomyces* to produce lipases and esterases was also reported by Karanja et al. [20]. The authors reported maximum EI of 4.2 and of 5.3 for the hydrolysis of Tween 20 and Tween 80, respectively. Here, the results obtained are more promising, with mean EI for lipases and esterases of 7.6 and 3.7, respectively, while for Tween 20 maximum hydrolysis observed was EI of 16, higher than that observed for the detection of Tween 80 by esterases (EI = 7) (Fig. 3 and Fig. 4).

The production of lipases and esterases is a typical characteristic of several microorganisms, and is influenced mainly by growth conditions. In the present study, isolates R18(6) and 3(3) were not able to degrade lipases and esterases, respectively. These results may be linked to the narrow incubation temperature range and/or specificity of substrates used. Some authors claim that these enzymes are substrate-specific and, thus, their activities vary with the triacylglycerol composition of oils used [43, 44]. According to Vieira [45], olive oil contains high levels of oleic acid (63%), a substrate preferentially degraded by lipases.

Esterases play an essential role in the synthesis of some clinically important medical drugs. Esterases produced by *Trichosporon brassicae* and other microorganisms, such as *Rhodococcus* spp. and *Bacillus circulans* may produce large amounts of compounds with therapeutic applications. Esterases produced by *Pseudomonas* spp. produce drugs with anti-inflammatory properties, like ibuprofen [46]. For Biely et al. [47], the hydrolysis of ethylene glycol and the hydrolysis of aspirin can be carried out by *Streptomyces lividans*.

In a study that characterized endophytic bacteria, isolated from plants of the Cerrado biome, presenting potential use in bioremediation, the most commonly detected isolates (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus pasteurii* and *Pseudomonas* spp.) were able to

promote plant growth and to degrade esterases,  $\beta$ -glucosidases, amylases and proteases. In the present study, protease detection based on casein and gelatin hydrolysis varied with the substrates used. The presence of caseinase was confirmed for 65.21% of the endophytic bacteria incubated between 25°C and 30°C. Except for isolate 5(3), the other isolates presented EI higher than 1.0 but lower than 3.0 (Table 1). These results were lower than those obtained by Karanja et al. [20], who observed EI values between 3.0 and 7.4 in the proteolytic hydrolysis of low-fat milk by *Streptomyces* isolates incubated between 27.5°C and 32.5°C.

Azeredo et al. [48] reported that *Streptomyces* isolated from soil in the Cerrado biome were able to hydrolyze gelatin, casein and bovine albumin, which is commonly observed in these microorganisms. In the present study, 34% of isolates hydrolyzed gelatin when grown at 30°C, while only 17.39% presented activity when incubated at 25°C or 28°C (Table 1). These values are lower than those found by Rodrigues [22] who observed the hydrolysis of gelatin by 40% of actinobacteria incubated at 35°C. Goshev et al. [49] observed similar results for thermophile actinomycetes, whose proteolytic activity fell when the temperature rose from 60°C to 70°C.

Catalase was produced by all isolates used in the present study, independently of incubation temperature. In a previous study, Sousa [23] observed that all *Streptomyces* isolates produced lipase, amylase and catalase, which play important roles in growth promotion and biological control of plant diseases. Some actinomycetes, like *Streptomyces coelicolor*, produce three different catalases [50] as a protection mechanism against osmotic and oxidative stress. The most important (*catA*) is induced by hydrogen peroxide.

Here, some of the actinobacteria tested were proven to be potential producers of

extracellular enzymes; however, only isolate R26(6) was able to hydrolyze all substrates used. Catalase, lipase, esterase, pectinase and starch were produced by a considerable number of isolates (86.95%), which exhibited mean EI between 2.9 and 7.5. Still, only a few isolates degraded casein, carboxymethylcellulose and gelatin. Actinobacteria play an important role in the sustainability of ecosystems in the natural environment. These organisms, due to the ability to produce antibiotics and several enzymes, have a wide array of industrial applications. The high efficiency and selectivity of reactions they catalyze are important features in industrial processes, which make these microorganisms an attractive choice, fostering further investigations in the attempt to find new sources of actinomycetes. In this sense, the results obtained in the present study underline the biotechnological potential of some of these isolates, and may add to the development of new, efficient industrial processes in sectors these microorganisms are useful.

## 6. Acknowledgements

We would like to thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship and financial support for this work realization.

## 7. References

1. Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2003; **69**:6189–200.
2. Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M. Actinomycetes in biotechnol Tech. London: *Academic Press Limited*, 1988; p. 501.
3. Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ*, 1999;

74:65-76.

4. Ezziyyani M, Perez C, Requena M, Ahmed AS, Candela ME. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de biologia*, 2004; **26**:61-8.
5. Moreira FMS, Siqueira JO. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª Ed. Atual ampliada. Minas Gerais: *Universidade Federal de Lavras* (UFLA), Brazil, 2006; p.729.
6. McCarthy AJ, Williams ST. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene*, 1992; **115**:189–92
7. Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol*, 2002; **68**:2161–71
8. Oliveira MF, Silva MG, Sand SVD. 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 in Microbiol*, 2010; **161**:565-72.
9. Pereira DS, Gomes R, Semêdo LTAS. Potencial das actinobactérias na biodegradação de hidrocarbonetos. *Revista Eletrônica TECCEN Vassouras*, 2012; **5**:71-96.
10. Cao L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; **39**:425–30.
11. Conn HJ, Bartholomew JW, Jennison MW. Staining methods. In: Conn HJ, Jennison MW, editors. *Manual of Microbiological Methods*, New York: McGraw-Hill; 1957, pp 10–36.



12. Tuncer M, Kuru A, Isikli M, Sahin N, Celenk FG. Optimization of extra-cellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. *J Appl Microbiol*, 2004; **97**:783-91.
13. Sierra G. A. Simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Laeuwenhoek*; 1957; **23**:15-22.
14. Mariano RLR, Michereff SJ, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: Mariano RLR, editor. Manual de práticas em Fitobacteriologia. Cidade:Recife Editora: *UFRPE* Brazil, 2000; pp. 115-119.
15. Lin JE, Chang DCN, Shen GJ. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechnol Tech*, 1991; **5**:275-80.
16. Fungaro MHP, Maccheroni Jr. W. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos. In: Melo IS, Valadares-Inglis MC, Nass LL, Valois ACC, editors. Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo. Jaguariúna: *Embrapa Meio Ambiente*, 2002. p. 426- 53.
17. Duarte MW. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo: produção de metabólitos secundários por actinomicetos de solo. Monography of Bacharel in Biological Science, Bioscience Institute Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, 2009. p. 33.
18. Gomes E, Guez MAU, Martin N, Silva R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova*, 2007; **30**:136-45.
19. Vigal T, Gil JA, Daza A, García-González MD, Martín JF. Cloning characterization and expression of an alpha amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Mol*

*Gen Gent*, 1991; **225**:278-88.

20. Karanja EN, Boga HI, Muigai AW, Wamunyokoli F, Kinyua J, Nonoh JO. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. *Scientific Conference Proceedings*, 2010; p. 17-30.

21. Aysha JIC, Edweis CB, Jose DGV (2006) Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **49**:353-9.

22. Rodrigues K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. MSc Dissertation. Agricultural and Environmental Microbiology Post-Graduation. *Universidade Federal Rio Grande do Sul*, Brazil, 2006; p. 129.

23. Sousa CS, Soares ACF, Garrido MS. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci. Agri Piracicaba Brazil*; 2008; **65**:50-5.

24. Whitaker JR. Microbial pectolytic enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. *Microbial Enzymes Biotechnol.* London: Elsevier Applied Science, 1990; pp. 133-75.

25. Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microb Biot.* 2000; **16**:277-282

26. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Biochem Biotechnol* 2001; **56**:326–38.

27. Viikari L, Tenakanen M, Suurnakki A. Biotechnology in the pulp and paper industry. In: Rehm HJ, editor. *Biotechnol.* Frankfurt: VCH-Wiley, 2001; pp. 523-46.

28. Ward OP, Moo-Young M. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. *Crit Rev Biotechnol*, 1989; **8**:237-74
29. Chatterjee AK, Starr MP. Genetics of *Erwinia* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 1980; **34**:645-76.
30. Santi L. Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de mestrado. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005, p.90.
31. Gamundi SN, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. *Process Biochem.* 2003; **38**:986-96
32. Murashima K, Kosugi A, Doi YRH. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulosovorans*. *J Bacteriol*, 2002; **184**:5088-95.
33. Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius YIS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; **66**:506-77.
34. Lima LHC, De Marco JL, Felix CR. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle por micoparasitismo. In: Melo IS, Azevedo JL, editors. Controle biológico. Jaguariúna: *EMBRAPA – CNPMA*, 1998; p. 263-304.
35. Salamoni SP. Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. isolado de processo de compostagem. MSc dissertation. Agricultural and Environmental Microbiology Post-Graduation. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brazil, 2005; p. 96.
36. Schrempf H, Walter S. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. *Int J Biol*

*Macromol*, 1995; **17**:353-55

37. Li X, Gao P. CMC-liquefying enzyme a low molecular mass initial cellulose-decomposing cellulases responsible for fragmentation from *Streptomyces* sp. LX. *J Appl Microbiol*, 1997; **83**:59-66.

38. Li X, Lin W, Gao P, Chen F. Endoglucanase S, a novel endocellulase exhibiting exoglucanase activity from a newly isolated *Streptomyces* sp LX *J Appl Microbiol*, 1998; **85**:347-58.

39. Tamburini E, Perito B, Mastrome G. Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (eg IS) in *Streptomyces rochei* A2. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; **237**:267-72.

40. Ramirez P, Cocha JM. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termofílico: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 2003; **10**:67-77.

41. Wirth S, Ulrich A. Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. *Syst Appl Microbiol*, 2002; **25**:584-91.

42. Wachinger G, Bronnenmeier K, Staudenbauer WL, Schrempf H. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. *Appl Environ Microbiol*, 1989; **55**:2653-7.

43. Nithangeni MB, Patterton HG, Tander AV, Vergeer WP, Litthauer D. Over-expression and properties of purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases *Enzyme Microbial Technol*, 2001; **28**:705-12.

44. Edem DO. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review. *Plant Foods Hum Nutr*, 2002; **57**:319-41.

46. Kim GJ, Cha CJ, Cerniglia CE. Purification and characterization of an erythromycin resistant *Pseudomonas* sp. GD 100. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002; **210**:239-44.
47. Biely P, Kremnick L, Greene RV, Dupont C, Kluepfel D. Substrate specificity and of action of acetyl-xylan esterase from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 1996; **396**:257-60.
48. Azeredo LAI, Castilho LR, Leite SGF, Freire DMG, Coelho RRR. Protease from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. Optimization of culture medium employing statistical experimental design. *Appl Biochem Biotechnol.* 2003; **105**:749-55.
49. Goshev I, Gousterova A, Vasileva-Tonkova E, Nedkov P. Characterization of the enzyme complex produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strain growth on collagen-rich materials. *Process Biochem.* 2005; **40**:1627-31.
50. Hahn JS, Oh SY, Chater KF, Cho YH, Roe JH. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- sensitive fur-like repressor *CatR* regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**:38254-60.

## **CAPÍTULO 3**

### ***IN VITRO* BIOCONTROL POTENTIAL OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA AGAINST *BIPOLARIS SOROKINIANA*<sup>1</sup>**

5

---

<sup>5</sup> Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Research in Microbiology

***In vitro* biocontrol potential of endophytic actinobacteria against *Bipolaris sorokiniana***

**Elisandra Minotto <sup>a</sup>, Luciana Pasqualini Milagre <sup>a</sup>, Cristina Spadari <sup>a</sup>,  
Thaís Feltrin <sup>a</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand <sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup> Laboratório de Micologia Ambiental, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Sueli T. Van Der Sand. email: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

## 1. Abstract

Actinobacteria secrete substances that limit or inhibited the growth of phytopathogenic fungi and may be used in the biocontrol of these microorganisms. This study evaluated the physiological and enzymatic activity of tomato plant endophytic actinobacteria and their inhibition of *Bipolaris sorokiniana* based on the production of secondary metabolites. Their efficiency to colonize wheat seedlings was also assessed. Antibiosis was analyzed using the double-layer method, the agar well diffusion test, volatile metabolites, chitinase, glucanase, siderophores, indole-3-acetic acid, nitrogen fixation, phosphate solubilization and root colonization. Isolates with the highest antifungal potential were used to optimize the production of active compounds in submerged culture. Enzymatic and physiological activities were evaluated at different incubation temperatures. A significant number (69.6%) of actinobacteria presented antifungal activity against at least one *B. sorokiniana* isolate. Of these, 17% produced a crude extract with inhibition halos over 2 cm. The highest production of bioactive metabolites was at 30°C after 72h of incubation. The four isolates selected produced volatile compounds, chitinase, glucanase, siderophores, and exhibited nitrogen fixation, produced indole-3-acetic acid and root colonization. Only one isolate was not able to solubilize phosphate. The results obtained indicate that the isolates selected have good biocontrol potential and may be tested *in vivo*.

**Keywords:** Antagonist actinobacteria, antifungal activity, biocontrol, spot blotch, lytic enzymes.



## 2. Introduction

Wheat is the main cereal used in human nutrition. However, the species is susceptible to an array of phytopathogens. These microorganisms cause considerable damage to wheat plantations, reducing yields and increasing the need to use fungicides, which in turn selects resistant strains and increases production costs. Synthetic fungicides currently used pose a considerable health hazard to animals, man and the environment, mainly due to the low specificity of these compounds.

Several diseases affect wheat cultures. One of the most relevant is caused by *Bipolaris sorokiniana* Sacc (teleomorph *Cochliobolus sativus*, Ito & Kurib.), a hemibiotrophic fungus. The phytopathogen is the causal agent of spot blotch, one of the most damaging diseases in wheat, which causes losses of between 20% and 80% in yields, apart from other diseases in gramineous species [1]. The fungus attacks all organs of the plant, from the stem to the head, and disseminates through the remains of previous harvests and host plants and seeds [2]. Depending on how favorable are the conditions, the disease occurs throughout the culture cycle.

Fungicides have been recommended to prevent the losses caused by the pathogen, to treat both seeds and to fight the disease already established in the plantation [2]. The difficulty to control spot blotch is worsened by the wide distribution of *B. sorokiniana*, its high genetic diversity and the association it forms with several host plants. In light of the need to develop economically viable control alternatives that are less aggressive to human health and to ecosystems, these factors have prompted the development of new methods, like biocontrol.

Biocontrol is based on the use of beneficial microorganisms and is considered an important, technically justified alternative. It maintains balance in agricultural

ecosystems, protecting hosts against significant damage caused by phytopathogens [3].

In this regard, actinobacteria have been indicated as potential biocontrol agents against plant diseases. Several researchers have described the *in vitro* and *in vivo* activities of these microorganisms [4,5,6]. Several are their action mechanisms, which include parasitism of hyphae and lytic enzymes [7], competition with pathogens [9], production of antibiotics [10], of siderophores [4] and pesticides [11]. A previous study discovered that endophytic *Streptomyces* may promote the growth of plants, increasing nutrient assimilation and the production of secondary metabolites [5].

In this scenario, the present study evaluated the physiological and enzymatic activity as well as the capacity of endophytic bacteria isolates to suppress *B. sorokiniana* based on the production of secondary metabolites. The efficiency of these isolates in the colonization of the roots of wheat seedlings was also assessed.

### **3. Material and methods**

#### *3.1. Microorganisms*

Twenty-three actinobacteria were obtained from the roots of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). Twenty-two *B. sorokiniana* isolates from different Brazilian regions were provided by EMBRAPA – Passo Fundo, RS, Brazil. All biological material used in this study has been deposited in the collection of the Environmental Mycology Laboratory, DMPI, ICBS, UFRGS, RS, Brazil.

#### *3.2. Antifungal activity*

The antifungal activity of the 23 actinobacteria selected was assessed using 22 *B. sorokiniana* isolates. Actinobacteria were inoculated using the spot method in starch

casein agar (SCA) medium (10 g starch, 0.3 g casein, 2.0 g KNO<sub>3</sub>, 2.0 g NaCl, 2.0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g CaCO<sub>3</sub>, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15.0 g agar, distilled water to complete 1L) and incubated at 28°C for 7 days. After, the antibiosis of actinobacteria against *B. sorokiniana* isolates was assessed using the double-layer agar method. In this evaluation, 10 mL potato dextrose agar (PDA) was melted and inoculated with a *B. sorokiniana* suspension (10<sup>6</sup> spores/mL), poured on actinobacterium colonies and incubated at 28°C for 4 days. The assay was carried out in triplicate. Antibiosis was determined by mensuration of two directions halos and colonies. Antibiosis index (AI) was determined as the ratio halo/colony, that is, the mean difference in halo diameter and colony diameter [41].

### 3.3. *Production of antifungal compounds in submerged culture*

Endophytic bacteria that exhibited a wide activity spectrum in the double-layer assay were chosen to optimize growth conditions in liquid medium.

Actinomycetes were inoculated in 250mL conic flasks containing 50mL starch casein broth (CS) and incubated at 20, 25, 28, 30 and 40°C for 48 h under standardized shaking and aeration conditions (115 rpm). The pre-inoculum obtained was used in the assay. After, an aliquot containing 10% (v/v) of the pre-inoculum was transferred to new flasks containing 50mL CS broth and incubated under the same conditions described above, for 7 days. Then, 1mL aliquots were retrieved from each flask at 24h intervals, transferred to microtubes and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a new tube. This crude extract was used in the antifungal activity assay.

### 3.4. *Antifungal activity of the crude extract*

The antifungal activity of the crude extract was assessed using the agar well diffusion test, for actinomycetes isolates that showed higher AI ( $\geq 2.0$  cm) against at least one pathogen isolated from the double-layer. Pre-inoculums of these isolates were multiplied under the conditions previously determined in the optimization assay for the production of compounds. In this assay, five *B. sorokiniana* isolates (98004, 98012, 98032, 98040 and 98041) were used to assess antifungal activity. These isolates were selected based on the results obtained in virulence (chapter 1) tests done before by our research group. The first three isolates were more aggressive to leaves and coleoptile, while the others were more harmful to seeds.

Petri dishes containing PDA medium were inoculated with 200  $\mu$ L of a suspension containing  $1 \times 10^6$  spores/mL of each test isolate. A metal cylinder (9 mm in diameter) was used to punch wells in the PDA medium. A 100 $\mu$ L aliquot of the crude extract produced by actinomycetes was transferred to these wells. Dishes were incubated at 4°C for 18 – 20h to ensure metabolite diffusion and then incubated at 28°C for 4 days in the dark. Then, antifungal activity was determined measuring halos (in two directions, expressed as cm). The assay was carried out in duplicate, and the procedure was repeated for each of the different temperatures.

### 3.5. *Pairing of cultures and volatile compounds*

Actinomycete isolates were tested against *B. sorokiniana* using the pairing of cultures in dishes containing PDA and with overlapping dishes. Pairing of cultures was carried out to analyze the direct antagonistic action of actinobacteria against *B. sorokiniana*. The overlapping dishes technique was used to observe the production of volatile compounds produced by actinobacteria, which may influence the growth of

phytopathogens [13]. Dishes were inoculated according to each test and incubated at 28°C in the dark.

The pairing of cultures was assessed after a 7 days incubation period. Antagonic activity of actinobacteria was determined as the distance between the edges of the antagonist colony and the phytopathogen. Production of volatiles was recorded after 192h and 336h of incubation based on the growth of fungal mycelia. Fungal growth inhibition (%) was calculated using the formula  $(R1 - R2/R1) \times 100$ , where R1 is the radial growth of the fungus with no exposure to actinobacteria, and R2 is the radial growth of the fungus inoculated with the actinobacterium. All experiments were carried out in triplicate.

### 3.6. *Enzymatic and physiological characterization*

Actinomycete isolates were tested for their capacity to solubilize siderophores, hydrolyze chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanase, produce siderophores and indole-3-acetic acid (IAA) and to fix nitrogen. Except for the production of IAA, which was determined only at 28°C, all other assays were carried out at 15, 28 and 30°C. All assays were carried out in triplicate and the data obtained were analyzed using the analysis of variance and the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ) for comparison of means in the software SASM-Agri [14], when necessary.

### 3.7. *Production of chitinase and $\beta$ -1,3-glucanase*

The production of chitinase (EC3.2.1.14) and  $\beta$ -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) by actinomycetes was detected based on a previous study [15]. Actinomycetes were grown in minimum salt medium [16] supplemented with 0.08% chitin and 0.5% laminarin, respectively, as single carbon source. After 14 days of incubation, chitinolytic activity of isolates was measured based on the visualization of a hyaline hydrolysis zone around

colonies. The formation of yellow to orange zones (developed using congo red) around colonies indicates the hydrolysis of  $\beta$ -1,3-glucane. AI was determined as described above.

### 3.8. *Phosphate solubilization*

The phosphate solubilization assay was carried out as described elsewhere [17]. Actinomycete isolates were previously grown in NBRIP solid medium (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium devoid of yeast extract). Then, isolates were inoculated using the spot method and incubated for 21 days. The evaluation was determined based on the presence (phosphate solubilizers) or absence of halos under the colony growth.

### 3.9. *Production of siderophores*

The production of siderophores by actinomycetes was assessed as previously described [18]. Isolates were inoculated using the spot method in trypticase soy agar (TSA) 1/10 supplemented with chrome-azurol S complex ([CAS/iron(III)/hexadecyltrimethyl ammonium bromide]. Dishes were inoculated for 14 days. The positive reaction for isolates that are able to produce siderophores was signaled by the formation of a yellow halo around colonies grown in a blue-green medium.

### 3.10. *Production of indole-3-acetic acid (IAA)*

Production of IAA by actinobacteria was assessed as described elsewhere [19]. Isolates were inoculated in TSA 10% supplemented with tryptophan 5mM and incubated at 28°C for 14 days under standardized shaking and aeration conditions. After, cultures were centrifuged and 2mL of the supernatant was transferred to test tubes containing 1 mL Salkowski reagent [19]. The mixture was incubated at 28°C for 30 min in the dark.

The evaluation was carried out in a spectrometer at 530nm [20]. IAA was determined ( $\mu\text{g/mL}$ ) preparing a calibration curve with different concentrations of synthetic IAA (0, 1, 2, 3, 6, 10 and 16  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.11. *Nitrogen fixation*

Nitrogen fixation by actinomycete isolates was assessed as described in the literature [21]. Samples were inoculated using the spot method in semisolid NFb medium (biological nitrogen fixation) and incubated at 25, 28 and 30°C for 14 days. Positive reaction was indicated by the presence of a halo in the culture medium [21].

### 3.12. *In vitro colonization of wheat seedling roots by actinomycete isolates*

Seeds of wheat cultivars BRS Buriti and BRS Camboatá were submitted to surface disinfection and then microbiolization. Seeds were immersed in separate suspensions containing propagules of the four actinomycetes chosen with shaking for 4h at 25°C. Suspensions were prepared growing microorganisms in ACA medium for 10 days at 28°C. After, cultures were washed in saline 0.85% to release bacterial propagules. The solution was collected and concentration was adjusted to  $A_{540} = 0.50$ .

After microbiolization, two seeds of each wheat cultivar were transferred to tubes containing agar-water (0.8%). The tubes were incubated at 25°C under 12h photoperiods for 7 days. Colonization of roots of wheat seedlings by actinomycetes was assessed as described in the literature [23]. The presence of actinomycetes in roots was sliced in 2-3cm long fragments and placed on ACA and BDA culture media.

The experimental design of this totally randomized as five repeats, with four actinomycete isolates, two wheat cultivars (BRS Buriti and BRS Camboatá). Uninfected

seeds immersed in saline were used as negative control, while tomato seeds submitted to microbiolization with actinomycetes were used as positive control.

#### 4. Results

##### 4.1. Antifungal activity

All actinomycete isolates inhibited at least one *B. sorokiniana* isolate (Fig. 1). The data reveal a wide variation in AI means, with the lowest value below 0.5 for isolates 26(3), R24(6) and 2(1), and above 2.0 for isolates 6(40), R18(6), 6(2) and 15(3).

Of the 23 actinomycetes tested, 69.9% presented antifungal activity, with AI of or above 2.0, against at least one *B. sorokiniana* isolate. Actinomycetes 6(4), 6(2), R18(6), 15(3) and 16(3) presented activity against at least 50% of the *B. sorokiniana* isolates, which represents growth inhibition values of 86.4%, 77.3%, 59.1% and 54.5%, respectively (Fig. 1).

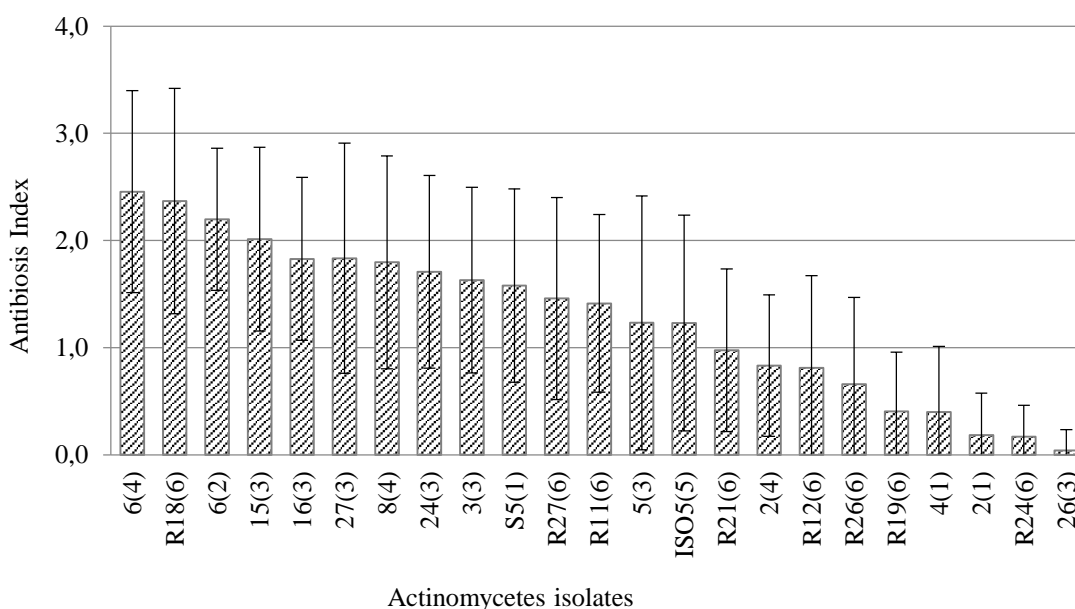


Fig. 2. Antifungal activity of 23 actinomycetes against 22 *Bipolaris sorokiniana* isolates from different Brazilian regions, in the double-layer method. Results are expressed as antifungal index (AI).



The other actinomycete isolates that exhibited inhibition potential [27(3), S5(1), 8(4), 24(3), ISO5(5), 5(3), 3(3), R11(6), R27(6), R21(6) and R26(6)] inhibited the growth of no more than 45% of the *B. sorokiniana* isolates (10), with AI between 4.5% and 45.5%. Isolates 2(1), 4(1), 26(3), R12(6), R19(6) and R24(6) presented the worst inhibition results (Fig. 1).

#### 4.2. *Production of antifungal compounds in submerged culture*

The double-layer method revealed that isolates 6(2), 6(4), 15(3), 16(3) and R18(6) presented high capacity to suppress the growth of *B. sorokiniana*. Of these, isolates 6(2), 6(4), 16(3) and R18(6) were selected to determine the optimal conditions of active compound production in submerged culture. The antifungal activity of crude extracts was evaluated against *B. sorokiniana* isolates 98004, 98012, 98032, 98040 and 98041.

The results show that isolates (2), 6(4) and 16(3) produced the highest amounts of active metabolites against *B. sorokiniana* at 30°C and 72h of incubation in submerged culture. The same was observed for isolate R18(6), but at 20°C and 25°C, and 168h and 72h of incubation, respectively (Fig. 2). Under these conditions, inhibition zones of the first three isolates were 3.3cm, 3.7cm and 3.4cm, respectively. In turn, for isolate R18(6) inhibition zones were approximately 2.1 cm in diameter. On the other hand, this isolate presented the lowest variation in inhibition activity across all temperatures and periods stipulated.

Fig. 2A shows that isolate 6(2) produced active compounds at all incubation times and temperatures. At 40°C, only isolates 16(3) and 6(4) presented inhibition halos, after 48 h and 120 h of incubation, respectively (Fig. 2B, 2C). However, isolate 16(3), when grown at 20°C, exhibited antifungal activity only when incubated for 96h and 168h, while the other crude extracts obtained at all conditions stipulated exhibited antifungal activity

(Fig. 2).

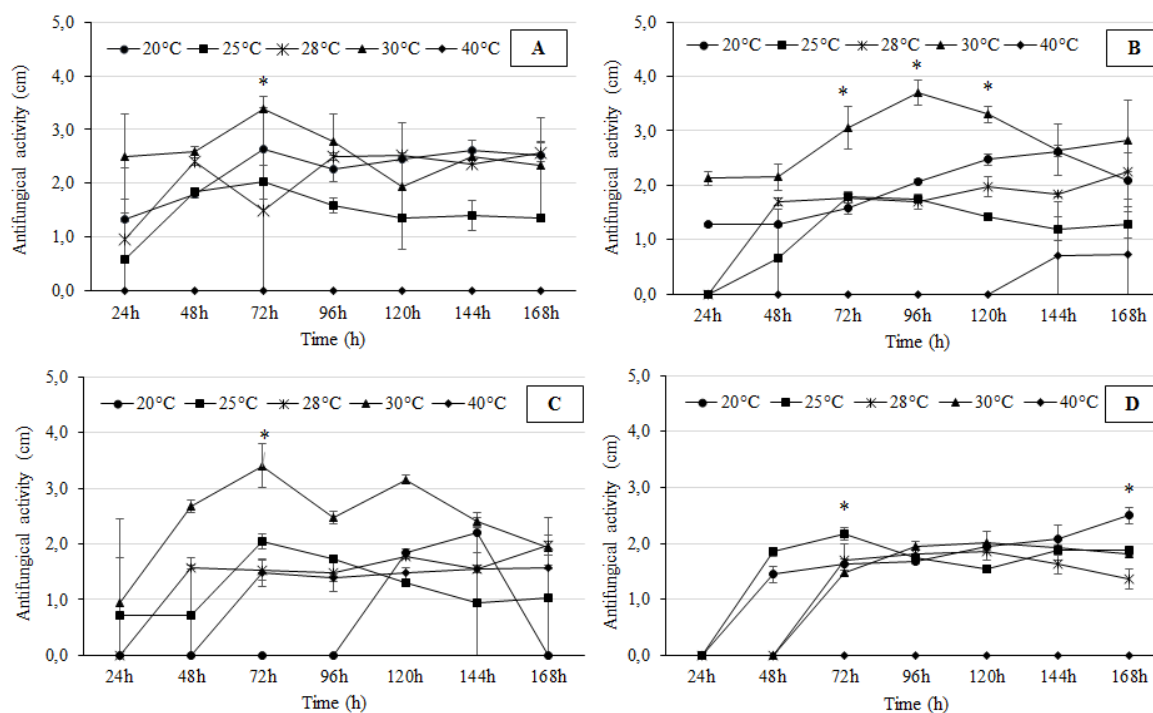


Fig. 3 Production of antifungal compounds with inhibitory activity (cm) by actinomycetes in submerged culture at different incubation times and temperatures. A: Isolate 6(2); B: Isolate 6(4); C: Isolate 16(3); D: Isolate R18(6). \*Statistically significant means in the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ).

#### 4.3. Antifungal activity of the crude extract

According to obtained results of the production assay of antifungal compounds produced by actinomycetes in liquid cultures, the growth occurred from 72 to 120 h and variations were observed in tested temperatures (Figure 2). Due to this fact, the crude extract of the 16 actinobacterias isolates that presented  $\geq 2$  cm activity against at least one phytopathogen isolate in double layer assay were submitted to antifungal test.

Analyzing the results, all crude extracts of 16 actinobacterias isolates in liquid cultures at 20, 25, 28 and 30°C presented phytopathogen inhibition capacity (Figure 3). The average number of actinobacterias isolates with capability to suppress the growth of five *B. sorokiniana* isolates increased with temperature rising (from 3.8 isolates at 20°C to 14.4 at 30°C).

On the other hand, in evaluation of antifungal activity of crude extract, isolates 16(3), 6(4), 6(2) e R11(6) presented activity above 2 cm when submitted to different temperatures (25°, 28° and 30°C). The 16(3), 6(4), 6(2) isolates revealed significant average activity for at least one of these temperatures (Figure 3). Moreover, the 16(3) and 6(2) were the only ones to inhibit the five *B. Sorokiniana* isolates in all temperatures tested. When incubated at 25° and 28°, the 16(3) isolate, demonstrated the highest average antifungal activity; the 6(4) isolate revealed significant activity against phytopathogen at 25° and 30°C. The other two isolates that presented significant inhibition averages were 6(4) and R26(6) at 20° and 30°C, respectively.

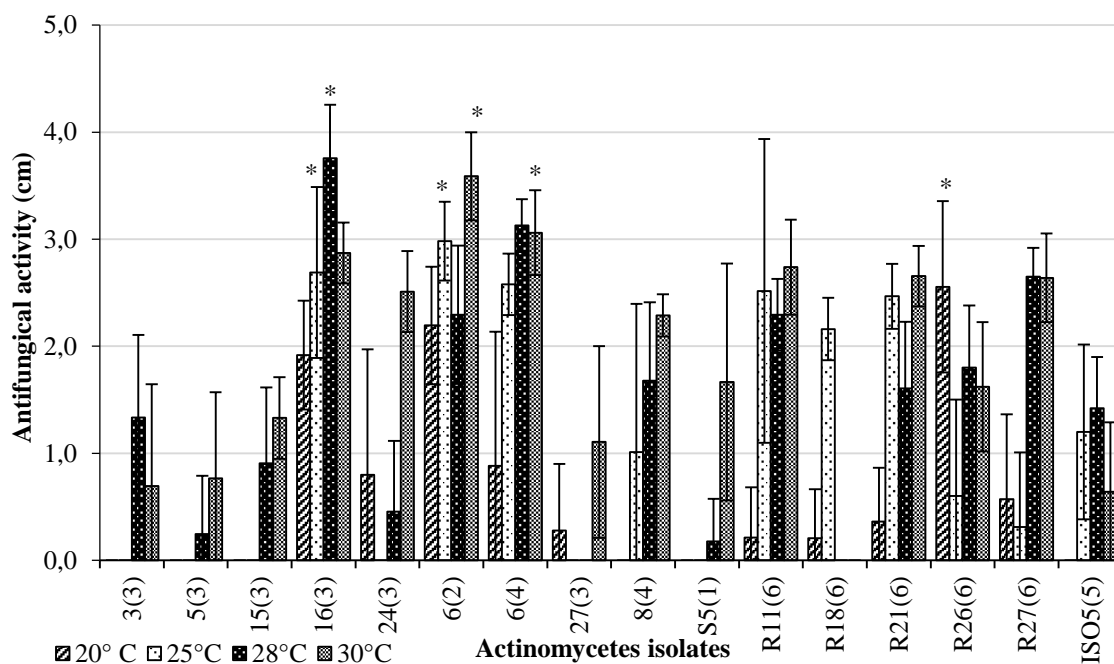


Fig. 4 Antifungal activity (cm) of the crude extract of 16 actinomycetes against five isolates of *B. sorokiniana* isolates, under different incubation temperatures. \*Statistically significant means in the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ).

The 6(2), 6(4), 16(3) e R18(6) isolates were selected to antifungal assays, due to high capacity for active metabolites production in solid medium and liquid culture.

#### 4.4. Pairing of cultures and volatile compounds

The results of the antibiosis assays carried out by direct comparison of two cultures show that isolates 6(2), 6(4), 16(3) and R18(6) suppressed the development of five *B. sorokiniana* isolates (98004, 98012, 98032, 98040 and 98041). Antifungal activity was observed as the formation of an inhibition area  $\geq 2$  cm, between the edge of the colony of the actinomycete and the edge of the colony of the phytopathogen (Fig. 4).

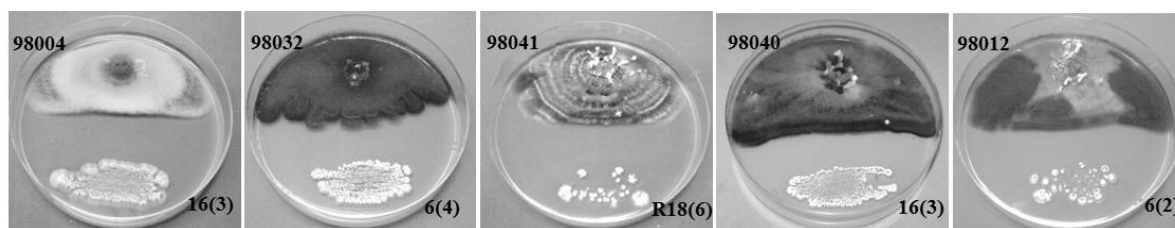


Fig. 4 Pairing of actinomycetes cultures [6(2), 6(4), 16(3) and R18(6)] with *Bipolaris sorokiniana* cultures (98004, 98012, 98032, 98040 and 98041), showing the formation of an inhibition area.

The bioactive volatile compounds produced by the four actinomycete isolates showed increased or decreased the development of the fungal mycelium of *B. sorokiniana* (Table 1), depending on the antagonist and on the phytopathogen isolates and on the exposure time to the metabolites.

*Bipolaris sorokiniana* isolates were more susceptible to the presence of these volatile compounds produced after 336 h of incubation, with reduced mycelial growth of all isolates. This decrease became more intense, from 4.16% (first evaluation, 48h of incubation) to 15.66% (the last evaluation, 336 h of incubation) (Table 1). The exception was R18(6), which exhibited low inhibition percentage (2.47%) after 336h of incubation, though this actinomycete actually favored the development of *B. sorokiniana* mycelia, with negative inhibition between incubation times of 96 h and 264h.

Volatile compounds produced by isolate 16(3) promoted the largest radial increase in fungal mycelia (15.66%) after 264h of incubation (Table 1).

Table 1 Inhibition of *Bipolaris sorokiniana* isolates growth (%) by volatile compounds produced by actinomycetes.

Incubation time (h)	Inhibition of mycelial growth of <i>B. sorokiniana</i>			
	(%) by actinomycete isolates			
	6(2)	6(4)	16(3)	R18(6)
48	4.16	7.54	8.19	0.65
96	4.74	9.38	14.75	-3.37
144	6.26	12.37	13.65	-3.24
192	0.14	12.44	14.79	-2.14
264	8.32	14.10	15.66	-0.26
336	11.54	14.78	13.04	2.74

#### 4.5. *Chitinase and glucanase activities*

The production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by actinomycetes was observed as the hydrolysis of the specific substrate present in specific growth media. The four isolates tested inhibited the two enzymes at 25°C, 28°C and 30°C. The highest hydrolysis rate was observed for isolate 16(3), both against chitinase and glucanase (Figure 5).

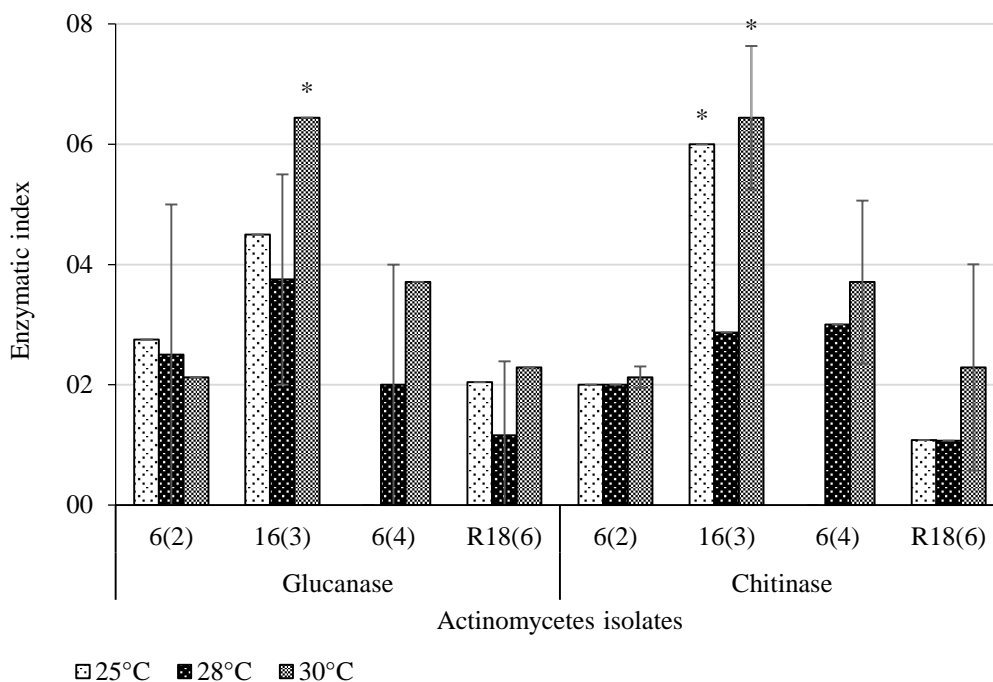


Fig. 5 Activity of chitinase and glucanase produced by actinomycete isolates at different incubation temperatures. \* Statistically significant means in the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ).

#### 4.6. *Physiological activity*

The four isolates were able to fix nitrogen and produce siderophores in at least one of the temperatures they were grown at. The lowest siderophore production was detected for isolate 16(3), and only at 25°C. Similarly, nitrogen fixation by isolates R18(6) and 6(2) was observed only at 28°C and 30°C, respectively (Table 2).

Phosphate solubilization in solid medium showed that isolate R18(6) did not convert atmospheric nitrogen into ammonia, at any of the temperatures stipulated. However, the other isolates exhibited this characteristic at all temperatures (Table 2).

Table 2 Physiological activity (phosphate solubilization, siderophore production, nitrogen fixation) of actinomycete isolates grown at different incubation temperatures.

Actinomycete isolates	Phosphate solubilizaion			Siderophore production			Nitrogen fixation		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
	6(2)	+	+	+	-	+++	++	-	-
16(3)	+	+	+	+	-	-	+	+	+
6(4)	+	+	+	-	++	++	+	+	+
R18(6)	-	-	-	-	++	-	-	+	-

- Isolate with no activity; + Isolate with positive activity and siderophore production and  $H/C \geq 1$ ; ++

Isolate with positive activity and  $H/C \leq 1 \leq 3$ ; Isolate with positive activity and  $H/C \leq 3$ .

#### 4.7. *Production of indole-3-acetic acid*

All actinomycetes incubated at 28°C for 7 days synthesized high levels of auxins, with no statistically significant differences. IAA production oscillated between 337.76 µg/mL by isolate 6(4) and 32.78 µg/mL by isolate R18(6). Isolates 16(3) and 6(4) synthesized 33.58 µg/mL and 33.76 µg/mL of IAA, respectively (Table 2).

#### 4.8. *Colonization of roots of wheat seedlings*

Roots of wheat seedlings of the two cultivars microbiolized with isolates 6(2), 6(4), 16(3) and R18(6) and placed in agar-water 0.8% were colonized. The presence of the actinomycete in the root system was observed as the turbidity of the medium along roots, which characterizes bacterial growth. The confirmation of the presence of actinomycetes colonizing the rhizosphere was obtained by growth of isolates in ACA and ISP2 media.



## 5. Discussion

Actinomycete populations are important components of the endophytic and rhizospheric microbial community of several higher plant species. The production of antibiotics or other toxic metabolites by these microorganisms has been widely reported as a biocontrol tool against plant diseases [14, 25]. Additionally, endophytic *Streptomyces* may improve the agricultural production, reducing the impact of root and crown rot [26].

Of the endophytic actinomycetes investigated in the present study, 69.6% presented significant inhibitory activity against *B. sorokiniana* in the double-layer assay. Of these, isolates 6(2), 6(4), 16(3) and R18(6) were able to maintain high antifungal activity when grown in submerged culture, as well as in the pairing of cultures in solid media. These results are higher than the findings reported in the literature for the inhibition of 6.5% of the fungi *Alternaria solani*, *B. sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersicom*, *Gerlachia oryzae*, *Seclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium albo-atrum* and *Rhizoctonia* sp. with endophytic bacteria [5]. In a previous study that analyzed 191 actinomycete isolates against *Colletotrichum gloeosporioides*, only six inhibited fungal development by 100%.

In a previous study, the largest inhibition zones in the growth of *C. sativus* by *Chaetomium globosum* was 6.3 mm in the pairing of cultures [28]. The authors discovered that the filtered cultures of this antagonist reduced the pathogen's growth by between 19.6% and 100%. In the present work, the crude extracts of actinomycetes inhibited the growth of *B. sorokiniana*, forming inhibition zones of up to 3.7cm in diameter. Similar results were reported in another study, in which antibiosis zones produced by filtered *Streptomyces* cultures reached 39mm in diameter, against Gram-positive and Gram-negative bacteria [29]. Similar results were reported for the inhibition of *Staphylococcus*

*aureus*, *Candida albicans* and *Micrococcus luteus*, with inhibition zones larger than 25mm in diameter [30].

The optimal conditions of metabolite production in submerged cultures are determined by temperature. It is known that optimal growth temperature ranges are wide, of roughly 25°C, while optimal temperature for the production of secondary metabolites lies in a narrow interval, of 5°C to 10°C [31]. In the production of streptomycin by *Streptomyces griseus*, an increase of 1°C leads to a 80% drop in antibiotic production [32]. However, here isolate 6(2) produced antifungal compounds against *B. sorokiniana* throughout the incubation period (168 h). This flexibility in antifungal activity has also been demonstrated by the presence of inhibition halos at 20°C, 25°C, 28°C and 30°C.

The optimal production of secondary metabolites in submerged culture by *Streptomyces* isolates occurs after 240h of incubation at 27°C, with the formation of inhibition zones larger than 25 mm in diameter [3]. A previous study has shown that the mean production times of metabolites with antimicrobial action was between 120h and 240h of incubation [31]. In the present study, the highest production of bioactive compounds was observed at 30°C between 72 and 96h of incubation, with inhibition zones between 3.4cm and 4.1cm in diameter. These results confirm the findings of another study, where the highest production of antimicrobial compounds by *Streptomyces* 1S was between 48h and 120h after incubation at 28°C [33].

Antimicrobial action of isolate R18(6) had been reported against a wide spectrum of important microorganisms in agriculture [5] and medicine [34,35]. This was confirmed in the present study, which shows that this and the other isolates selected exhibited high potential to inhibit de *B. sorokiniana* development, which causes spot blotch.

The volatile compounds produced by *Streptomyces philanthi* RM-1-138 isolated

from the rhizosphere soil of chili pepper suppressed the growth of the *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae* e *Fusarium fujikuroi* (52.85–100 %) [36]. Different results were observed in this study, where the reduction of radial growth of the pathogen was 14.78% shown by isolate 16(3) after 336h of incubation. The evolution of volatile organic compounds by soil microorganisms has been associated to the promotion of plant growth [37] and to the induction of systemic resistance in cultures [38], growth inhibition [39], and germination of spores of pathogenic fungi [40].

Isolates 6(2), 6(4), 16(3) and R18(6), from the *Streptomyces* genus, were selected between a set of 23 actinomycetes because they presented significant antifungal activity in all tests they were submitted to. During the conduction of this study, these isolates exhibited other properties often associated with biocontrol agents, such as the ability to hydrolyze chitin and glucan, to produce siderophores and IAA, to solubilize phosphates, to fix nitrogen and to colonize the rhizosphere of wheat seedlings. Additionally, these isolates are efficient producers of several hydrolases, assessed in previous tests. Studies have shown that the action of *Streptomyces* includes the inhibition of pathogens by the production of antifungal compounds [7], the competition for iron in siderophore production, and the production of hydrolysis enzymes, like chitinase and glucanase [41].

The four isolates tested presented high enzyme index (EI) (>0.6) for the two enzymes, chitinase and glucanase, at 28°C. A previous study has shown that EI higher than 1.0 indicates the secretion of enzymes with biotechnological potential [42]. Also, *Streptomyces* isolates prescribed for the control of white rot in coal and for the growth promotion of plants have been shown to produce significant amounts of chitinase and of  $\beta$ -1,3-glucanase [43]. Additionally, the production of chitinase and of glucanase was the main mechanism associated with the biocontrol potential of *Streptomyces viridodiasticus*

against *Sclerotinia minor* [41]. This was also reported in the control of *Phytophthora fragariae* [44], *Fusarium oxysporum* [45] and other phytopathogens [46].

Microbial enzymes, especially chitinases, are highly important in biocontrol strategies due to their ability (a) to degrade chitin (the main component of the cell wall of most fungi), (b) to inhibit the germination of fungal spores and the elongation of the germinative tube, and (c) to lyse hyphae [47].

The capacity of actinomycete isolates to produce siderophores, to fix nitrogen and to solubilize phosphates has also been reported in a previous study [5]. The authors also observed that IAA was produced by 72.1% of actinomycetes tested, while the 86.8% solubilized phosphates and 16.2% produced siderophores.

Although several bacterial siderophores differ in their ability to sequester iron, as a rule these structures deprive fungi of this essential element due to their higher affinity [48]. Some bacteria that promote plant growth may go beyond, attracting iron of heterologous siderophores produced by co-inhabiting microorganisms [49]. In this sense, the microorganisms selected in the present study may play a beneficial role in plant development, since growth promotion effects are also associated with the production of IAA [4] and phosphate solubilization [50].

In spite of its importance, phosphate solubilization has been reported in a small number of microorganisms [51]. However, the absence of detection does not mean that the microorganism does not have this property. Rather, it may just indicate that the methodology used to detect it is not the suitable. Here, isolate R18(6) did not solubilize phosphate. Nevertheless, a previous study reported that it does indeed exhibit this property [5]. This discrepancy may be explained by the fact that different methodologies were used.

In the rhizosphere soil, root exudates are the natural source of tryptophan for rhizospheric microorganisms, which may increase the biosynthesis of auxin in this site [4]. In the present study, all *Streptomyces* isolates colonized the root system of seedlings of the two wheat cultivars used. This suggests the possibility that high levels of tryptophan are present in wheat root exudates, which may enable the biosynthesis of high amounts of IAA, as the efficient colonization of roots.

Several studies have investigated the antimicrobial and antifungal potential of actinomycetes to test the use of secondary metabolites in the control of diseases caused by phytopathogens. Here, actinomycete isolates were tested for the production of extracellular metabolites often associated with biocontrol strategies, with excellent *in vitro* results for four of these bacteria. Therefore, these *Streptomyces* isolates may be seen as potential agents in the control of *B. sorokiniana*. However, further studies should be carried out to obtain more conclusive results about the effectiveness of these actinomycetes against spot blotch *in vivo*.

## 6. References

- [1] Mehta YR, Manejo integrado de enfermedades del trigo, Centro de Investigación Agrícola Tropical CIAT, Santa Cruz de la Sierra, 1993.
- [2] Reis EM, Casa RT, Doenças do trigo, in Kimati H. et al. (Eds), Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, Agronômica Ceres, São Paulo, 2005, pp. 631-638.
- [3] Grigoletti Júnior A, Dos Santos ÁF, Auer CG, Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais, Floresta 30 (2005) 155–165.
- [4] Khamna S, Yokota A, Lumyong S, Actinomycetes isolated from medicinal plant

rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds indole-3-acetic acid and siderophore production, *World J Microbiol Biotechnol* 25 (2008) 649–655.

[5] Oliveira MF, Germano da Silva M, Van Der Sand, ST, 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 (2010) 565–572.

[6] Sobolevskaya MP, Kuznetsova TA, Biologically active metabolites of marine actinobacteria, *Russ J Bioorganic Chem* 36 (2010) 560–573.

[7] El-Tarabily KA, Sivasithamparam K, Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, *Soil Biol Biochem* 38 (2006) 1505–1520.

[8] Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA, Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen, *Appl Environ Microbiol* 59 (1993) 3899–3905.

[9] Kunoh H, Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents *J Gen plant Pathol* 68, (2002) 249–252.

[10] Igarashi Y, Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes, *Actinomycetologica* 18 (2004) 63–66.

[11] Hasegawa S, Meguro A, Shimizu M, Nishimura T, Kunoh H, Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants, *Actinomycetologica* 20 (2006) 72–81

[12] Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL, Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*, *J Invertebr Pathol* 38 (1981) 1–3.

[13] Hutchinson SA, Some effects of volatile fungal metabolites on the gametophytes of

*Pteridium aquilinum*, *Trans Br Mycol Soc* 50 (1967) 285–287.

[14] Canteri MG, Althaus RA, Giglioti EA, Godoy CV, SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott Tukey e Duncan, *Rev Bras Agrocomputação* 1 (2001) 18–24.

[15] Renwick A, Campbell R, Coe S, Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*, *Plant Pathol* 40 (1991) 524–532.

[16] Tuite J, *Plant pathological methods. Fungi and bacteria* (1969) Burgess Publishing Company, 1969 Minneapolis, Burgess Publishing Co. 239 p.

[17] Nautiyal CS, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, *FEMS Microbiol Lett* 170 (1999) 265–270.

[18] Schwyn B, Neilands JB, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Anal Biochem* 160 (1987) 47–56.

[19] Gordon SA, Weber RP, Colorimetric estimation of indoleacetic acid, *Plant Physiol* 26 (1951) 192.

[20] Hartmann A, Singh, M, Klingmüller W, Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid, *Can J Microbiol* 29 (1983) 916-923.

[21] Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL, Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion, *Environ Microbiol* 6 (2004) 1244–1251.

[22] Oliveira ALM, de Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JI, The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants, *Plant Soil* 242 (2002) 205–215.

- [23] De Queiroz BPV, Aguilar-Vildoso CI, Melo IS, Visualização in vitro da colonização de raízes por rizobactérias, *Summa Phytopathol* 32 (2006) 95-97.
- [24] Cao L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S, Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots, *FEMS Microbiol Lett* 247 (2005) 147–152.
- [25] Qin S, Xing K, Jiang J-H, Xu L-H, Li W-J, Biodiversity bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria, *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (2011) 457–73.
- [26] Coombs JT, Michelsen PP, Franco CMM, Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis var tritici* in wheat, *Biol Control* 29 (2004) 359–366.
- [27] Suwan N, Boonying W, Nalumpang S, Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, *J Agric Technol* 8 (2012) 725–737.
- [28] Aggarwal R, Tewari AK, Srivastava KD, Singh DV, Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*, *Mycopathologia* 157 (2004) 369–377.
- [29] Salamoni SP, Mann MB, Campos FS, Franco AC, Germani JC, Sand ST, Preliminary characterization of some Streptomyces species isolated from a composting process and their antimicrobial potential, *World J Microbiol Biotechnol* 26 (2010) 1847–1856.
- [30] Bervanakis G, Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria: 2008. A thesis submitted for the degree of Masters of Science: 209f. Faculty of Health Sciences, Flinders University, Adelaide, Australia. biotechnology. London. UK:



Academic press Ltd, 1988, p. 329-358.

[31] Iwai Y, Omura S, Culture conditions for screening of new antibiotics, J Antibiot review (Tokyo) 35 (1982) 123-141.

[32] Dunn GM, Nutritional requirements of microorganisms, in Moo-Young M., Bull AT, Dalton H (Eds), Comprehensive biotechnology, Vol. 1, Pergamon Press, New York, Sydney, 1985, pp. 113-126.

[33] Salamoni SP, Van Der Sand ST, Germani JC, Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces sp* 1S Evidência-Ciência e Biotecnol 12 (2012) 175–186.

[34] Carvalho TS, Oliveira DV, Van Der Sand ST, Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos (2012) 154–157.

[35] Spadari C, Antunes T, Teixeira R, Minotto E, Fuentefria AM, Sand S Van Der, Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance, Brazilian Journal of Biosciences v. 11(2013) 439–443.

[36] Boukaew S, Plubrukam A, Prasertsan P, Effect of volatile substances from *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf, BioControl 58 (2013): 471-482.

[37] Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW, Kloepper JW, Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis, Proc Natl Acad Sci 100 (2003) 4927–4932.

[38] Farag MA, Ryu CM, Sumner LW, Paré PW, GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants, Phytochemistry 67 (2006) 2262–2268.

- [39] Fiddaman PJ, Rossall S, Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, *J Appl Microbiol* 76 (1994) 395–405.
- [40] Mckee ND, Robinson PM, Production of volatile inhibitors of germination and hyphal extension by *Geotrichum candidum*, *Trans Br Mycol Soc* 91 (1988) 157–160.
- [41] El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithamparam K, McKenna F, Hardy GESJ, Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes, *Plant Pathol* 49 (2000) 573–583.
- [42] Fungaro MHP, Maccheroni Jr W, Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos, in Melo IS, Valadares-Inglis MC, Nass LL, Valois ACC, (Eds), *Recursos Genéticos e Melhoramento- Microorganismo*, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna São Paulo Brasil, 2002, pp 426-453.
- [43] Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Apparla S, Bandikinda P, Vijayabharathi R, Bhimineni RK, Rupela O, Evaluation of *Streptomyces* spp for their plant-growth-promotion traits in rice, *Can J Microbiol* 59 (2013) 534–539.
- [44] Valois D, Fayad K, Barasubiye T, Garon M, Dery C, Brzezinski R, Beaulieu C, Glucanolytic Actinomycetes Antagonistic to *Phytophthora fragariae* var *rubi* the Causal Agent of Raspberry Root Rot, *Appl Environ Microbiol* 62 (1996) 1630–1635.
- [45] Singh PP, Shin YC, Park CS, Chung YR, Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria, *Phytopathology* 89 (1999) 92–99.
- [46] Cretoiu MS, Korthals GW, Visser JHM, van Elsas JD, Chitin amendment increases soil suppressiveness toward plant pathogens and modulates the actinobacterial and oxalobacteraceal communities in an experimental agricultural field, *Appl Environ Microbiol* 79 (2013) 5291–301.
- [47] Kishore GK, Pande S, Podile AR, Biological control of late leaf spot of peanut

(*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria, *Phytopathology* 95 (2005) 1157–1165.

[48] Loper JE, Henkels MD, Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere, *Appl Environ Microbiol* 65 (1999) 5357–5363.

[49] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, der Lelie D van, Endophytic bacteria and their potential applications, *CRC Crit Rev Plant Sci* 21 (2002) 583–606.

[50] Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y, 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 (2008) 510–517.

[51] Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G, Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna, *Microbiol Res* 163 (2008) 234–242.

## **7. Acknowledgments**

We thank to the Brazilian government program in the name of CAPES/PROAP for the scholarship and financial support of this work.

## **CAPÍTULO 4**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS  
PRESENTES NO EXTRATO BRUTO PRODUZIDO POR ISOLADOS DE  
*Streptomyces* SP. COM ATIVIDADE CONTRA *Bipolaris sorokiniana*<sup>1</sup>**

**Caracterização parcial dos compostos bioativos presentes no extrato bruto produzido por isolados de *Streptomyces* sp. com atividade contra *Bipolaris sorokiniana*.**

**Elisandra Minotto<sup>1</sup>, Ana Elisa Ballarini<sup>1</sup>, Diego Defferrari<sup>2</sup>, Cristina Spadari<sup>1</sup>, Francille Bucker<sup>1</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>1\*</sup>,**

<sup>1</sup> Laboratório de Micologia Ambiental, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular, Departamento de Físico-química, Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brasil.

\*Autor para correspondência: Sueli T. Van Der Sand. e-mail: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

## **1. Resumo**

Três actinobactérias caracterizadas em um estudo anterior foram selecionadas em decorrência do seu alto potencial de produção de compostos bioativos. Estes isolados apresentaram uma ampla atividade antifúngica contra *Bipolaris sorokiniana* e produção de inúmeros metabólitos de origem fisiológica e enzimática necessários a um microrganismo biocontrolador. No presente estudo, foi realizado a classificação taxonômica destes isolados de actinobactérias e a caracterização parcial dos compostos bioativos presentes no

extrato bruto produzido pelos mesmos. Para tanto, as actinobactérias foram submetidas ao crescimento em cultura submersa para determinação da curva de biomassa e produção de metabólitos. Após a obtenção do extrato bruto, avaliou-se a sua estabilidade frente a diferentes temperaturas, pHs, proteases e concentrações de EDTA. O extrato concentrado foi submetido à extração com diferentes solventes orgânicos, purificação parcial em CCD, autobiografia. Os resultados mostraram que os três isolados pertencem ao gênero *Streptomyces* no entanto a diferenciação de espécie não foi determinada, desta forma os isolados ficaram com as denominações *Streptomyces* 6(2), *Streptomyces* 6(4) e *Streptomyces* R18(6). A maior produção de biomassa ao final da fase de crescimento, bem como a maior atividade antifúngica ocorreu para o isolado 6(2). Enquanto que, para o 6(4) e o R18(6), essa atividade foi observada na fase estacionária. O isolado R18(6) demonstrou elevada estabilidade frente à temperatura (60% a 100°C), pH (88%), proteases (78%) e EDTA (90%), quando comparado aos demais. A extração de metabólitos do extrato bruto foi mais eficiente com os solventes acetato de etila e hexano, enquanto que misturas de solventes apresentaram maior eficiência na separação dos metabólitos em CCD.

**Palavras Chave:** antibiose, controle biológico, *Bipolaris sorokiniana*, actinobacteria

## 2. Introdução

As actinobactérias são o grupo de microrganismos mais amplamente distribuído na natureza. Estas têm sido especialmente úteis para a indústria farmacêutica devido à sua capacidade, aparentemente ilimitada, de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. Milhares de tais compostos foram isolados e caracterizados, muitos dos quais foram transformados em medicamentos para o tratamento de uma ampla gama de doenças humanas, veterinárias e agrícolas (Demain and Sanchez, 2009).

Dentre 22500 compostos biologicamente ativos extraídos a partir de microrganismos até o momento 45% são produzidos por actinobactérias, 38% por fungos e 17% por bactérias unicelulares (Demain and Sanchez, 2009). Segundo Bérdy (2005) os Actinomycetales filamentosos produzem mais de 10 mil compostos bioativos, sendo que 7600 são derivados de *Streptomyces* e 2.500 de espécies de actinomicetos raros.

Metabólitos secundários microbianos representam uma grande fonte de compostos dotados de complexas e harmoniosas estruturas e com potente atividade biológica. Segundo Tarkka and Hampp, (2008) os metabólitos secundários de *Streptomyces* podem ser distribuídos em quatro classes de acordo com a sua atividade biológica: (1) agentes antagônicos (antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários e antivirais); (2) agentes farmacológicos (antitumorais, imunomoduladores, agentes neurológicos e inibidores de enzimas); (3) agrobiológicos, (inseticidas, fungicidas e herbicidas); e (4) compostos com atividades de regulação (fatores de crescimento, sideróforos ou

agentes morfogênicos). Devido a estas e outras propriedades as actinobactérias desempenham um papel importante no controle de patógenos habitantes do solo transmitidos às plantas (El-Tarabily et al., 2000), como fungos e bactérias fitopatogênicas. Na cultura do trigo, por exemplo, o fungo *Bipolaris sorokiniana* é o agente causal da mancha marrom, morte de plântulas e ponto preto das sementes, podendo causar reduções no rendimento da produção de 20 a 80% (Mehta 1978; Hetzler et al., 1991). Para evitar as perdas causadas por este patógeno, o controle recomendado, em geral, é a utilização de fungicidas, tanto para o tratamento de sementes como para a doença já estabelecida na lavoura (Reis & Casa, 2005).

Por outro lado, pesquisas com o objetivo de controlar doenças utilizando microrganismos biocontroladores ou produtos do seu metabolismo tem sido desenvolvida com o intuito de reduzir as perdas na produção por ação destes agentes bem como a utilização de produtos químicos que causam a resistência de fitopatógenos e a contaminação ambiental, além de graves problemas à saúde do homem.

Em nossa busca contínua por novos metabólitos bioativos que possam ser utilizados no controle de fitopatógenos, os isolados de actinobactéria endofítica 6(2), 6(4) e R18(6) apresentaram um bom potencial antifúngico e foram selecionadas entre vinte três isolados de tecidos radiculares de plantas de tomate (Oliveira et al., 2010). O presente estudo objetivou a caracterização parcial dos compostos bioativos presentes no extrato centrifugado produzido por estes microrganismos e a classificação taxonômica destes isolados.



### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Micro-organismos**

As actinobactérias foram obtidas a partir de raízes de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), como descrito por Oliveira et al. (2010). Os isolados de *B. sorokiniana* de diferentes regiões do Brasil foram fornecidos pela EMBRAPA - CNPT- Passo Fundo, RS, Brasil. Todo o material biológico encontra-se depositado na coleção da Micologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, parasitologia e Imunologia, localizado no Instituto Ciências Básicas da saúde da Universidade Federal do rio Grande do Sul.

#### **3.2. Análise da sequência do 16S rDNA**

A fim de confirmar a identificação morfológica dos isolados, o DNA genômico dos isolados 6(2), 6(4) e R18(6) foi extraído de acordo com protocolo descrito por Oliveira (2003). O DNA foi amplificado utilizando os primers pA e pF de Edwards et al. (1989). As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µL. Na mistura da reação continha: 10 ng de DNA molde, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de reação 1 X 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 0,3 mM de desoxinucleotídeo, 1 U de Taq polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase) e água Mili-Q estéril. As condições de amplificação foram adaptadas de Salamoni et al. (2010): desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 35 ciclos: 94°C por 1min., 59°C por 1 min., 72°C por 2 min. e uma extensão final a 72°C por 10 min.

O produto da amplificação foi purificado com kit GFX (GE Healthcare) e sequenciado em um sequenciador automático no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

(UFCSPA). No sequenciamento foram utilizados seis oligonucleotídeos internos (Tabela 1). As sequências resultantes foram comparadas com todas as sequências disponíveis no GenBank, utilizando o software BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência foi alinhada utilizando software CLUSTAL. A árvore filogenética foi construída usando MEGA 4.0 com o método neighbor joining. Análise de bootstrap (1000 resamplings) foi utilizado para avaliar a topologia dos dados neighbor joining.

**Tabela 1** Relação de oligonucleotídeos utilizados para caracterização molecular dos isolados de actinobactérias. Oligonucleotídeos a partir da sequência parcial do rRNA 16S de *Streptomyces* sp MTCC8377.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'→3')	Referência
pA sense	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Edwards et al. (1989)
16S sense	GGATGAGCCCGCGGCCTA	Este trabalho
Strep 1F sense	AAAGAGCTCGTAGGCGGCTTT	Este trabalho
pF antisense	ACGAGCTGACGACAGCCATG	Edwards et al. (1989)
Strep 2F sense	CCGTGTACAGGTGGTGCATG	Este trabalho
Strep H antisense	AGG AGG TGA TCC AGC CGC AC	Este trabalho

### 3.3. Estudo taxonômico

Os isolados de actinobactéria foram caracterizados morfológicamente e bioquimicamente conforme descrito no *Internacional Streptomyces Project* (ISP) (Shirling & Gottlieb 1966; Shirling et al. 1972; Williams et al. 1983a). A

morfologia geral dos isolados foi determinada por microscopia de luz direta da superfície de cultivos em meios ACA e ISP2 (Williams et al., 1983). As placas foram incubadas a 28°C durante 7-10 dias. A cor da massa de esporos aéreos das colônias, cor do micélio, produção de pigmentos e utilização de fontes de carbono como substrato foram determinadas de acordo com Shirling & Gottlieb (1966) e Williams et al. (1983a). Testes de hidrólise e a capacidade de crescer em diferentes concentrações de sal foram determinados de acordo com Williams et al. (1983b) Produção de melanina foi detectada por crescimento dos isolados em meio de ISP6 e ISP7 ((Shirling and Gottlieb, 1966). A ornamentação da superfície de esporos foi observada por microscopia eletrônica de varredura, após 2 dias de incubação em meio ágar nutriente.

### **3.4. Curva de produção de metabolitos bioativos**

Para determinar as condições de produção de metabólitos ativos, foram selecionadas as actinobactérias com amplo espectro de atividade antifúngica em ensaios anteriores. Sendo assim, 10% de pré-inóculo dos isolados 6(2), 6(4) e R18(6) foram inoculados em frascos, Erlenmeyer de 250 mL, contendo em 50 mL caldo amido caseína (AC). O ensaio foi realizado durante o período de 168h, sob agitação constante de 115 r.p.m. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 6000 x g. por 12 min. O sobrenadante livre de células foi utilizado para avaliação do pH e da atividade antifúngica (mm) e o *pellet* foi empregado para a determinação da biomassa seca (mg/50 mL). As avaliações para cada uma destas variáveis foram obtidas a cada 24 horas através de ensaios realizados em triplicata. O isolado 98012 de *B.*

*sorokiniana* foi empregado como microrganismo teste antifúngico pelo método de difusão em ágar (Salamoni et al., 2010).

### **3.5. Estabilidade dos compostos antifúngicos presentes no extrato centrifugado**

O extrato centrifugado, dos três isolados, foi submetido a testes de estabilidade frente a diferentes temperaturas, pH, proteases e concentrações de EDTA. Ao final de cada ensaio foram realizados testes de atividade antifúngica contra *B. sorokiniana* e a atividade residual foi calculada de acordo com a equação:

$A.R (\%) = \frac{Hr-8}{Hc-8} \times 100$ . Sendo: AR: Atividade residual, Hr: halo do sobrenadante tratado (mm) e Hc: Halo do controle (mm) e 8: o diâmetro do poço (mm).

Para a atividade antifúngica do extrato centrifugado foram utilizados cinco isolados de *B. sorokiniana* 98004, 98012, 98032, 98040 e 98041, selecionados devido a resultados obtidos em teste de virulência realizado pelo nosso grupo (Minotto et al., 2014). Neste os três primeiros isolados foram mais agressivos às folhas e coleóptilo enquanto os demais foram mais agressivos a sementes.

### **3.6. Estabilidade dos extratos centrifugados frente a diferentes temperaturas**

Para avaliar o efeito da temperatura sob a estabilidade do composto antifúngico dos extratos de actinobactérias, alíquotas de 1mL do extrato centrifugado foram incubados por 10, 20 e 30 dias a 4°C. Outras alíquotas foram

mantidas a 30°, 40°, 50°, 60° e 70°C por 5h em banho de água e atividade residual (AR) foi avaliada a cada 60 min. Quando expostas a 80°C a AR das amostras foi determinada a cada 30 min. durante 3h, e a cada 5 minutos quando incubadas a 100°C por um período de 0,5h. Além disso, avaliou-se a estabilidade térmica dos extratos brutos após 15 min a 121°C (1 atm).

### **3.7. Estabilidade dos extratos centrifugados frente ao pH**

Para avaliar a estabilidade da substância antifúngica frente a diferentes pHs, em alíquotas de 1mL dos extratos centrifugados de cada isolado foram adicionadas de 200 µL dos diferentes tampões de pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0, ou tampão PBS, no tratamento controle. Os tratamentos foram incubados por 2 horas a temperatura de 25°C. A solução tampão de McIlvaine (fosfato dissódico e ácido cítrico) foi empregada para os valores de pH de 5,0 a 8,0 e a solução de ácido bórico cloreto de potássio para os valores de 9,0 e 10,0 (Assumpção and Morita, 1968).

### **3.8. Estabilidade dos extratos centrifugados frente a enzimas**

Para avaliar a resistência da substância bioativa frente a enzimas proteolíticas, o extrato centrifugado foi adicionado das enzimas proteinase K, pepsina, tripsina, papaína nas concentrações finais de 2 mg/mL, ou de tampão PBS, no controle. O pH da soluções enzimáticas foi ajustado de acordo com a atividade ótima para cada enzima e o do tampão PBS para pH fisiológico. As soluções foram incubadas a 37° C durante 2 h. A fim de observar a interferência

da ação térmica sobre o extrato bruto, alíquotas de 1 mL de extrato foram incubados a 37° C e a 4° C pelo mesmo período. Os testes foram realizados em triplicata.

### **3.9. Estabilidade a diferentes concentrações de EDTA**

Para determinar a ação de diferentes concentrações de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sobre a atividade antifúngica, 1 mL do extrato centrifugado de cada um dos três isolados de *Streptomyces* foi adicionado de EDTA em uma concentração final de 100 µM, 500 µM e 1 mM. O extrato centrifugado e as soluções de EDTA sódico adicionados de PBS foram utilizadas como controles. As soluções de EDTA foram previamente preparadas em balão volumétrico com pH fisiológico (7,2 – 7,4). Os tubos foram incubados a 4° C por duas horas.

### **3.10. Análise estatística dos dados de estabilidade dos compostos antifúngicos**

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Quando necessário realizou-se análise da variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) utilizando-se o programa estatístico SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

### **3.11. Extração de metabólito do extrato centrifugado dos isolados**

O extrato centrifugado foi submetido a uma extração líquido- líquido com diferentes solventes: acetato de etila, hexano, acetona, metanol, álcool

isoamílico, isobutanol, clorofórmio, BAW (butanol/ácido acético/água). A extração consistiu de três lavagens consecutivas do extrato bruto com cada solvente na proporção 1:1 (v:v) para os solventes puros e 4:1:5 para a mistura BAW. As fases aquosa e orgânica foram separadas em funil de decantação e posteriormente submetidas a testes de atividade antifúngica contra *Bipolaris sorokiniana*, pela técnica de difusão em poço de ágar. Os extratos centrifugados e os solventes orgânicos puros foram utilizados como controle. O ensaio foi realizado em triplicata para cada um dos três isolados de actinobactérias. Os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo, com velocidade de 100 m/s a uma temperatura de 40°C, até a consistência de pó. Este foi ressuspenso com a menor quantidade possível de tampão PBS (aprox. 2 mL), caracterizando o extrato bruto. Os quais foram armazenados a -20°C.

### **3.12. Cromatografia em camada delgada e bioautografia**

Para a realização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizaram placas (7x10 cm) de alumínio revestidas com sílica gel (Merck, sílica gel 60 F254) como fase estacionária. Diferentes solventes ou misturas destes como fase móvel foram testados. Os extratos centrifugado e bruto foram aplicados nas placas de CCD com auxílio de um capilar. Após a secagem, as mesmas foram colocadas em cuba previamente saturada com o eluente da fase móvel. A cuba foi fechada para saturação da placa de CCD e eluição do solvente até aproximadamente 1 cm da borda superior da placa. Após as placas de CCDs foram retiradas da cuba, secas e reveladas sob dois comprimentos de onda de luz UV (254 e 365 nm), e revelação química com anisaldeído sulfúrico e

ninhidrina. Após mensuração da movimentação das bandas calculou-se o fator de retenção (Rf).

Os solventes e misturas de solventes testados foram: acetato de etila (1:1), n-butanol/álcool butílico (1:1), clorofórmio/acetona (9:1), hexano/acetato (7:3), acetato de etila/ álcool butílico (8:2), clorofórmio/metanol(8:2), isobutanol/ácido acético/água (BAW) (4:1:5), metanol/ácido acético/água (MAW) (2:1:7) metanol/ácido acético/água (MAW) (4:1:5) e isopropanol/ácido acético/água (PAW) (4:1:5).

As placas de CCD reveladas pelo método físico foram submetidas à revelação biotografica na qual, as cromatoplasmas foram depositadas no fundo de placas de Petri e sobre elas verteu-se uma fina camada de meio de cultivo BDA. Após a solidificação do meio, semeou-se sobre a superfície do mesmo 100 µL de esporos do fitopatógeno ( $1 \times 10^6$  esporos/mL). Após incubação por 7 dias a 28° C, observou-se a presença ou ausência de inibição sobre as bandas observadas sob luz UV. O ensaio foi realizado em duplicata.

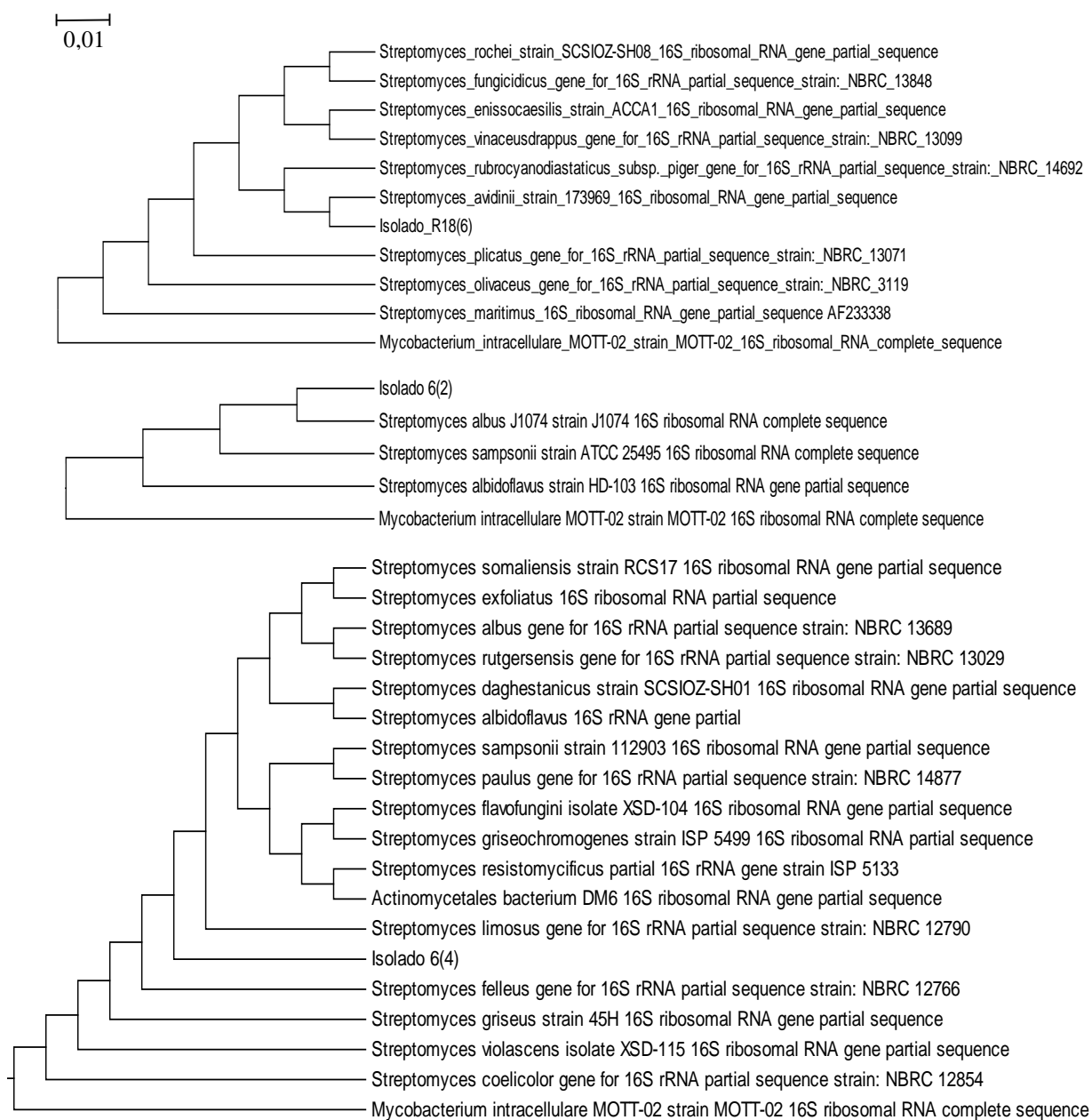
## **4. Resultados**

### **4.1. Análise da sequência do rDNA 16S dos isolados de actinobactérias**

O sequenciamento de aproximadamente 1400 nucleotídeos do rRNA 16S dos isolados 6(2), 6(4) e R18(6) foi realizada. Estes dados foram comparados com todas as sequencias disponíveis na base de dados do GenBank. A cepa Mott-02 de *Mycobacterium intracellulare* foi utilizada como referência de grupo externo. O alinhamento das sequências de 1369 pb do 16S



rRNA dos isolados 6(4) e R18(6) mostraram que os mesmos apresentaram 100% similaridade com um grande número de espécie de *Streptomyces*. Enquanto que a sequência de 1426 pb do isolado 6(2) mostrou 99% de similaridade com as cepas de *S. albus*, *S. sampsonii* e *S. albidoflavus*. O dendrograma filogenético de neighbor-joining baseado na sequências do rDNA 16S mostram que os três isolados formaram ramos distintos dos demais representantes da família Streptomycetaceae (Figura 1A, B, C). O Isolado 6(2) e o R18(6) formaram um ramo adjacente ao cluster que compreende *S. albus* e *S. avidinii*, respectivamente, enquanto que o 6(4) apresentou um clado independente das demais cepas de Streptomyces. O dendrograma construído pelo método de máxima parcimônia também mostrou que as cepas formam uma linha filética distinta das cepas estreitamente relacionadas, disponíveis no banco de dados GenBank..



**Figura 1** Dendrograma filogenético baseado em sequências parciais (<1300 pb) do gene 16S rDNA que mostram relações entre isolados de *Streptomyces* e espécies tipo de *Streptomyces*. A: Isolado 6(2); B: Isolado 6(4); C: Isolado R18(6). Análise de neighbor-joining de 1000. A barra de escala indica a posição de substituição por nucleotídeo 0,01.

#### **4.2. Estudo morfológico e bioquímico**

A análise taxonômica e bioquímica mostrou que os isolados são Gram-positivas, sem motilidade, aeróbio e apresentam micélio aéreo ramificado. A comparação de características bioquímicas e culturais dos isolados com aquelas espécies *Streptomyces* conhecidos descritas no Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática encontram-se na tabela 1.

**Tabela 2** Características fenotípicas e bioquímicas que diferenciam os isolados 6(2), 6(4) e R18(6) das espécies intimamente relacionadas.

	R18(6)	<i>S. avidinii</i>	6(2)	<i>S. albus</i> <i>S. albus</i>	6(4)	<i>S.</i> <i>albido flavus</i>	<i>S. albus</i> <i>S. albus</i>	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. exfoliatus</i>	<i>S.</i> <i>flavofungini</i>	<i>S. sampsonii</i>	<i>S.</i> <i>somaliensis</i>
Morfologia e pigmentação												
Morfologia da cadeia de esporo	Espiral	espiral	Recti flexível	espiral	Recti flexível	Recti flexível	espiral	Recti flexível	Recti flexível	Recti flexível	Recti flexível	Recti flexível
Ornamentação da parede do esporo	Liso	nd	liso	Liso	liso	liso	liso	liso	liso	liso	liso	liso
Cor micélio aéreo	Cinza	cinza	verde oliva	branco/ amarelo	verde musgo	branco ou cinza	branco/ amarelo	amarelo	vermelho	branco/ amarelo	verde amarelado o palido	amarelo
Pigmento solúvel												
Pigmentos melanóide em ISP6	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentos melanóide em ISP7	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ISP8 - Caldo Nitrato	-		+	-	++		-		nd			
Fonte única de carbono:												
D-Glicose	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+
D- xilose	+	-	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+

L- Arabinose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L- D- Ramnose	++	-	-	-	-	-	+	-		?	-	-
D-Frutose	+	+	++	±	++	+	±	+	+	+	+	+
D- galactose	++	nd	++	+	++	nd	+	nd		nd	nd	nd
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
D-manitol	++	-	++	+	++	+	+	+	-	+	+	+
I- Inosiitol	+	-	±	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L- salcina	+	nd	+	+	+	nd	+	nd	+	nd	+	nd
D-Sacarose	-	nd	-	Nd	-	-	nd	nd	+	-	-	+

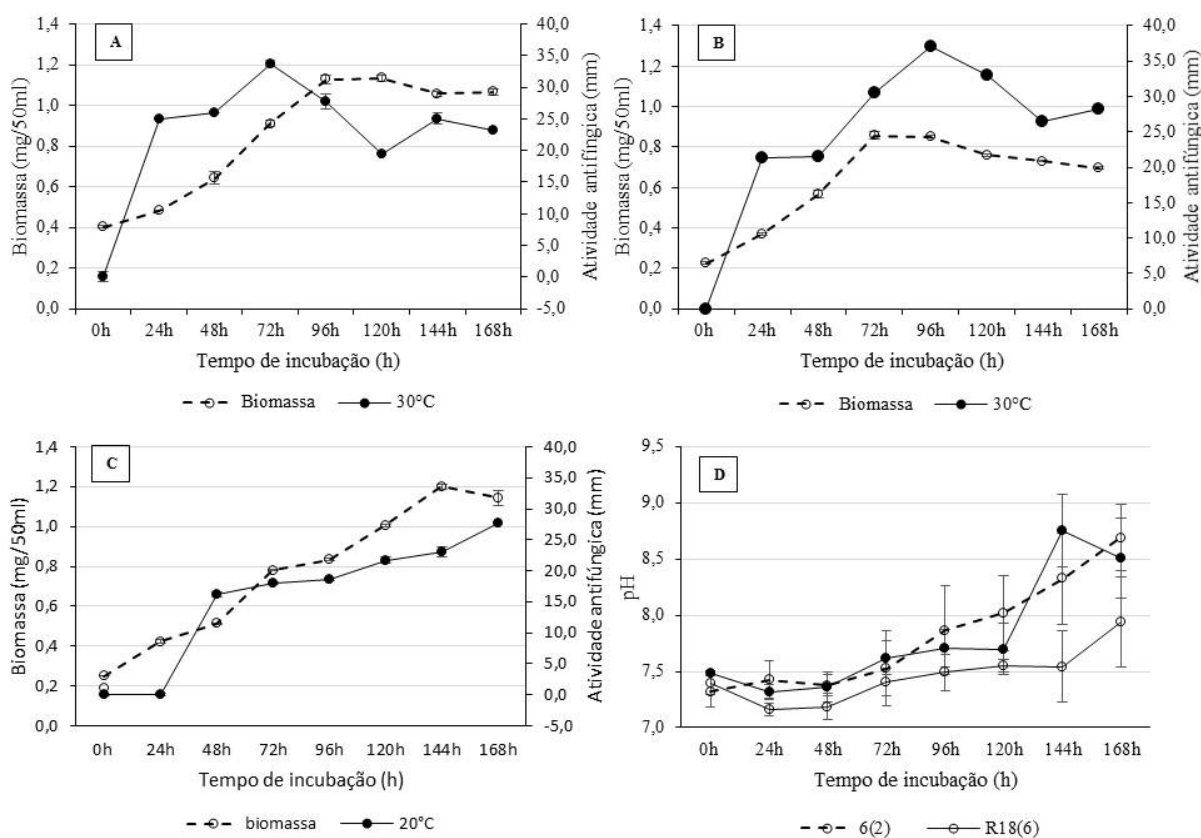
(+) positivo; (-) negativo; ND = não determinado;

### **4.3. Curva de produção de metabolitos bioativos**

A determinação das condições ótimas de produção de metabolitos ativos foi realizada em ensaio prévio (Minotto et al. 2014b), no qual observou-se a maior produção média destes compostos, em caldo AC, a uma temperatura de 30°C para os isolados 6(2) e 6(4) e a 25°C para o R18(6).

Ao final da fase de crescimento exponencial ocorreu a maior produção de biomassa, às 72, 96 e 144 horas após a incubação para os isolados 6(4), 6(2) e R18(6), respectivamente (figura 2 A, B e C). Enquanto que a detecção da atividade antifúngica máxima foi observada na fase estacionária, após 72h (33,7mm) de incubação para o isolado 6(2), com 96h (37 mm) para 6(4) e 168h (27,7 mm) para o isolados R18(6) (Figura 2A, 2B, 2C).

O pH de todas as culturas manteve-se entre 7,1 e 8,6 praticamente durante todo o período de cultivo (figura 2D). A menor variação foi evidenciada pelo isolado R18(6).



**Figura 2** Curva de atividade antifúngica (mm), biomassa seca (mg) e pH de isolados de actinobactérias submetidos a diferentes condições de incubação. Os isolados 6(2) e 6(4) foram incubados a 30°C e o R18(6) a 25°C por 168 h em caldo AC. A: isolado 6(2), B: isolado 6(4), C: isolado R18(6) e D: curva de pH.

#### 4.4. Estabilidade dos extratos centrifugados a temperatura

A atividade antifúngica residual (AR) dos extratos bruto dos isolados reduziu com a elevação da temperatura e o tempo de exposição. Para os isolados 6(2) e 6(4), observou-se uma redução de aproximadamente 50% da AR até a terceira hora de exposição à 50°C. Resultados semelhantes também foram observados para as temperaturas de 60°C e 70°C, após 2h e 1h de tratamento térmico, respectivamente (Tabela 3). Por outro lado, o isolado R18(6) manteve

uma AR superior a 70% por 1h nas temperaturas entre 30 e 80°C (Tabela 3). Além disso, o extrato bruto deste microrganismo quando exposto a uma temperatura de 100°C por 10 min. apresentou AR superior a 65% (dados não mostrados). Não foi possível detectar atividade residual para nenhum dos extratos submetidos a 121°C (1atm) por 15 min, bem como com em temperaturas superiores a 80°C com os extratos dos isolados 6(2) e 6(4) (Tabela 3).



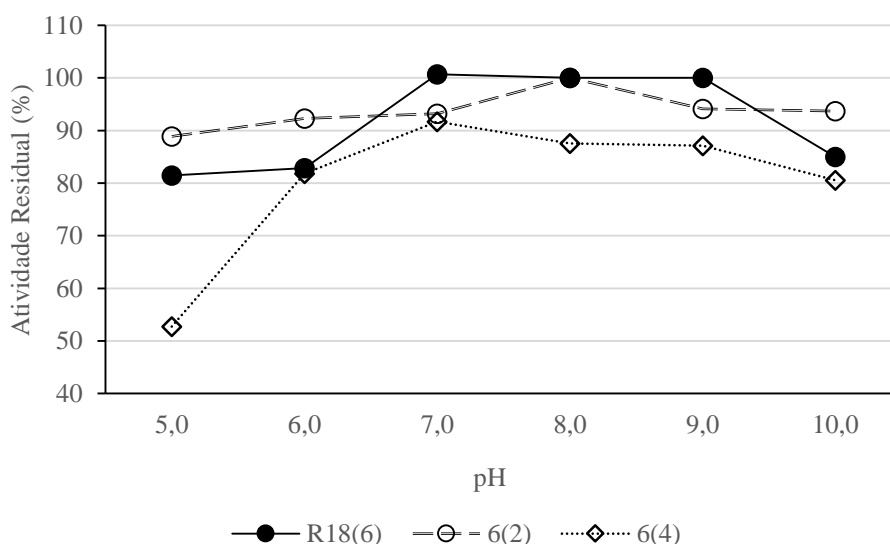
**Tabela 3** Estabilidade da Atividade antifúngica (AR%) de compostos presentes no extrato bruto de isolados de *Streptomyces* submetidos a tratamento térmico, em diferentes temperaturas e períodos de incubação.

Isolado	R18(6)					6(2)					6(4)				
	1h	2h	3h	4h	5h	1h	2h	3h	4h	5h	1h	2h	3h	4h	5h
<b>30°C</b>	95,72	91,47	91,36	89,29	87,91	83,85	98,18	72,49	30,14	19,53	94,25	93,37	92,83	48,19	0,00
<b>40°C</b>	92,59	74,88	68,18	62,50	61,86	76,39	97,67	56,84	10,33	0,00	82,70	87,76	60,71	0,00	0,00
<b>50°C</b>	92,59	65,88	50,00	49,11	42,33	66,87	76,08	42,89	0,00	0,00	75,33	66,33	48,47	0,00	0,00
<b>60°C</b>	90,37	47,39	36,36	35,71	82,56	65,43	57,42	31,00	0,00	0,00	52,65	45,73	30,61	0,00	0,00
<b>70°C</b>	80,21	36,02	0,00	0,00	60,47	38,58	60,29	0,00	0,00	0,00	48,14	25,51	10,20	0,00	0,00
Tempo	30 min	1h	1:30 h	2h	2:30 h	30 min	1h	1:30 h	2h	2:30 h	30 min	1h	1:30 h	2h	2:30 h
<b>80°C</b>	74,59	70,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tempo	3 min	5 min	10 min	20 min	30 min	3 min	5 min	10 min	20 min	30 min	3 min	5 min	10 min	20 min	30 min
<b>100°C</b>	88,07	74,07	65,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tempo	10 dias	20 dias	30 dias				10 dias	20 dias	30 dias				10 dias	20 dias	30 dias
<b>4°C</b>	64,95	62,95	62,95				97,44	90,46	90,46				61,76	53,68	53,68

A atividade residual de extratos dos isolados 6(4) e R18(6), mantidos a 4° por 30 dias, apresentou redução de até 50%, sendo esta detectada nos primeiros 10 dias (tabela 3). Por outro, a redução máxima da AR do isolado 6(2) foi de aproximadamente 10% após 30 dias.

#### 4.5. Estabilidade dos extratos centrifugados frente ao pH

Os extratos bruto foram submetidos a teste de estabilidade frente a diferentes pHs (5,0-10,0). A atividade antifúngica residual mostrou que os isolados 6(2) e R18(6) apresentaram elevada estabilidade dentro de toda a faixa de pHs testados, mantendo uma AR superior a 88% e 81%, respectivamente (Figura 3). Resultado semelhante a este foi observado para o 6(4) em uma faixa de pH de 6,0 a 10,0 onde o extrato bruto manteve pelo menos 80% da sua atividade. No entanto, quando este isolado foi submetido a pH 5,0 a atividade antifúngica residual foi reduzida em aproximadamente 50% (Figura 3).



**Figura 3** Estabilidade de compostos antifúngicos (AR%) presente no extrato bruto de isolados de *Streptomyces*, submetidos a diferentes pHs por duas horas a 25°C.

#### **4.6. Estabilidade dos extratos centrifugados frente à enzimas**

Os extratos dos três isolados foram tratados com 2 mg/mL das enzimas Proteinase K, Tripsina, Papaína, Pepsina e Lisozima para avaliar o efeito das mesmas sobre a atividade antifúngica. Cada extrato adicionado de uma determinada enzima foi submetido à temperatura de 37°C, bem como os controles (extrato + PBS) de cada ensaio. Um segundo controle foi mantido por igual período a 4°C, para averiguar a influência da temperatura sobre o extrato durante o ensaio.

A atividade antifúngica residual (%), calculada para os dois controles, mostrou que apenas o extrato bruto do isolado 6(4) sofreu redução de sua atividade devido a temperatura de condução do ensaio (37° C) (tabela 4). Os demais apresentaram uma AR estável, superior a 78% quando incubados a 37° C, frente a todas as enzimas.

Em relação à ação das enzimas proteolíticas sobre a atividade do extrato bruto, observou-se que o extrato dos isolados 6(2) e 6(4) apresentou maior sensibilidade a proteinase K, embora tenham mantido 78 e 80% da sua atividade inicial, respectivamente. Por outro lado, o R18(6) mostrou-se mais sensível a tripsina, mantendo 78% de sua atividade (tabela 4).

**Tabela 4** Estabilidade de compostos antifúngicos (AR%) presentes no extrato bruto de isolados de *Streptomyces*, após tratamento com enzimas proteolíticas por duas horas.

Extrato bruto + enzima (2 mg/mL) (AR%)						
Enzimas proteolíticas	Isolado 6(2)		Isolado 6(4)		Isolado R18(6)	
	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C
Proteinase K	78 ±0,2	73 ±0,2	80 ±0,0	83 ±0,0	86 ±0,1	80 ±0,1
Tripsina	86 ±0,2	81 ±0,2	95 ±0,3	99 ±0,3	78 ±0,1	72 ±0,1
Papaina	84 ±0,4	79 ±0,4	96 ±0,0	100 ±0,0	92 ±0,2	85 ±0,2
Pepsina	100 ±0,2	94 ±0,3	94 ±0,1	98 ±0,1	100 ±0,1	93 ±0,3
Lisozima	98±0,4	92 ±0,4	80 ±0,3	83 ±0,3	100 ±0,2	93 ±0,1

\*AR foi calculada para dois tratamentos controles: um mantido a 4°C e outro a 37°C, para determinar a ação da temperatura.

#### 4.7. Estabilidade dos extratos centrifugados à diferentes concentrações de EDTA

O tratamento do extrato centrifugado com diferentes concentrações de EDTA mostrou que os três isolados de *Streptomyces* foram capazes de manter uma AR superior a 70%, exceto o isolado 6(2) quando submetido à concentração de 100 µM (AR=55,5%) (Tabela 5). A maior estabilidade do extrato bruto foi observada para o isolado R18(6), que manteve aproximadamente 90% da AR para todas as concentrações testadas.

**Tabela 5** Atividade antifúngica (mm) do extrato centrifugado de isolados de *Streptomyces*, após tratamento com diferentes concentrações de EDTA. Dados entre parênteses representam a atividade residual (AR%).

Isolado	Concentração de EDTA			
	Controle	100 µM (AR%)	500 µM (AR%)	1 mM (AR%)
6(2)	20,25a	11,25c (55,56)	17,25ab (85,19)	15,5b (76, 54)
6(4)	21,25a	17,75ab (83,63)	15,25b (71,76)	16,25ab (76,47)
R18(6)	17,0a	15,25b (89,71)	15,5b (91,18)	15,75b (92,65)

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

#### **4.8. Extração de metabólito do extrato bruto de actinobactérias**

A extração de metabólitos ativos do extrato centrifugado, produzido pelos isolados 6(2), 6(4) e R18(6) de *Streptomyces*, apresentou maior atividade antifúngica quando realizada com os solventes acetato de etila e hexano puros, na razão 1:1 (v:v). Neste caso, a atividade antifúngica foi detectada tanto na fase aquosa como na orgânica, sendo a fase orgânica do acetato de etila mais eficiente para os três isolados (Tabela 6).

Elevada detecção de compostos ativos, produzidos pelos três isolados, foi verificada na fase aquosa do hexano, indicando que este solvente não foi capaz de extraí-los eficientemente do extrato centrifugado (Tabela 6).

Na utilização dos solventes acetona e metanol para extração de compostos não houve a formação de fases distintas, devido à polaridade semelhante dos solventes e do extrato centrifugado. Sendo assim não foi

possível a utilização dos mesmos, embora tenham demonstrado atividade antifúngica (Tabela 6).

Para os demais solventes orgânicos ou misturas destes não foi detectada atividade antifúngica. Além disso, elevada toxicidade ao micélio de *B. sorokiniana* foi observada com uso do clorofórmio como solvente extrator.

**Tabela 6** Atividade antifúngica (mm) do extrato bruto de isolados de *Streptomyces*, após extração com diferentes solventes orgânicos.

Isolado	Extrato centrifugado	Acetato Etila		Hexano		Solvente	
		F. Aquosa	F. Orgânica.	F. aquosa	F. orgânica	Metanol	Acetona
6(2)	29,6	27,9	40,4	37,1	27,9	33,8	35
6(4)	32	34,3	36,8	35	32,9	-	-
R18(6)	28,6	21,9	29,6	19	24	-	-

(-) Ausência de atividade antifúngica

#### 4.9. Cromatografia em camada delgada

Os eluentes MAW e PAW, constituídos de misturas de solventes, quando utilizados como fase móvel propiciaram a separação de compostos tanto do extrato bruto quanto do extrato centrifugado. A visualização de bandas formadas pela migração dos compostos na CCD foi possível através da revelação utilizando dois comprimentos de onda de luz UV (254 e 365 nm) o que permitiu a visualização de bandas apenas no extrato bruto, enquanto que a revelação com anisaldeído sulfúrico mostrou a presença de bandas tanto no

extrato centrifugado quanto no extrato bruto (Tabela 7). Na revelação das cromatoplasmas com ninhidrina não foi detectado a presença de bandas.

A utilização da luz UV 365 nm permitiu a visualização de duas bandas em alturas diferentes no extrato bruto de cada isolado, com Rf variando de 0,08 a 0,2 para as primeiras bandas e Rf entre 0,8 e 0,92 para a segunda. Para o comprimento de onda 254 nm uma banda foi visualizada no ponto de aplicação e outra com Rf 0,23 apenas no extrato concentrado do isolado R18(6).

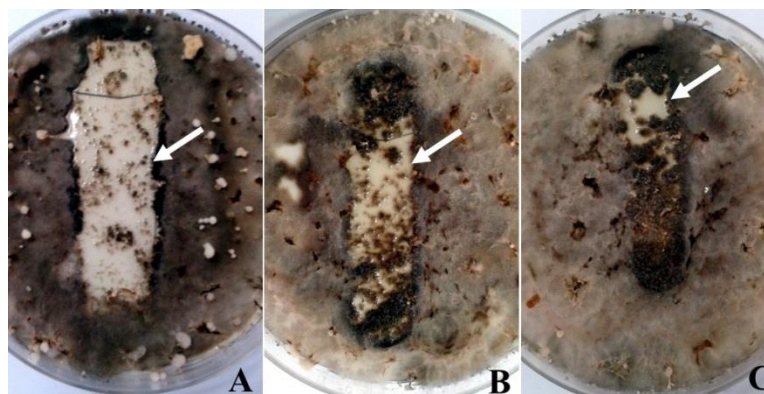
A revelação das placas de CCD com anisaldeído permitiu a observação de uma banda tanto no extrato centrifugado quanto no extrato bruto, sendo que o Rf das bandas no extrato centrifugado ficaram entre 0,15 e 0,30 e entre 0,63 e 0,81 no extrato bruto para as duas fase móveis (PAW e MAW ) testadas (Tabela 7). Os demais solventes ou misturas de solventes utilizados como eluente da CCD não apresentaram bandas visíveis quando revelados pelos diferentes comprimentos de onda UV, anisaldeído sulfúrico ou pela ninhidrina.

**Tabela 7** Fator de retenção (Rf) do extrato bruto e do extrato centrifugado de isolados de *Streptomyces*, após revelação por diferentes métodos.

Fase móvel	Extrato bruto			Extrato centrifugado		
	6(2)	6(4)	R18(6)	6(2)	6(4)	R18(6)
PAW (anisaldeído)	0,79	0,81	0,81	0,27	0,27	0,30
MAW (anisaldeído)	0,65	0,63	0,65	0,15	0,20	0,18
PAW (UV 365 nm)	0,08/0,9	*0,89	0,2/0,92	-	-	-
PAW (UV 254 nm)	-	-	*0,23	-	-	-

\*Banda no ponto de aplicação; dados separados por (/) indicam presença de duas bandas para o mesmo sistema da CCD.

Todas as placas de sílica reveladas pelo método físico (UV) foram submetidas à autobiografia frente ao isolado 98012 de *B sorokiniana*. A autobiografia permitiu a identificação da presença de compostos com atividade antifúngica nas bandas que apresentaram Rf entre 0,7 e 0,9, visualizadas pela revelação com luz UV 365nm e anisaldeído. Entretanto, a inibição antifúngica não foi observada apenas na altura da banda visualizada, mas também em outros pontos da cromatoplaça, especialmente para o isolado 6(2) (Figura 4).



**Figura 4** Autobiografia da placa de CCD mostrando atividade antifúngica do extrato concentrado de isolados de *Streptomyces*. O sistema constituiu-se de placas de sílica gel 60 F254, como fase estacionária, e eluente água:metanol:ácido acético (5:4:1), como fase móvel. A: isolado 6(2); B: isolado 6(4) e C: isolado R18(6). Setas indicam atividade antifúngica.

## 5. Discussão

Diferentes estudos sobre actinobactérias endofíticas demonstraram a predominância do gênero *Streptomyces* ((Bascom-Slack et al., 2009; Oliveira et al., 2010). A investigação de diversas fontes nutricionais e fatores ambientais,



juntamente com a capacidade metabólica do microrganismos, tem sido constantemente reportados pois exercem profunda influência sobre a biossíntese de metabólitos ativos produzidos por actinobactérias. Segundo Waksman (1961) a habilidade de produção de antibióticos, por cepas de *Streptomyces*, é uma propriedade que pode ser otimizada ou completamente perdida sobre diferentes condições de nutrição e cultivo.

Neste trabalho, a maior produção de biomassa seca ocorreu ao final do período de crescimento exponencial (tempo), sendo que a máxima atividade antifúngica para o isolado 6(2) foi observada com 72h de crescimento e para os isolados o 6(4) e R18(6) após 96 e 168h de incubação, respectivamente. A partir disso, pode-se inferir que o aumento da biomassa não apresenta uma relação direta com o aumento da produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Estes resultados diferem daqueles observados por Salamoni et al. (2012) em que a maior atividade antimicrobiana das culturas filtradas do *Streptomyces* 1S coincidiram com os picos de maior produção de biomassa. De acordo com Antunes et al. (2013) a melhor atividade antimicrobiana do isolado *Streptomyces* 8S foi obtida após 72h de incubação (fase estacionária) utilizando meio de cultivo com amido e nitrato de potássio, o que proporcionou maior estabilidade do pH e aumento da biomassa. No entanto, Prapagdee et al. (2008) observaram que a cultura filtrada de *Streptomyces hygrosopicus*, obtida em fase exponencial, apresentou enzimas hidrolíticas, enquanto que a obtida da fase estacionária, a presença de composto secundário termoestável. Ambos desempenharam um papel importante na inibição do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Sclerotium rolfsii*.

O pH das culturas manteve-se em elevação durante todo o período de cultivo. Vasavada et al. (2006) reportaram a influência do pH na produção e no crescimento de *Streptomyces sannanensis* e observaram que essa espécie, assim como outras pertencentes ao gênero, secreta metabólitos antimicrobianos em condições alcalinas. Fato este também observado neste trabalho, a elevação de pH de 7,7 para 8,7, entre 120 e 144h de incubação, influenciou na atividade antifúngica do isolado 6(4), reduzindo-a de 33mm para 26,5mm (Figura 2B e D). O mesmo efeito foi observado por Sultan et al. (2002) ao obter as melhores condições de produção de metabólitos ativos de *Streptomyces* em pH 8,0 e, observar sua redução com a acidificação do pH.

O isolado R18(6) mostrou-se mais estável ao calor, mantendo 70% da atividade após incubação por 60 min. a 80°C, quando comparado com os demais. Quando exposto a uma temperatura de 100°C por 10 min. 60% de sua atividade ainda foi detectada. Diversos trabalhos reportam resultados similares, em que foi observada perda parcial ou total da atividade antimicrobiana em temperatura superior a 100°C (Augustine et al. 2005; Malik et al. 2008; Salamoni et al. 2012).

Por outro lado, Uddin et al. (2013) relataram que os metabólitos antimicrobianos de *Streptomyces albolongus* apresentaram estabilidade a temperatura de 100°C e mostraram variações quando submetidos a diferentes pH (5,0 a 11,0), apresentando atividade máxima em pH 7,0. Neste estudo, resultados semelhantes foram observados para a mesma faixa de variação de pH, onde uma AR superior a 90% foi mantida por todos os isolados de *Streptomyces*. Redução da atividade antimicrobiana de compostos secundários

devido à exposição a diferentes temperaturas e níveis de pH também foram relatados em outros estudos (Mustafa, et al, 2004; Augustine et al. 2005; Muiru et al. 2007)

Prapagdee et al. (2008) observaram que a atividade antifúngica da cultura filtrada de *S. hygroscopicus* contra *C. gloeosporioides* e *S. rolfsii* foi significativamente reduzida após tratamento térmico e com proteinase-K. No presente trabalho dentre as cinco proteases testadas sobre extrato centrifugado, a proteinase K e a tripsina apresentaram as maiores reduções de atividade antifúngica 27% e 28%, respectivamente, a 4°C. No entanto, para papaína, pepsina e lisozima a AR manteve-se superior a 80%, indicando uma elevada estabilidade dos compostos ativos. Isso pode indicar a presença de uma molécula de natureza proteica mais específica ou a presença de diferentes moléculas ativas, sendo que parte destas são sensíveis as proteases, ou ainda, que esta (s) molécula (s) pode (m) não ser proteica. Isso porque estas substâncias agem quebrando as ligações peptídicas. A tripsina age ligando-se no C-terminal de resíduos de lisina e arginina. A papaína age clivando as ligações peptídicas de aminoácidos básicos como leucina e glicina, além disso também hidroliza ésteres e aminas (Kamphuis et al., 1985). A proteinase K tem como sítio predominante de clivagem a ligação peptídica adjacente ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos e aromáticos.(Ebeling et al. 1974)

Fontoura et al. (2009) estudando a sensibilidade de um peptídeo antimicrobiano, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* 4B, a papaína, tripsina, proteinase K e pronase, observaram que esta última foi responsável pela menor AR da fração II (85% com 2 mg/mL). Estes autores relatam, ainda, AR de 71%

para a fração II parcialmente purificada após tratamento com 10 mM de EDTA. Atividade residual semelhante (superior a 71%) foi observada para os extratos centrifugados após tratamento com concentração máxima de 1 mM de EDTA. Estes resultados indicam a existência de íons metálicos no extrato centrifugado, que poderão influenciar no processo de purificação dos compostos devido presença de cargas.

A caracterização de metabólitos ativos é importante uma vez que sua utilização no controle de doenças de plantas e o estabelecimento dos métodos de purificação são determinadas através de sua estabilidade (Mustafa et al., 2004). A CCD do extrato bruto dos isolados de *Streptomyces*, revelado por luz UV (365 nm), mostrou a presença de dois compostos. Bandas semelhantes às de maior Rf também foram detectadas na CCD eluída com PAW e reveladas com anisaldeído sulfúrico. A ação antifúngica foi confirmada pela autobiografia. De acordo com Cunha et al. (2009), analisando CCD da fração S3 do extrato bruto de *Streptomyces*, revelada com luz UV (254 nm e 366 nm), mostrou a presença de dois compostos com Rf 0,84 e Rf 0,61, cuja autobiografia revelou que o composto com maior Rf apresentava maior halo de inibição (20mm).

Muitos eluentes e reveladores são testados até que ocorra uma boa separação dos compostos presentes nos extratos. Nesse estudo, os eluentes mais eficientes na separação de compostos foram aqueles formados por misturas de metanol ou isopropanol:ácido acético:água (4:1:5). As misturas solventes constituídas de água são frequentemente relatadas para separação de compostos produzidos por actinobactérias. Usha et al. (2010) utilizando a mistura de solventes n-butanol:acetato de etila:água (9:9:1) para a separação

de compostos produzidos por *Streptomyces* e revelados com ninidrina produziram bandas amarelas com Rf 0,742. Atta (2010) relatou a separação de compostos antifúngicos produzidos por *Streptomyces antibioticus* através da mistura metanol:diclorometano:água (1:1:1).

A pesquisa de novas substâncias com atividade antimicrobiana é um campo muito importante. O surgimento de patógenos multi-resistentes tanto na área clínica como na agricultura incentivam a busca por métodos eficientes de controle de infecções. O papel das substâncias antimicrobianas produzidas por estes isolados de *Streptomyces* ainda está em especulação e novos estudos devem ser realizados para a caracterização e purificação dos compostos antifúngicos por eles produzidos.

## 6. Referências Bibliográficas

ANTUNES, T. C.; SALAMONI, S. P.; PAULA, A.; FRAZZON, G. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, 2013

ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização-preparação-purificação**. Edgard Blücher, Ed. da Universidade, 1968.

ATTA, H. Production, Purification, Physico-Chemical Characteristics and Biological Activities of Antifungal Antibiotic Produced by *Streptomyces antibioticus*, AZZ710. **Amer-Eurasian J. Sci. Res**, v. 5, p. 39–49, 2010.

AUGUSTINE, S. K.; BHAVSAR, S. P.; KAPADNIS, B. P. A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. **Journal of biosciences**, v. 30, n. 2, p. 201–211, 2005.

BASCOM-SLACK, C. A.; MA, C.; MOORE, E.; et al. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. **Microbial ecology**, v. 58, n. 2, p. 374–383, 2009.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18–24, 2001.

CUNHA, I. G. B.; SOBRINHO, T. J. DA S. P.; DA SILVA, R. E. A.; DE AMORIM, E. L. C.; DE ARAUJO, J. M. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 120–123, 2009.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H. D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album limber*. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 91-97, 1974.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLÖCKER, H.; EMDE, M.; BÖTTGER, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 19, p. 7843–7853, 1989. Oxford Univ Press.

EL-TARABILY, K. A.; SOLIMAN, M. H.; NASSAR, A. H.; et al. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, v. 49, n. 5, p. 573–583, 2000..

FONTOURA, R.; SPADA, J. C.; SILVEIRA, S. T.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 205–213, 2009.

HETZLER, J.; EYAL, Z.; MEHTA, Y.R.; CAMPOS, L.A.C; FEHRMANN, H.; KUSHNIR, U.; OREN, J.Z.; COHEN, L. Interaction between *Cochliobolus sativus* and wheat cultivars. In: **Saunders, D.A. (Ed.) Proc. Int. Conf. On Wheat for Non-Traditional Warmer Areas**, Cimmyt: Mexico, p.146-164, 1991.

KAMPHUIS, I. G.; DRENTH, J.; BAKER, E. N. Thiol proteases: comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. **Journal of molecular biology**, v. 182, n. 2, p. 317-329, 1985.

MALIK, H.; SUR, B.; SINGHAL, N.; BIHARI, V. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian journal of experimental biology**, v. 46, n. 4, p. 254–7, 2008.

MEHTA, Y. R. **Doenças do trigo e seu controle**. Summa Phytopathologica, Editora Agronômica Ceres, 1978.

MINOTTO E, MANN BM, VÉLEZ-MARTIN E, FELTRIN T, MILAGRE LP, SPADARI C, VAN DER SAND ST Virulence of monosporic and polysporic *Bipolaris sorokiniana* isolates under controlled conditions. submitted to **African Journal of Microbiology Research**, 2014.

MUIRU, W. M.; MUTITU, E. W.; MUKUNYA, D. M. Characterization of antibiotic metabolites from actinomycete isolates. African Crop Science Conference Proceedings. **Anais...** v. 8, p.2103–2107, 2007.

MUSTAFA, S. A.; TAMER, U. A.; AZER, C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology vol. 3(9), 441-446, 2004.

OLIVEIRA, M.F. **Identificação e caracterização de de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003, 146F. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003

OLIVEIRA, M. F.; GERMANO DA SILVA, M.; VAN DER SAND, S. T. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 565–572, 2010.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International journal of biological sciences**, v. 4, n. 5, p. 330, 2008.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doenças do trigo. In: **KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2, p.631-638, 2005.

SALAMONI, S. P.; MANN, M. B.; CAMPOS, F. S.; et al. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1847–1856, 2010.

SALAMONI, S. P.; VAN DER SAND, S. T.; GERMANI, J. C. Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S. **Evidência-Ciência e Biotecnologia-Interdisciplinar**, v. 12, n. 2, p. 175–186, 2012.

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

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D.; HOCHST, F. M. Cooperative Description of Type Strains of *Streptomyces*, n. 4, p. 265–394, 1972.

SULTAN, M. Z.; KHATUNE, N. A.; SATHI, Z. S. *In vitro* antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology**, v. 1, n. 2–4, p. 100–106, 2002.

TARKKA, M.; HAMPP, R. Secondary Metabolites of Soil Streptomyces in Biotic Interactions. **Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology**, p. 107, 2008.

UDDIN, M.; MAHMUD, N.; ANWAR, N.; MANCHUR, M. A. Bioactive metabolite production by *Streptomyces albolongus* in favourable environment. **Journal of Microbiology & Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, 2013.

USHA, R.; ANANTHASELVI, P.; VENIL, C. K.; PALANISWAMY, M. Antimicrobial and antiangiogenesis activity of *Streptomyces parvulus* KUAP106 from mangrove soil. **European J Biol Sci**, v. 2, p. 77–83, 2010.

VASAVADA, S. H.; THUMAR, J. T.; SINGH, S. P. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. **Current Science (00113891)**, v. 91, n. 10, 2006.

WAKSMAN, S. A. The Actinomycetes. Vol. II. Classification, identification and descriptions of genera and species. **The Actinomycetes. Vol. II. Classification, identification and descriptions of genera and species.**, 1961. London: Baillière, Tindall & Cox, Ltd., 7 & 8, Henrietta Street, WC 2.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1743–813, 1983.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; WELLINGTON, E. M. H.; et al. A Probability Matrix for Identification of some *Streptomyces*. **Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1815–1830, 1983.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Os isolados de *B. sorokiniana* originários de diferentes regiões do Brasil foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Trigo (EMBRAPA- Trigo, Passo Fundo) e os demais foram gentilmente cedidos pelo International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT – México). Todos foram obtidos de sementes e tecidos de plantas de trigo. O material biológico encontra-se depositado na coleção do Laboratório de Micologia Ambiental/DMIP/ICBS/UFRGS.

Estes isolados foram depositados na coleção do Laboratório de Micologia Ambiental por volta do ano 2000. No decorrer dos anos, alguns destes foram submetidos a teste de virulência para realização de trabalhos científicos (Poloni et al. 2008). No entanto, para a maioria dos isolados preservados não foram encontrados indícios de avaliações mais recentes, com dados relacionados à virulência ou à agressividade. De acordo com Romeiro (2005) preservar o microrganismo vivo não é o bastante, é necessário que se preserve o organismo vivo, pelo período de tempo mais longo possível. No entanto, a

necessidade de efetuar repicagens periódicas para garantir a viabilidade das culturas pode induzir o patógeno ao hábito saprofítico, à alteração de sua morfologia, à diminuição ou perda de sua capacidade de esporular e à redução de sua agressividade (Alfenas & Mafia 2007).

Levando em consideração que a viabilidade e o aspecto patogênico dos fitopatógenos devem ser constantemente avaliados devido às peculiaridades de cada espécie, os 99 isolados de *B. sorokiniana*, de origem monospóricas (72) ou polispórica (27), utilizados neste trabalho, foram submetidos a teste de virulência e após o cumprimento dos postulados de Koch e certificação da pureza das culturas as mesmas foram armazenadas por dois diferentes métodos: em tubo com BDA inclinado e em óleo mineral, as mesmas foram mantidas 4°C.

As variáveis avaliadas no teste de virulência, para cada isolado, foram sementes anormais e não germinadas, podridão de sementes, lesão de folha e lesão de coleótilo. Estes sintomas causados pelo fitopatógeno *B. sorokiniana* às plântulas e sementes de trigo foram observados em uma situação hipotética de infestação. Os dados obtidos no teste de virulência mostraram que os isolados de *B. sorokiniana*, tanto os polispóricos quanto os monospóricos, apresentaram elevada agressividade (60 e 43% respectivamente) às plântulas e às sementes de trigo. Dentre os isolados, 8% apresentaram maior agressividade, com ação patogênica superior a 75% para todas as variáveis avaliadas. A correlação dos isolados de *B. sorokiniana* com o sintoma lesão de folha, lesão de coleótilo, germinação de sementes e podridão de sementes mostrou que os

isolados polispóricos foram mais efetivos na ação patogênica, com maior tendência de agressividade sobre as sementes do que sobre as partes aéreas.

A elevada agressividade deste fitopatógeno a diferentes órgãos vegetais também foi observada por (Kosiada, 2013) durante estudo da influência da inoculação de *Ascochyta*, *Bipolaris*, *Drechslera* e *Fusarium* na germinação, emergência e infecção de folhas de cevada. Segundo o autor a germinação de sementes foi significativamente reduzida por todos os patógenos, já a emergência de plântulas foi reduzida apenas por *Fusarium* sp. (5–55%) e *B. sorokiniana* (22.5–70%), enquanto que o aparecimento de sintomas na parte aérea foi causado apenas por *B. sorokiniana* (30-60% da planta infectada).

Por outro lado, segundo Duveiller & García Altamirano (2000) a detecção de diferenças na patogenicidade entre isolados não é surpreendente quando um grande número de isolados coletados em diferentes países é comparado. Segundo Arabi & Jawhar (2007) isolados de *B. sorokiniana* de diferentes regiões da Síria mostrou diferentes níveis de patogenicidade à plantas de cevada localizadas dentro, e entre, as regiões. De forma semelhante, em nosso estudo não foi possível correlacionar origem geográfica com níveis de agressividade do patógeno.

A semente é considerada um dos meios mais eficientes de veiculação e disseminação de agentes fitopatogênicos, principalmente a longas distâncias. Por intermédio delas os patógenos podem ser introduzidos em áreas indenes, disseminados, selecionados e distribuídos através de focos primários de doenças (Maffia et al., 1988; Menten, 1988). Em nosso estudo, foi observado que os sintomas mais graves da doença estão relacionados à germinação e a

podridão de sementes, mostrando drástica redução da germinação e elevados índices de sementes mortas, ao quais atingiram o índice máximo de 100% para alguns isolados.

O controle da mancha marrom é, em geral, realizado através do emprego de cultivares resistentes e da aplicação de fungicidas. No entanto, o efeito do controle químico sobre a cadeia alimentar tem gerado grandes debates e levado consumidores a buscar cada vez mais alimentos livres destes tipos de compostos. Com o intuito de reduzir a aplicação de agrotóxicos na agricultura o controle biológico aparece como uma alternativa viável e que tem apresentado resultados promissores (Paulitz & Belanger, 2001; Luz, 2001; Tan, et al., 2006; Bettioli & Morandi, 2009).

Dentre os promissores agentes de biocontrole de doenças de plantas estão as actinobactérias endofíticas que podem colonizar o interior da planta hospedeira, evitando concorrência com quaisquer outros microrganismos do solo. A colonização da rizosfera pode proteger a planta de fungos potencialmente patogênicos devido à produção de uma ampla gama de compostos ativos, tais como: antimicrobianos, enzimas líticas, promotores de crescimento entre outros (Goodfellow & Williams, 1983; Cao et al. 2004; Tarkka & Hampp 2008). Visando ao controle biológico de *B. sorokiniana*, neste trabalho, foram empregados 23 isolados de actinobactérias endofíticas provenientes de raízes de tomateiro (Oliveira et al., 2010).

Os 23 isolados de actinobactérias foram avaliadas quanto à sua capacidade de supressão a 22 isolados de *B. sorokiniana* provenientes de diferentes regiões do Brasil. Neste ensaio observou-se que todos os isolados de

actinobactérias foram capazes de inibir pelo menos um isolado fitopatógeno, sendo que 69,6% apresentaram atividade antifúngica elevada (IA > 2,0) em meio sólido e 17% [os isolados 6(2), 6(4), 16(3) e R18(6)] a mantiveram em cultura submersa. Este resultado corrobora com o observado por Aggarwal et al. (2004), no qual relataram que as maiores zonas de inibição do desenvolvimento de *Cochliobolus sativus*, provocadas por *Chaetomium globosum*, no pareamento de culturas foi de 6,3 mm de diâmetros. De acordo com esses autores, ainda, a utilização de culturas filtradas deste antagonista causou reduções de 19,6 até 100% do crescimento do patógeno. A pesquisa mostrou que a produção de compostos antibióticos é mais eficiente em meios de cultura sólidos, comparado com os meios de cultivo submerso, em que a atividade pode diminuir ou mesmo cessar completamente. Fato este, também relatado por Spadari et al. (2013) que não detectou atividade antifúngica em cultura submersa, para dois dos três isolados de actinobactérias testados que apresentaram elevada atividade contra espécies de *Candida* sp. em meio sólido. Thakur et al., (2007) relataram que, de 65 isolados que demonstraram atividade antibacteriana em meio sólido, 15 não conseguiu fazê-lo em meio líquido. Resultados semelhantes foram descrito por outros autores (Anibou et al. 2008; salamoni et al., 2010). De acordo com Oliveira et al. (2010) a produção de compostos antibióticos em meios de cultivo líquido é geralmente baixo, e a detecção de compostos bioativos requer concentrações elevadas destes.

As 23 actinobactérias foram submetidas a caracterização da produção enzimática em três temperaturas diferentes (25, 28 e 30°C). Os resultados obtidos revelaram que quando incubados a 30°C um maior número de isolados

apresentou habilidade de degradar o substrato específico, mas que a maior produção em termos de Índice enzimático (IE) ocorreu a 25°C. A detecção da produção de catalase, amido, pectina, lipase e esterase foi observada para a maioria das actinobactérias (100, 95,6, 91, 30, 95,6, 100%, respectivamente) enquanto que a degradação de caseína, carboximetilcelulase (CMC) e gelatina foi realizada por 60,8, 34,78 e 47,82% dos isolados, respectivamente. Com exceção da degradação de caseína (94%) e CMC (91%), os resultados obtidos por Rodrigues (2006) foram inferiores aos obtidos neste trabalho. Essa diferença observada na degradação dos substratos caseína e CMC provavelmente se deve a origem dos isolados pois as actinobactérias eram oriundas de processos de compostagem e portanto apresentam um aparato enzimático mais específicos para a degradação destes compostos. Segundo (Groth et al., 1999) as actinobactérias desempenham um papel crucial na decomposição de compostos orgânicos e poluentes na natureza. De acordo com (Tuomela et al., 2000) no processo de compostagem quanto mais complexo o substrato, mais amplo e complexo é o sistema enzimático requerido.

Dentre as actinobactérias testadas foram encontradas potenciais produtores de enzimas extracelulares e embora, somente o isolado R26(6) tenha apresentado capacidade de degradar todos os substratos testados sua atividade antifúngica média foi de apenas 4,5%. Enquanto que os isolados 6(4), 6(2), R18(6), 15(3) e 16(3) que apresentaram uma inibição de crescimento do patógeno de 86,4%, 86,4%, 77,3%, 59,1% e 54,5%, respectivamente, mostraram elevada capacidade de produção enzimática (IE médio = 3,52; 3,46; 1,67; 3,62 e 2,96, respectivamente. Segundo Wiener (2000) e Challis & Hopwood (2003)

uma importante vantagem competitiva do gênero *Streptomyces* em relação a outros microrganismos está baseada, possivelmente, na produção de metabólitos secundários, agentes degradantes da parede celular (como as enzimas líticas), e na sua resistência contra compostos tóxicos produzidos pela interação microbiana.

Na determinação das condições ótimas de produção de metabólitos em cultura submersa, a temperatura exerce papel fundamental. De acordo com Iwai & Omura (1982) a temperatura ótima de crescimento é ampla e pode variar 25 graus, enquanto a temperatura ótima de produção de metabólitos secundários é estreita, entre 5-10 graus. Neste trabalho, os quatro isolados de actinobactérias com maior atividade antifúngica e excelente produção enzimática foram selecionados para a otimização da produção de compostos ativos em cultura submersa. Nesta condição os maiores intervalos de inibição do micélio fúngico ocorreram a 30°C com 72h de incubação para os isolados 6(2), 6(4) e 16(3) e nas temperaturas 20°C e 25°C com 168 e 72 horas de incubação, respectivamente, para o isolado R18(6). Resultados semelhantes foram obtidos por Salamoni et al., (2012) que observaram a maior produção de antimicrobianos, pela cepa de *Streptomyces* 1S, entre 48 e 120h após a incubação á 28°C. Por outro lado, Bervanakis (2008) determinou que a produção ótima de metabólitos secundários, em cultura submersa, por isolados de *Streptomyces* ocorreu após 240h de incubação a 27°C, com a formação de zonas de inibição superiores a 25mm de diâmetro. Iwai & Omura (1982) observaram que o tempo médio de produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foi determinado entre 120 a 240h de incubação.

Neste estudo, os quatro isolados de actinobactérias que apresentaram elevado potencial de inibição do desenvolvimento do fitopatógeno e produção de enzimas líticas foram submetidos uma série de testes para determinação de outras habilidades frequentemente associados ao biocontrole, tais como: a produção de metabólitos voláteis, quitinase, glucanase, sideróforos, AIA, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e colonização de raízes. Excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* foram obtidos para as quatro actinobactérias, que, de modo geral, apresentaram reação positiva para todos os testes.

De acordo com (Berg, 2009) diversos mecanismos estão envolvidos na interação planta-microorganismo. Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal e supressão de doenças são difíceis de serem diferenciados. Além disso, a importância de um mecanismo específico pode variar dentro de diferentes patossistemas (Chet & Chernin, 2002). No entanto, para todas as interações planta-microorganismo de sucesso, a competência para colonizar habitats de plantas é importante (Lugtenberg et al. 2002; Kamilova et al. 2005).

Por outro lado, o antagonismo microbiano inclui (1) a inibição do crescimento microbiano pelos antibióticos difusíveis e compostos orgânicos voláteis (CVO), toxinas e biossurfactantes, (2) a competição por sítios de colonização e nutrientes, (3) competição por minerais, por exemplo, para o ferro e a produção de sideróforos ou sistemas de captação de sideróforos eficiente, (4) degradação dos fatores de patogenicidade do agente patogênico como toxinas, e (5) parasitismo que pode envolver a produção de enzimas



extracelulares para a degradação das paredes celulares, tais como: quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase (Whipps, 2001; Wheatley, 2002; Compant et al., 2005; Haas & D efago, 2005; Raaijmakers et al., 2006). Bact erias associadas a plantas podem reduzir a atividade de micro-organismos patog enicos, por ativação da resistência sist mica induzida, (Conrath et al., 2002 ; VanLoon, 2007 ) .

Além da elevada atividade antifúngica, fisiológica e enzimática, estes promissores isolados de actinobactérias produziram compostos ativos com propriedades bastante estáveis. O isolado R18(6), por exemplo, demonstrou elevada estabilidade frente   temperatura (60% a 100 C), pH (88%), proteases (78%) e EDTA (90%), quando comparado aos demais. Por outro lado, a extra o de metabólitos do extrato bruto foi mais eficiente com os solventes acetato de etila e hexano, enquanto que misturas de solventes apresentaram maior eficiência na separa o dos metabólitos em CCD.

A caracteriza o de metabólitos ativos   importante uma vez que sua utiliza o no controle de doenças de plantas e o estabelecimento dos métodos de purifica o são determinadas através de estabilidade (Mustafa et al., 2004).

A caracteriza o dos isolados 6(2), 6(4) e R18(6) foi realizada por análises do perfil molecular, determinado através do sequenciamento parcial (<1300pb) do 16S rRNA, previamente amplificado pela Rea o em Cadeia da Polimerase, para qual utilizou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores pA e pF, propostos por Edwards et al. (1989). Outros oligonucleotídeos, internos a estes, desenhados especialmente para este trabalho foram empregados no sequenciamento do 16S. A análise das sequências (<1300pb) mostrou que os três isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*, apresentando elevada

similaridade (<99%) com diversas espécies do gênero. No entanto, a árvore filogenética de neighbor-joining baseado nas sequências do rDNA 16S mostrou que os três isolados formaram ramos distintos dos demais representantes da família Streptomycetaceae. Diferentes estudos sobre actinobactérias endofíticas demonstraram a predominância do gênero *Streptomyces* (Bascom-Slack et al., 2009; Oliveira et al., 2010).

A fim de determinar a identificação dos isolados de *Streptomyces* em nível de espécie realizou-se uma série de análises bioquímicas e morfológicas conforme Shirling & Gottlieb, (1966); Williams et al., (1983); Williams et al., (1983). A comparação de características bioquímicas e culturais dos isolados foi realizada com aquelas espécies *Streptomyces*, conhecidas e descritas no Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (Goodfellow, 2012), que apresentaram elevada similaridade na análise do 16S rRNA com cada um dos isolados estudados nesta pesquisa. No entanto, apesar das várias provas terem sido realizadas não foi possível determinar a espécie. Dessa forma os isolados foram denominados de *Streptomyces* 6(2), *Streptomyces* 6(4), *Streptomyces* 16(3) e *Streptomyces* R18(6).

As propriedades fenotípicas geralmente fornecem uma resolução taxonômica insuficiente. A classificação dos estreptomicetos torna-se mais clara com a aplicação de abordagens genotípicas, mas em termos práticos, o grande número de espécies descritas no gênero continua a ser o principal obstáculo da taxonomia de *Streptomyces*.

## 5. CONCLUSÕES

1. Os isolados de *B. sorokiniana*, oriundos de diferentes regiões do Brasil e de outros países apresentaram elevada virulência e sementes de trigo, sendo que os isolados polispóricos apresentam maior agressividade quando comparados aos monospóricos.

2. Isolados monospóricos e polispóricos apresentaram diferente predominância em relação aos tecidos da plântulas colonizados, apresentando maior agressividade às sementes do que sobre as partes aéreas.

3. Actinobactérias endofíticas de tomateiro apresentaram elevada atividade antifúngica, contra isolados os isolados *B. sorokiniana*, tanto em meio sólido como em cultura submersa.

4. A maior produção de compostos antifúngicos ocorreu a 30°C após 72h de incubação sob agitação constante. A mesma teve início durante a fase de crescimento exponencial e continuou na fase estacionária, para a maioria dos isolados.

5. A produção enzimática das actinobactérias foi expressiva, sendo que a detecção da produção de catalase, amilase, pectinase, lipase e esterase foi observada para a mais de 90% dos isolados, enquanto que a degradação de

caseína, carboximetilcelulase e gelatina foi realizada por 60,8, 34,78 e 47,82% dos isolados, respectivamente.

6. Os isolados 6(2), 6(4), 16(3) e R18(6), apresentaram eficiente reação positiva para a produção de compostos voláteis, quitinase e glucanase, sideróforos, fixação de nitrogênio, AIA e colonização de raízes, sendo que somente o isolado R18(6) não apresentou capacidade de solubilizar fosfatos.

7. Os metabólitos ativos produzidos pelo isolado de *Streptomyces* R18(6) apresentaram maior estabilidade às mudanças de temperatura e pH, ação de proteases e EDTA, quando comparado aos demais.

8. A extração de metabólitos do extrato bruto foi mais eficiente com os solventes acetato de etila e hexano.

9. A autobiografia permitiu a identificação da presença de compostos com atividade antifúngica nas bandas que apresentaram  $R_f$  entre 0,7 e 0,9, visualizadas pela revelação com luz UV 365nm e anisaldeído.

10. Os isolados 6(2), 6(4), 16(3) e R18(6), pertencem ao gênero *Streptomyces*.

## 6. PERSPECTIVAS

Realização de testes *in vivo* para avaliar o potencial de biocontrole dos isolados de *Streptomyces* a mancha marrom na cultura do trigo.

Purificação dos compostos com atividade antifúngica produzidos pelos isolados de *Streptomyces* sp. com maior potencial de controle do fitopatógeno *B. sorokiniana*, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas.

Caracterização da estrutura química dos compostos purificados através de Ressonância Magnética Nuclear (NRM).

Determinação do espectro de ação da molécula purificada, bem como seu uso potencial na indústria farmacêutica e agrícola.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV. 382p. 2007.

AGGARWAL, R.; TEWARI, A. K.; SRIVASTAVA, K. D.; SINGH, D. V. Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. **Mycopathologia**, v. 157, n. 4, p. 369–377, 2004.

ANIBOU, M.; CHAIT, A.; ZYAD, A.; TAOURIRT, M.; OUHDOUCH, Y.; BENHERREF, A.. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2019-2025, 2008

ARABI, M. I. E.; JAWHAR, M. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Cochliobolus sativus*. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 17–21, 2007.

BASCOM-SLACK, C. A.; MA, C.; MOORE, E.; BABBS, B.; FENN, K.; GREENE, J. S.; STROBEL, S. A.; Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. **Microbial ecology**, v. 58, n. 2, p. 374–383, 2009.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009.

BERVANAKIS, G. **Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria**: A thesis submitted for the degree of Masters of Science: 209f. Faculty of Health Sciences, Flinders University, Adelaide, Australia. biotechnology. London. UK: Academic press Ltd, p. 329-358. 2008

BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

CAO, L.; QIU, Z.; DAI, X.; TAN, H.; LIN, Y.; ZHOU, S. Isolation of Endophytic Actinomycetes From Roots and Leaves of Banana (*Musa Acuminata*) Plants and Their Activities Against *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 501–504, jul. 2004.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, (Suppl 2), p.14555–14561, 2003.

CHET I.; CHERNIN L. Biocontrol, microbial agents in soil. In:Bitton G (ed) **Encyclopedia of Environmental Microbiology**.Willey, New York, p 450–465, 2002.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant–pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 210–216, 2002.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLÖCKER, H.; EMDE, M.; BÖTTGER, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 19, p. 7843–53, 11 out. 1989.

Duveiller, E.; Garcia Altamirano, I, Virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. **Plant Pathology**, v. 49, p. 235–242, 2000.

Ghazvini, H.; Tekauz, A. Virulence Diversity in the Population of *Bipolaris sorokiniana*. **Plant Disease**, v. 91, p. 814-821, 2007.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189–216, 1983.

GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. [s.l.] Springer, 2012. p. 33–2028.

GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of microbiological methods**, v. 36, n. 1, p. 115–122, 1999.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 307-319, 2005.

IWAI, Y.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **The Journal of antibiotics**, v. 35, n. 2, p. 123, 1982.

KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; AZAROVA, T.; MULDER, I.; LUGTENBERG, B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1809-1817, 2005.

KOSIADA, T. Influence of *Ascochyta*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Fusarium* inoculations on the germination, emergence and infection of barley leaves. **Cereal Research Communications**, v. 41, n. 1, p. 116–125, 2013.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 373-383, 2002.

LUZ, W.C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26, p.597-600, 2001.

MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J.J.; MAFFIA, A.M.C. Fundamentos epidemiológicos no estudo da transmissão de patógenos por sementes. **In:111 Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes** (111: Lavras: 1988). Anais. Campinas: Fundação Cargill, p.114-122, 1988.

MENTEN, J. O. M. Contribuições da patologia de sementes no Brasil. **In: III Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes** (111: Lavras: 1988). Anais. Campinas: Fundação Cargill, p.83-100, 1988.

OLIVEIRA, M. F.; GERMANO DA SILVA, M.; VAN DER SAND, S. T. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 565–572, 2010.

PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. Annual Reviews. **Phytopathology**. v. 39, p.103–133, 2001

POLONI, A.; MULLER, M. V. G.; PESSI, I.; VAN DER SAND, S. T. Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policloniais e monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. **Biociências**, v. 16, n. 1, 2008.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; DE KOCK, M.J. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 7, p. 699-710, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2005. 417p.

SALAMONI, S. P.; MANN, M. B.; CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; GERMANI, J. C.; VAN DER SAND, S. T Preliminary characterization of some *Streptomyces*



species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1847–1856, 5 mar. 2010.

SALAMONI, S. P.; VAN DER SAND, S. T.; GERMANI, J. C. Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S. **Evidência-Ciência e Biotecnologia-Interdisciplinar**, v. 12, n. 2, p. 175–186, 2012.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1 jul. 1966.

SPADARI, C.; ANTUNES, T. C.; TEIXEIRA, R.; MINOTTO, E.; FUENTEFRIA, A. M.; VAN DER SAND, S. T. Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 4, 2013.

TAN, H. M.; CAO, L. X.; HE, Z.F.; SU, G.J. Isolation of Endophytic Actinomycetes from Different Cultivars of Tomato and their Activities Against *Ralstonia solanacearum* in Vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1275-1280, 2006

TARKKA, M.; HAMPP, R. Secondary metabolites of soil *streptomycetes* in biotic interactions. In: **Secondary metabolites in soil ecology**. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 107-126.

THAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B. K.; BORA, T. C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 17, n. 4, p. 242–249, 2007.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169–183, 2000.

Van Loon, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243-254, 2007.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 357-364, 2002.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1743–813, jun. 1983a.

WILLIAMS, S. T.; Goodfellow, M.; Wellington, E. M. H.; Vickers, J. C.; Alderson, G.; Sneath, P. H. A.; Mortimer, A. M. A Probability Matrix for Identification of some *Streptomyces*. **Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1815–1830, 1 jun. 1983b.

WIENER, P. Antibiotic production in a spatially structured environment. **Ecology Letters**, v. 3, p. 122–133, 2000.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 357-364, 2002.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v, 52, p.487–51, 2001.