

LILIAN LEAL LOURENÇO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Streptomyces* COMO
PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli

Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya
Olinto Liparini Pereira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

LILIAN LEAL LOURENÇO

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L892i
2021
Lourenço, Lilian Leal, 1989-
Identificação e caracterização de isolados de *Streptomyces*
como produtores de crescimento vegetal / Lilian Leal Lourenço.
– Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Denise Mara Soares Bazzolli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2021.
Referências bibliográficas: f. 48-57.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.031>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Pragas agrícolas - Controle biológico. 2. Solos -
Fertilidade. 3. Crescimento (Plantas). 4. Actinobacteria. 5.
Mycosphaerella musicola. 6. Mal-de-Sigatoka. I. Bazzolli,
Denise Mara Soares, 1974-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 632.96

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Streptomyces* COMO
PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de novembro de 2021.

Assentimento:

Lilian Leal Lourenço
Autora

Denise Mara Soares Bazzolli
Orientadora

*Dedico a Deus e à minha família pela edificação
pessoal, e à Microbiologia e à agricultura pela
construção profissional...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar bem mais do que aquilo que preciso e me abençoar muito mais do que mereço.

Aos meus pais e meus irmãos, por serem a razão, a base e a origem do que sou hoje e das minhas conquistas. Aos demais familiares, pelo apoio e pelo incentivo nas minhas escolhas. E a todos por entenderem minha ausência.

À minha orientadora, professora Denise M. S. Bazzolli, por ser uma inspiração como profissional, mostrando sempre seu amor pela microbiologia, e como pessoa, sendo sempre paciente, compreensiva e assertiva nas palavras.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, onde minha paixão pela Microbiologia foi despertada e onde meus colegas compartilharam seus conhecimentos comigo. A Damaris, Jéssica, Patrícia (técnica) e Rita, pela convivência e aprendizado. Em especial ao Giarlã, Gigi, pela amizade e por toda colaboração, desde o início dos experimentos até a conclusão dessa dissertação, e por estar sempre disposto a ajudar. Aos demais laboratórios, onde realizei parte dos meus experimentos, pela colaboração com meu trabalho, Laboratório de Genética Molecular de Fungos, Laboratório de Associações Micorrízicas, Laboratório de Micologia e Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aos meus coorientadores, professora Maria Catarina M. Kasuya e professor Olinto Liparini Pereira, pela participação no projeto.

À Universidade Federal de Viçosa pela excelente estrutura, e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola juntamente com seus professores por compartilharem tanto conhecimento.

Às agências de fomento Fapemig, Capes, CNPq e Finep pelo apoio financeiro que proporcionaram a realização desta pesquisa.

À empresa Sítio Barreiras, em especial ao Sr. Fábio Régis, pela oportunidade do mestrado na área de Microbiologia, e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório BioSítio.

À minha banca, professor Wagner Campos Otoni, professor Maurício Dutra Costa e professor Olinto Liparini Pereira, por aceitarem o convite e pelas contribuições. Ao Pedro Marcus Pereira Vidigal, servidor técnico de nível superior do Núcleo de Biomoléculas, pela análise ANI dos genomas colaborando para a caracterização das bactérias. Aos amigos, de Viçosa, Rúzivia, Bianca, Mísia, Momoko, Giarlã, por contribuírem para que os semestres fossem mais leves, e pela amizade, mesmo distantes. E aos amigos que encontrei no Cariri, agradeço pela receptividade, pelo acolhimento e pelo carinho.

Às *Streptomyces*, bactérias pelas quais tenho muito carinho e que me encantam desde o início do mestrado, agradeço por contribuírem com esse trabalho e por todo conhecimento que adquiri ao estudar sobre esse gênero.

Ao Pipoca, meu gato, por me acompanhar onde eu for e por ser tão importante para mim.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Meu muito obrigada, de coração!

“Concordo que a fé é essencial para ter sucesso na vida. Na minha opinião, tudo o que é necessário para a fé é a crença de que, fazendo o nosso melhor, estaremos mais perto do sucesso e que o sucesso em nossos objetivos vale a pena alcançar”.

(Rosalind Franklin)

RESUMO

LOURENÇO, Lilian Leal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2021. **Identificação e caracterização de isolados de *Streptomyces* como promotores de crescimento vegetal.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Olinto Liparini Pereira.

Investimento em bioinsumos é demanda atual e urgente na produção agrícola mundial, mediante a eficiência comprovada dos mesmos na produtividade e na redução/ racionalização do uso de agroquímicos. Assim, este trabalho teve como objetivo ampliar a caracterização de isolados de *Streptomyces* como bioinsumos aptos a desempenharem mecanismos importantes na bananicultura, fornecendo a planta defesas contra diferentes estresses bióticos e abióticos. Para isso, análises comumente utilizadas para a confirmar a natureza de promoção de crescimento vegetal foram usadas como: solubilização de fosfato e zinco; produção de sideróforos e de ácido indolacético e fixação biológica de nitrogênio. Complementarmente, foi avaliado o potencial dos isolados em realizar biocontrole do fungo causador da Sigatoka amarela em campo. Neste trabalho também foi realizada uma análise genética discriminatória dos isolados investigados, sendo sequenciados três genomas provenientes dos isolados mais promissores em abordagem completa. No aspecto promoção de crescimento de plantas, a maioria dos isolados apresentou resultados promissores, com destaque para os isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66, com origem de solo rizosférico e de compostagem, com os melhores resultados sendo considerados isolados promissores de *Streptomyces*, podendo ser classificados como RPCP (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas). Sobre o teste de antagonismo contra *Pseudocercospora musae*, os isolados CAB – C 21, CAB – C 25, CAB – C 50, CAB – S 66, CAB – S 71, CAB – S 72 e CAB – S 96 inibiram o crescimento do patógeno, o que mostra o potencial de biocontrole dos isolados contra um fitopatógeno de grande importância para a bananicultura. A inoculação dos isolados, CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66 no experimento de cultura de tecidos, mostrou que a incorporação de microrganismos benéficos através da microbiolização pode ser uma etapa a ser considerada na produção de mudas micropropagadas de bananeira, reconhecendo que esses isolados podem contribuir com mecanismos de PGP (Plant Growth Promoting) e supressão de fitopatógenos. A impressão digital do genoma dos isolados investigados revelou que se trata de isolados específicos (com exceção dos isolados CAB – C 24 e CAB – C 25), mas revelaram o

agrupamento de isolados provenientes do mesmo ambiente. Com o sequenciamento do genoma dos isolados mais promissores foi possível identificar a espécies de *Streptomyces*. Portanto, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albulus* e *Streptomyces aquilus* correspondem aos isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66, respectivamente. Assim todos os resultados apresentados corroboram a complexidade e diversidade do gênero *Streptomyces*, revelando que maior parte deste gênero também pode ser usado como bioinoculantes, biofertilizantes, agentes de biocontrole e promotores de crescimento de plantas, além de diversas propriedades benéficas que ampliam a capacidade produtiva na cadeia de alimentos.

Palavras-chave: Actinobactéria. Bioinsumos. Promoção de crescimento vegetal. Antagonismo microbiano.

ABSTRACT

LOURENÇO, Lilian Leal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2021.
Identification and characterization of *Streptomyces* isolates as plant growth promoters.
Adviser: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Olinto Liparini Pereira.

Investment in bio-inputs is a current and urgent demand in world agricultural production, through proven efficiency in productivity and in the reduction / rationalization of the use of agrochemicals. Thus, this work aimed to broaden the characterization of obtaining *Streptomyces* as bioinputs able to exert functions of plant growth promotion and control of an important phytopathogen in banana production. For this, various analyzes commonly used to confirm the nature of plant growth promotion were used, such as: solubilization of phosphate and zinc; production of siderophores; production of hydrocyanic acid and biological nitrogen fixation. Complementary studies were carried out to evaluate the potential of the isolates to perform biocontrol of the yellow Sigatoka fungus in the field. In this work, a discriminatory genetic analysis of the investigated isolates was also performed and three genomes from the most promising isolates were sequenced in a complete approach. In the aspect of plant growth promotion, most isolates showed promising results, with emphasis on isolates CAB - C 25, CAB - C 50 and CAB - S 66 with the best results, being considered promising isolates of *Streptomyces*, and can be classified as RPCP (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Regarding the antagonism test against *Mycosphaerella musicola*, the isolates CAB - C 21, CAB - C 25, CAB - C 50, CAB - S 66, CAB - S 71, CAB - S 72 and CAB - S 96, inhibited the growth of pathogen, which shows the potential for biocontrol of the isolates against a phytopathogen of great importance for banana cultivation. The inoculation of isolates, CAB - C 25, CAB - C 50 and CAB - S 66 in the tissue culture experiment showed that the incorporation of beneficial microorganisms through microbiolization can be a step to be considered in the production of micropropagated banana plantlets, recognizing that these isolates may contribute to PGP mechanisms and phytopathogen suppression. The genome fingerprint of the investigated isolates reveals that they are specific isolates (with the exception of the CAB – C 24 and CAB – C 25 isolates), but reveal a cluster of isolates from the same environment. With the genome sequencing of the most promising isolates it was possible to identify the species of *Streptomyces*, therefore, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albulus* and *Streptomyces aquilus*

correspond to the isolates CAB – C 25, CAB – C 50 and CAB – S 66, respectively. Thus, all the results presented corroborate the confirmation of the complexity and diversity of the genus *Streptomyces*, revealing that this genus can also be used as bioinoculants, biofertilizers, biocontrol agents and plant growth promoters, in addition to several beneficial properties that increase the productive capacity in food chain.

Keywords: Actinobacterium. Bioinputs. Promotion of plant growth. Microbial antagonism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 O panorama atual sobre o uso de bioinsumos	12
2.2 Actinobactérias: o promissor gênero <i>Streptomyces</i>	13
2.3 Promoção de crescimento de plantas	15
2.4 O setor da Bananicultura	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Condições de cultivo e manutenção dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.	19
3.2 Caracterização fenotípica dos isolados <i>Streptomyces</i> spp.	20
3.2.1 Parâmetros de promoção de crescimento de plantas	20
3.2.1.1 Produção de ácido indolacético (AIA)	20
3.2.1.2 Produção de sideróforos	21
3.2.1.3 Produção de ácido cianídrico (HCN).....	21
3.2.1.4 Solubilização de fosfato.....	22
3.2.1.5 Solubilização de Zinco	22
3.2.1.6 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	22
3.2.1.7 Análises estatísticas	23
3.2.2 Análise da capacidade de promoção de crescimento de bananeira por <i>Streptomyces</i> spp. <i>in vitro</i>	23
3.2.3 Potencial para biocontrole - Teste de Antagonismo.....	24
3.3 Caracterização genética dos isolados de <i>Streptomyces</i> investigados	24
3.3.1 Análise do polimorfismo genético dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp. por rep-PCR.....	24
3.3.2 Sequenciamento e caracterização genômica de isolados <i>Streptomyces</i> spp.	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Caracterização fenotípica: habilidade em promoção de crescimento vegetal	26
4.2 <i>Streptomyces</i> atuantes em controle biológico - Antagonismo	33
4.3 Promoção de crescimento de bananeira por <i>Streptomyces</i> spp. <i>in vitro</i>	35
4.4 Caracterização genética dos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.	41
4.5 Sequenciamento e caracterização genômica de isolados <i>Streptomyces</i> spp.	43
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

O crescente uso de produtos biológicos, na agropecuária brasileira ocasionou o surgimento de parceria para impulsionar a utilização desses recursos. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu pelo Decreto 10.375 e pelas Portarias 102 e 103 a criação do Programa Nacional de Bioinsumos, que visa ao desenvolvimento e o uso sustentável da abundante diversidade biológica brasileira. A proposta do programa é a produção de novas soluções tecnológicas com origem biológica para consolidar o Brasil como referência na agricultura. Tecnologias sustentáveis são alternativas para a produção agrícola nacional, proporcionando a redução na dependência de produtores rurais em relação a insumos importados, o registro de novos produtos biológicos e o atendimento da demanda crescente da sociedade por produtos de menor impacto econômico e ambiental.

Uma propriedade esperada dos bioinsumos é a promoção de crescimento de plantas, que em regra, são mecanismos mediados por microrganismos benéficos, com ação direta ou indireta no crescimento da planta. Entre as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, o gênero *Streptomyces* do filo Actinobacteria, destaca-se como promotor de crescimento vegetal, sendo considerado promissor na realização de uma agricultura sustentável. Consiste em bactérias Gram-positivas, filamentosas aeróbicas e miceliais, apresentando ciclo de vida complexo. Seus esporos permitem sobrevivência prolongada da espécie em forma inativa no solo, sendo assim resistentes a deficiências de água e nutrientes, e a altas temperaturas. Apresenta metabolismo secundário complexo e diversificado, atribuído ao grande tamanho do genoma. Os metabólitos secundários desempenham importante papel para sobrevivência e defesa da espécie em ambiente estressor.

Streptomyces possui conjunto de propriedades adequadas em relação a promoção de crescimento de plantas. Assim esses mecanismos atuam melhorando o desempenho das plantas sob condições de estresses bióticos e abióticos. As bactérias desse gênero são consideradas promissoras, tanto na PGP (“Plant Growth Promoting”) quanto na supressão de fitopatógenos, devido aos seus potenciais efeitos benéficos ao meio ambiente, pois reduz o uso e o impacto ambiental provocado pelos fertilizantes e defensivos químicos.

Assim, trabalhos como este por si só são justificados visto a demanda atual de uma agricultura mais sustentável, com base de sustentação biológica e fundamentada na ciência e como menor impacto ambiental.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O panorama atual sobre o uso de bioinsumos

No setor agrícola, o controle de doenças fitossanitárias compreende a aplicação de produtos químicos e o desenvolvimento de variedades resistentes a pragas (Pignati et al., 2017). O Brasil é um dos maiores produtores agropecuários do mundo e para manter alta produtividade o uso de insumos químicos, como fertilizantes e defensivos, é expressivo (Pignati et al., 2017). Despesas com insumos químicos permitem visualizar a evolução do seu uso, de acordo com o Censo Agropecuário do IBGE a despesa total com agrotóxicos em 1996 foi de aproximadamente R\$ 7 bilhões, já em 2017 foi aproximadamente de R\$ 32 bilhões (Valadares et al., 2020). Atualmente na prática agrícola houve o aumento do uso de fertilizantes para manutenção do crescimento das safras. Porém, o uso excessivo desses químicos tem sido muito discutido mediante questões ambientais e riscos à saúde humana (Soumare et al., 2020).

No contexto global, as práticas devem ser remanejadas de forma equilibrada, uma vez que o uso indevido, de insumos químicos, é alvo de discussão ampla acerca do ambiente. Portanto, recursos biológicos são estratégias importantes, atuais e urgentes no sucesso das práticas agrícolas e aumento na produtividade. Essas estratégias são caracterizadas como sustentáveis do ponto de vista ecológico, logo não causam poluição, desequilíbrio ecológico do solo e resistência entre os fitopatógenos (Tripathi et al., 2019). Problemas como esses podem ser solucionados através de uma abordagem biológica, com práticas de manejo alternativo para controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento de plantas (Alori e Babalola, 2018). No contexto global o uso de biofertilizantes, estratégia para agricultura sustentável, tem ganhado muito espaço, portanto, como alternativa ao uso exclusivo de defensivos agroquímicos (Wang et al., 2020).

Os produtos biológicos agrícolas apresentam mercado global em ascensão com estimativa de crescimento próximo a 19 bilhões de dólares em 2025. Este crescimento do mercado de produtos biológicos agrícolas tem como principais impulsos a preocupação com a segurança alimentar e ambiental e, também, suas regulamentações (Agricultural Biologicals Market, 2020). Em 2021, estima-se crescimento de 33% no setor e faturamento estimado em R\$ 1,7 bilhões; logo o mercado de produtos biológicos se mostra otimista (Croplife Brasil, 2021a).

Assim, os bioinsumos representam alternativa de aumento da produtividade e redução de impactos ambientais (MAPA, 2021a). Como forma de incentivo o Brasil criou o Programa

Nacional de Bioinsumos (MAPA, 2020) e, atualmente, o consumo de insumos biológicos no país apresenta aumento em 28%, enquanto o incremento mundial está em aproximadamente 15% (MAPA, 2021b). Isto demonstra que o mercado está em franca ascensão e que há demanda para novos produtos.

Atualmente, o desenvolvimento e o fortalecimento de sistemas agrícolas sustentáveis são fundamentais, é indispensável a prática de utilização de insumos biológicos, principalmente biofertilizantes e biocontroles (Soumare et al., 2020). Os microrganismos são considerados componentes dinâmicos em qualquer ecossistema e, no solo, são responsáveis pelo desempenho desse sistema complexo, auxiliando no seu equilíbrio e restauração (Dutta e Thakur, 2020). Microrganismos quando associados às plantas são agrupados em benéficos, deletérios e neutros, considerando seus efeitos no crescimento vegetal. As plantas interagem, de forma contínua, com ampla diversidade de bactérias. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são bactérias benéficas que auxiliam e promovem crescimento vegetal (Wang et al., 2020). A rizosfera é considerada o principal habitat de diversas rizobactérias, também chamadas de PGPR (“Plant Growth-Promoting Rhizobacteria”) (Dutta e Thakur, 2020).

Biofertilizantes são produtos compostos por linhagens viáveis de microrganismos com objetivo de incrementar o crescimento das plantas, sem causar danos ao meio ambiente. Seu uso é um fator essencial para agricultura moderna, baseado no potencial renovável, no baixo custo e na ação ecologicamente correta, garantindo agricultura sustentável e com menor impacto ambiental (Fasusi et al., 2021). Neste contexto algumas rizobactérias do gênero *Streptomyces* apresentam-se como promissora alternativa ao uso exclusivo de fertilizantes químicos, constituindo destacada aplicação como biofertilizantes (Rani et al., 2018).

2.2 Actinobactérias: o promissor gênero *Streptomyces*

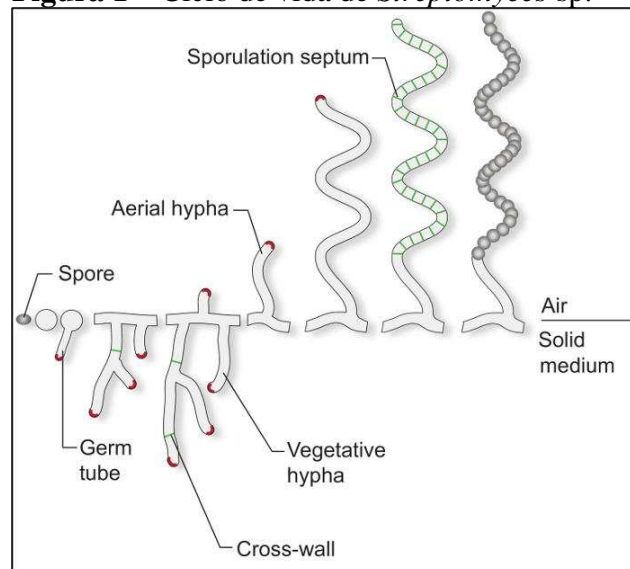
O filo Actinobacteria apresenta membros importantes, sendo composto por bactérias Gram-positivas e dividido em 6 classes, 25 ordens, 52 famílias e 232 gêneros, representando o maior grupo reconhecido de bactérias (Sathya et al., 2017). As actinobactérias são ubíquas, sendo o solo seu habitat principal (Satheeja e Jebakumar, 2011), e estão amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos. A diversidade ecológica destas bactérias tem reflexo no seu potencial metabólico, visto que essas bactérias são produtoras de ampla variedade de produtos naturais bioativos (van Bergeijk et al., 2020).

O filo compreende bactérias com expressiva produção de metabólitos secundários com impacto reconhecido na saúde humana e animal; eficiência na decomposição e ciclagem de

nutrientes; promoção do crescimento de plantas e bioproteção contra fitopatógenos (Viaene et al., 2016). Dentro desse filo, o gênero *Streptomyces* destaca-se dos demais, apresentando papel promissor no estabelecimento de agricultura sustentável, em razão de características como promoção do crescimento de plantas, equilíbrio do ecossistema do solo, atuando na ciclagem e biodisponibilização de nutrientes; supressão de patógenos; além de contribuir nas respostas da planta a estresses bióticos e abióticos de diferentes formas (Dutta e Thakur, 2020; Salwan et al., 2020).

O gênero *Streptomyces* compreende bactérias Gram-positivas filamentosas, ubíquas, com ciclo de crescimento complexo, abrangendo a formação de hifas ramificadas e a subsequente diferenciação em ramos aéreos, com cadeias de esporos como formas distintas e resistentes (Barreiro e Martínez-Castro, 2019) (Figura 1). *Streptomyces* spp. apresentam genomas relativamente grandes, com aproximadamente 8 a 9 Mpb, e alto conteúdo GC com mais de 70% (Liu et al., 2019). Atualmente este gênero consiste em 844 espécies e 38 subespécies (Law et al., 2018).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Streptomyces* sp.



Fonte: Schlimpert et al. (2016).

O metabolismo secundário complexo é característica marcante de *Streptomyces*, assim seus metabólitos secundários constituem a principal fonte de antibióticos. Estes correspondem a mais de dois terços dos antibióticos naturais com uso clínico aprovado e regular (Chang et al., 2021). A descoberta da estreptomicina, em 1944, tornou o estudo com *Streptomyces* mais relevante no campo da medicina, entretanto, de 2014 a 2019 houve notável crescimento de pesquisas destinadas à promoção de crescimento de plantas (Romano-Armada et al., 2020).

Bactérias do gênero *Streptomyces* são consideradas potenciais na promoção de efeitos benéficos como a redução no impacto ambiental gerado pelo uso dos químicos, tanto para a promoção do crescimento de plantas quanto para o controle de fitopatógenos (Vurukonda et al., 2018). Os mecanismos de PGP apresentados comumente por membros deste gênero compreendem: produção de substâncias como fitohormônios, como o ácido indolacético (AIA); produção de sideróforos; solubilização de fosfato e de zinco; produção de ácido cianídrico (HCN); fixação biológica de nitrogênio, entre outros (Vurukonda et al., 2018).

Os mecanismos de atividade de *Streptomyces* tanto para promoção de crescimento de plantas quanto para biocontrole são bem descritos em alguns estudos sobre o tema (Sousa e Olivares, 2016; Subramaniam et al., 2016; Vurukonda et al., 2018). Desse modo, a atividade de promoção de crescimento de plantas de *Streptomyces* pode ser considerada alternativa de inovação e sustentabilidade para sistemas agrícolas (Vurukonda et al., 2018).

2.3 Promoção de crescimento de plantas

O aumento da produção agrícola global, de maneira mais sustentável exige equilíbrio e uso racional de fertilizantes químicos e aumento no uso de biofertilizantes. Em vista disso, uma tendência global é o emprego de microrganismos promotores de crescimento vegetal nas práticas agrícolas (Etesami, 2020).

A descoberta de novos agentes de biocontrole tem aumentado nos últimos anos e o gênero *Streptomyces* tem-se destacado por ser opção natural, visto já fazer parte dos ecossistemas alvos (Olanrewaju e Babalola, 2018). A habilidade, deste gênero, no controle de patógenos vegetais e no próprio crescimento vegetal é em virtude de alguns fatores, tais como a síntese de reguladores de crescimento de plantas (Goudjal et al., 2013), produção de sideróforos (Vijayabharathi et al., 2015), produção de antibióticos (Couillerot et al., 2013), secreção de compostos e competição por nutrientes (Jones e Elliot, 2017). A produção de metabólitos secundários é a propriedade mais importante deste gênero e é amplamente explorada em biocontrole (Olanrewaju e Babalola, 2018).

A biofertilização é uma interação da promoção de crescimento, que funciona como um mecanismo que diretamente melhora a obtenção de nutrientes pelas plantas (Sousa e Olivares, 2016). A fase de crescimento das plantas pode, através da bioestimulação, adquirir compostos metabólicos microbianos produzidos para atuar como fitohormônios (Jog et al., 2014). E a bioproteção, que ativa mecanismos indiretos da promoção de crescimento de plantas, tem a capacidade de minimizar a ação de fitopatógenos (Qiao et al., 2014; Sousa e Olivares, 2016).

No Brasil, o consumo de bioinsumos tem sido estimulado e há aumento expressivo na utilização superando a média mundial. Porém, ainda é um campo que está em desenvolvimento e expansão. No setor da fruticultura, como a bananicultura, o interesse por insumos biológicos vem de encontro às necessidades dos consumidores e do setor de exportação. Neste setor há registro de crescimento no uso de bioinsumos em quase 20%, sendo que em cerca de 50% de toda a cadeia de produção de banana já usa biodefensivos (Croplife Brasil, 2021b).

2.4 O setor da Bananicultura

A bananicultura é atividade de grande importância para o agronegócio brasileiro, sendo uma das frutas mais consumidas no mundo e produzida em 138 países em 2018 (FAO, 2019). A produção mundial de bananas em 2018 atingiu cerca de 115,7 milhões de toneladas e a produção nacional em 2019 foi em torno de 6,8 milhões de toneladas (Anuário Brasileiro de Horti&Fruti, 2021). A banana, também, apresenta importante papel como fonte de nutrientes, principalmente em países em desenvolvimento (Lopes e Michereff, 2018).

O Brasil é o quarto maior produtor de banana no mundo, ficando atrás de países como Índia, China e Indonésia, sendo praticamente toda a sua produção destinada ao mercado interno e, anualmente, o comércio da banana apresenta faturamento da ordem de R\$ 13,8 bilhões (Nomura, 2020).

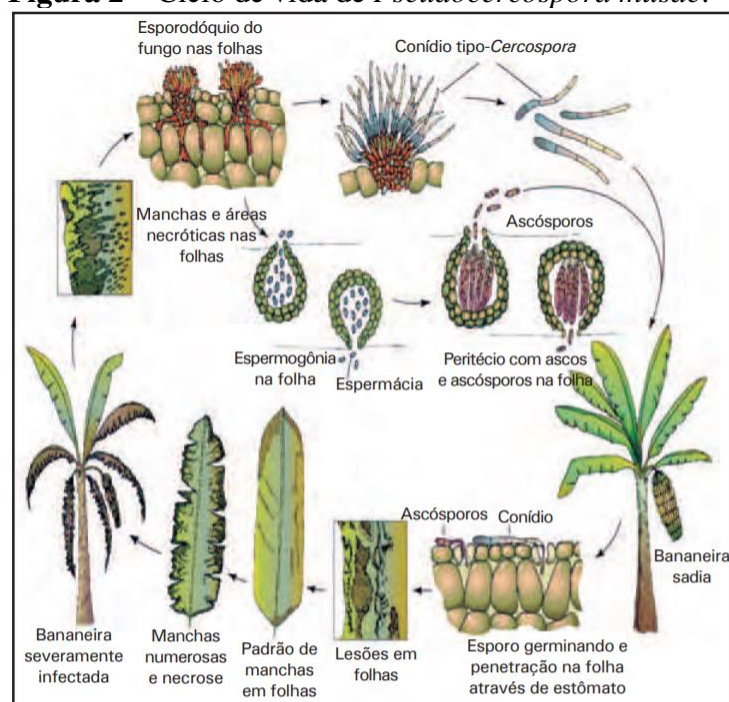
As doenças fúngicas são uma das principais causas de prejuízos em culturas agrícolas mundiais (Fisher et al., 2018). Semelhante às demais culturas, a bananeira é atacada por diversas pragas e doenças, sendo a doença mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), uma das mais impactantes da cultura (Silva et al., 2016). Mesmo o Brasil relatando a presença do mal-do-Panamá, a raça 4 tropical (RT4) de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), praga quarentenária A1 para África e América, é atualmente a maior ameaça da bananicultura mundial e, portanto, representa ameaça para o mercado brasileiro (Dita et al., 2010).

Outra doença importante para a bananicultura brasileira é a Sigatoka-amarela, causada pelo fungo *Pseudocercospora musae* com elevadas perdas tanto de produção quanto na qualidade da fruta (Cordeiro et al., 2011).

As variações climáticas e as múltiplas variedades hospedeiras são determinantes para a entrada de um patógeno altamente adaptado às condições brasileiras, mesmo nas regiões de clima mais hostil com longo período seco. O patógeno juntamente com a diversidade ambiental favorece a formação de população de *P. musae* altamente variável em virulência e agressividade, o que dificulta controlar a doença (Cordeiro et al., 2011).

A espécie *Pseudocercospora musae*, agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira, apresenta alta diversidade genética devido as variações climáticas e aos múltiplos hospedeiros no território brasileiro; a doença também é conhecida como Mal-de-Sigatoka, Cercosporiose ou Mancha foliar da bananeira, e foi observada a primeira vez em 1902 (Cordeiro et al., 2011). A primeira breve descrição do fungo foi feita por Zimmermann, considerando uma nova espécie *Cercospora musae* Zimm (Zimmermann, 1902). Na década de 30, Leach, encontrou o fungo do filo Ascomycota denominado *Mycosphaerella musicola* (Leach, 1941) (Figura 2).

Figura 2 – Ciclo de vida de *Pseudocercospora musae*.

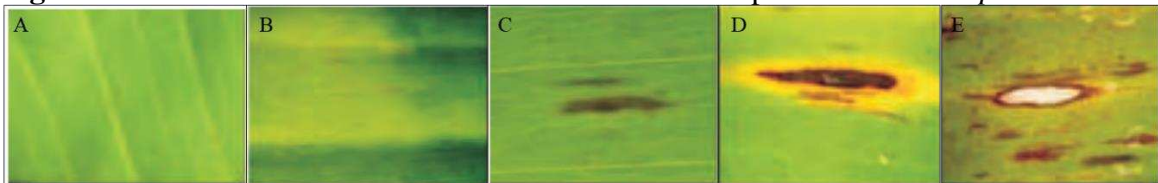


Fonte: Cordeiro et al. (2011).

A doença é caracterizada como lesões necróticas foliares, causando a diminuição da capacidade fotossintética da planta, conseqüentemente com redução no número e no tamanho dos frutos por cacho com amadurecimento prematuro dos frutos (Passos et al., 2013). Os sintomas ocorrem nas folhas jovens da planta, iniciando na folha vela (zero) podendo infectar até a folha quatro. Inicialmente a infecção é caracterizada por leve descoloração com formato de ponto entre as nervuras secundárias. Em seguida, há aumento do ponto descolorido, formando uma estria de coloração amarela. Posteriormente, as pequenas estrias crescem, formando manchas necróticas, elípticas, alongadas, dispostas paralelamente as nervuras secundárias. Ao final, há o desenvolvimento de uma lesão de centro deprimido com coloração cinza, circundada por um halo amarelo (Kimati et al., 2005).

Os estádios de desenvolvimento da lesão são: estágio I – fase inicial de um ponto ou risca de até 1 mm de comprimento com leve descoloração; estágio II – à risca apresenta pouco mais de 1 mm de comprimento com uma descoloração mais intensa; estágio III – fase de mancha com formato oval alongada com coloração parda, de contornos mal definidos; estágio IV – paralisação do crescimento do micélio, aparecimento de uma halo amarelo em torno da mancha e início da esporulação do patógeno; estágio V – fase final da mancha com formato oval alongada, com 12 a 15 mm de comprimento e 2 a 5 mm de largura, o centro é totalmente deprimido com tecido seco e coloração cinza (Figura 3). Com início do estágio de mancha há observação de frutificações do fungo em forma de pontuações negras. Em estádios avançados, ocorre a junção das lesões, comprometendo uma grande área foliar. Isso caracteriza o efeito mais drástico, a morte prematura das folhas (Kimati et al., 2005).

Figura 3 – Estádios de desenvolvimento da lesão causada por *Pseudocercospora musae*.



A – Estádio I, **B** – Estádio II, **C** – Estádio III, **D** – Estádio IV, **E** – Estádio V. **Fonte:** Cordeiro et al. (2011).

Desde seu aparecimento a Sigatoka-amarela foi se espalhando pelas Américas Central e do Sul e no Brasil foi relatada a primeira vez em 1944 no Amazonas, encontrando-se disseminada por todas as regiões produtoras de banana do Brasil e do mundo, provocando imenso prejuízo na produção de frutos (Cordeiro et al., 2011). As perdas de produção são estimadas entre 50 e 100%, pois os frutos contaminados não possuem valor comercial (Passos et al., 2013).

Neste contexto, é possível que parte das espécies de *Streptomyces* apresentem potencial de atuação direta na promoção do crescimento vegetal e, também, proporcionem atividade de biocontrole contra fitopatógenos como *P. musae*. Embora a busca por novos microrganismos com potencial de promoção do crescimento vegetal e de biocontrole de fitopatógenos seja uma necessidade urgente, a aplicação de microrganismos benéficos em plantios comerciais ainda é baixa.

O trabalho com as actinobactérias rizosféricas por nosso grupo teve início com a tese de Melo (2019), analisando a estrutura e a diversidade de bactérias e fungos do solo rizosférico de bananeira de plantio comercial e da compostagem aplicada na cultura; e, também, o isolamento

e a identificação de actinobactérias com potencial *in vitro* de biocontrole de fitopatógenos, e, *in vivo*, na promoção de crescimento vegetal, com análises em casa de vegetação. Do total de actinobactérias avaliadas quanto ao potencial antagonista, 11 isolados foram considerados promissores, sendo analisados, seguidamente, em relação ao potencial de promoção de crescimento vegetal e supressão de fitopatógenos em mudas de bananeiras. O presente trabalho realizou as análises *in vitro*, dos isolados investigados anteriormente, sobre os mecanismos envolvidos com o PGP e biocontrole de doença fúngica de bananeira. Os resultados encontrados são mostrados e discutidos adiante, e os isolados de *Streptomyces* foram caracterizados em relação a determinantes importantes de promoção de crescimento vegetal e os que mais se destacaram foram identificados em nível genético.

3. MATERIAL E MÉTODOS

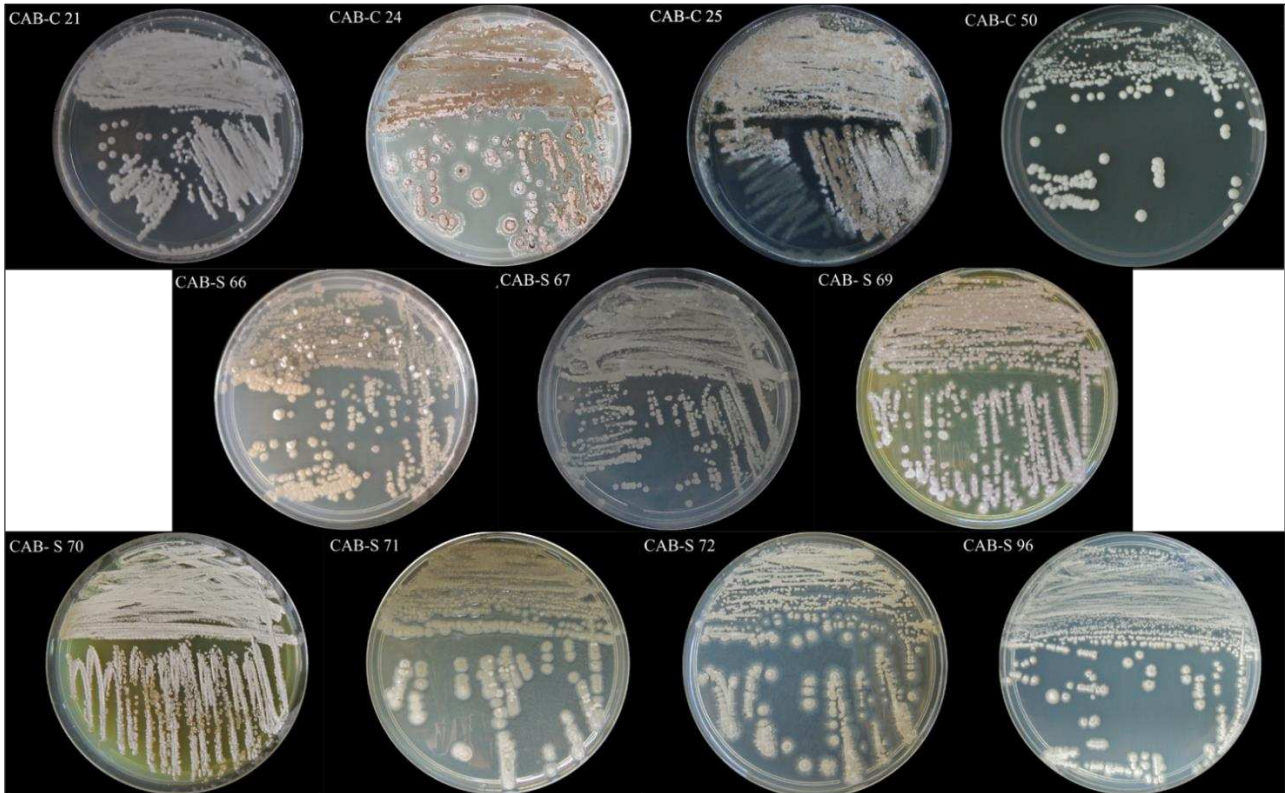
O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (LGMB), pertencente ao Departamento de Microbiologia e situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - Bioagro, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG e no Laboratório de Cultura de Tecidos/ Departamento de Biologia Vegetal/ Bioagro.

3.1 Condições de cultivo e manutenção dos isolados de *Streptomyces* spp.

Os isolados de *Streptomyces* analisados neste trabalho, total de 11 pertencem à coleção de bactérias rizosféricas de importância agrícola pertencente ao LGMB e previamente obtidas por Melo (2019), sendo os isolados denominados: CAB – C 21, CAB – C 24, CAB – C 25, CAB – C 50, CAB – S 66, CAB – S 67, CAB – S 69, CAB – S 70, CAB – S 71, CAB – S 72 e CAB – S 96. A Figura 4 mostra o aspecto das colônias dos isolados investigados neste trabalho. Todos os isolados estudados pertencem ao gênero *Streptomyces* e a caracterização dos isolados foi realizada a partir de análises culturais, microscópicas e sequenciamento do rDNA 16S (Melo, 2019). Os isolados bacterianos foram mantidos em estoque como suspensão de esporos em glicerol 25 % e, também, em meio crioprotetor composto por duas soluções denominadas I (*skim milk power* 10 g, água destilada 50 ml) e II (glicose 7,5 g, sacarose 10 g, albumina bovina 1 g, água destilada 50 ml) na proporção 1:1, ambos a -20 °C e -80 °C. Rotineiramente os isolados foram cultivados em meio ISP-2 (International *Streptomyces* Project) extrato de

levedura 4 g, extrato de malte 10 g, Dextrose 4 g, ágar 15 g por litro de acordo com Aouiche et al. (2014), a 28 °C por no mínimo 5 dias ou de acordo com o experimento específico.

Figura 4 – Aspectos fenotípicos de isolados de *Streptomyces* estudados neste trabalho.



Fonte: Melo (2019).

3.2 Caracterização fenotípica dos isolados *Streptomyces* spp.

3.2.1 Parâmetros de promoção de crescimento de plantas

Todas as análises descritas abaixo foram conduzidas em réplicas experimentais e 3 réplicas biológicas.

3.2.1.1 Produção de ácido indolacético (AIA)

A produção de AIA foi verificada de acordo com o método de Glickmann e Dessaux (1995), com adaptação conforme descrito a seguir. Os isolados foram inoculados em meio YM (glicose 10 g (Êxodo Científica), peptona 5 g (Kasvi), extrato de malte 3 g (Kasvi), extrato de levedura 3 g (Kasvi), ágar 20 g (Sigma-Aldrich), água destilada 1 litro), a 28 °C, durante 5 dias. Após o crescimento do isolado em placa, 5 discos de 8 mm foram cortados e transferidos para Erlenmeyer contendo 25 ml de caldo YM suplementado com solução estéril de 0,2 % de L-triptofano. Os frascos foram incubados durante 3 dias a 28°C e sob agitação (150 rpm). Em

seguida ao crescimento da cultura bacteriana, alíquota de 2 ml da suspensão foi transferida para um microtubo e centrifugada a 11.000 rpm por 3 min. A partir do sobrenadante obtido foi retirado 1 ml e acondicionado em novo microtubo envolto com papel alumínio. Junto ao sobrenadante, foi adicionado 1 ml do reagente de Salkowsky (1 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) + 49 ml de HCl_4 (35%)), e a amostra foi mantida por 30 min no escuro. A leitura da absorbância das amostras foi realizada no aparelho espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) com a densidade óptica de 530 nm. A concentração de AIA das amostras foi determinada utilizando-se uma curva de calibração de AIA comercial (Sigma – Aldrich) (0 a 90 $\mu\text{g/ml}$) como padrão a partir da obtenção da equação de regressão linear. A mudança de cor da amostra com a coloração final rosada foi apontada como parâmetro da produção de AIA.

3.2.1.2 Produção de sideróforos

Para detectar a produção de sideróforos pelos isolados a metodologia utilizada foi baseada na descrita por You et al. (2005). Os isolados foram inoculados em meio YM, a 28 °C durante 5 dias. Após o crescimento do isolado em placa, 3 discos de 8 mm foram cortados e inoculados em três pontos equidistantes na placa com meio Gaus N° 1 modificado (glicose 20 g, KNO_3 1 g, NaCl 0,1 g, K_2HPO_4 0,5 g, MgSO_4 0,1 g, ágar 15 g), suplementado com 100 ml de solução de Cromo Azurol S (CAS), e incubados por 10 dias a 28°C. O preparo da solução CAS foi realizado conforme a descrita por Alexander e Zuberer (1991). A formação de um halo alaranjado ao redor do disco foi vista como parâmetro da produção de sideróforos. Os halos foram mensurados com paquímetro digital e sua média calculada.

3.2.1.3 Produção de ácido cianídrico (HCN)

O método colorímetro de Lorck, descrito por Thampi e Bhai (2017), foi empregado para determinação da produção de ácido cianídrico pelos isolados de *Streptomyces* spp. analisados neste trabalho. Os isolados foram inoculados em meio YM e mantidos a 28 °C durante 5 dias. E, posteriormente, foram inoculados em meio Bennett (extrato de carne 5 g, peptona 10g, NaCl 5 g, ágar 15 g, água destilada 1 litro) suplementado com solução de glicina (4,4 g/l). Após 2 dias do crescimento das colônias foi adicionado, um disco de papel filtro Whatman n° 1, na tampa da placa de Petri. O papel filtro foi embebido em solução de ácido pícrico 1 % (2 g de Na_2CO_3 e 1 g de ácido pícrico em 100 ml de água destilada). A placa foi vedada com Parafilm M e incubada a 28°C durante 5 dias. Como resultado desta análise foi considerado como

parâmetro o aparecimento de uma coloração marrom avermelhada, correspondente à colônia, no papel filtro, como indicativo da produção de ácido cianídrico.

3.2.1.4 Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato dos isolados foi determinada pela inoculação dos isolados em meio Pikovskaya, conforme Mehta e Nautiyal (2001). Os isolados foram inoculados em meio YM e mantidos a 28 °C durante 5 dias. Após o crescimento do isolado em placa, 3 discos de 8 mm foram cortados e inoculados em três pontos equidistantes na placa com meio Pikovskaya (glicose 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g, NaCl 0,2 g, MgSO_4 0,1 g, KCl 0,2 g, extrato de levedura 0,5 g, MnSO_4 0,002 g, FeSO_4 0,002 g, ágar 15 g, água destilada 1 litro.), contendo fosfato tricálcio (5 g/l), e incubados a 28°C por 7 dias. O desenvolvimento de uma zona clara ao redor do disco foi observado como parâmetro para a solubilização do fosfato. Os halos foram mensurados com paquímetro digital e suas médias calculadas.

3.2.1.5 Solubilização de Zinco

A habilidade dos isolados em solubilização de zinco foi realizada de acordo com Goteti (2013). Os isolados foram inoculados em meio YM e mantidos a 28 °C durante 5 dias. Após o crescimento do isolado em placa, 3 discos de 8 mm foram cortados e inoculados em três pontos equidistantes na placa com meio de Mineral (glicose 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, KCl 0,2 g, K_2HPO_4 0,1 g, MgSO_4 0,2 g, ágar 15 g), suplementado com ZnO insolúvel a 0,1 g/l. A incubação foi a 28°C durante 10 dias. O aparecimento de uma zona clara ao redor dos discos correspondeu ao parâmetro da solubilização do zinco. Os halos foram mensurados com paquímetro digital e suas médias calculadas.

3.2.1.6 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Os isolados de *Streptomyces* spp. foram analisados quanto à capacidade de fixação biológica de nitrogênio, de acordo com a metodologia descrita por Dobereiner e Baldani (1996). Os isolados foram inoculados em meio YM e mantidos a 28 °C durante 5 dias. Após o crescimento do isolado em placa, uma colônia do isolado foi retirada do meio de cultura, com auxílio de uma alça de platina, e inoculada em picada, no tubo de ensaio contendo 10 ml de meio Nfb semissólido (ácido málico 5 g, K_2HPO_4 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, solução de micronutrientes 2 ml (0,04 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g H_3BO_3 , 1,0 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.175 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), solução de azul de bromotimol 0,5

% 2 ml, solução de 4M FeEDTA 4 ml (0,4 %), solução de vitaminas 1 ml (0,1%), KOH 4,5 g, ágar 1,75 g, água destilada 1 litro). A mudança de coloração do meio de cultura, de verde para azul, representou como positivo o parâmetro de fixação biológica de nitrogênio.

3.2.1.7 Análises estatísticas

Os testes de produção de ácido indolacético (AIA) e de sideróforos, e, solubilização de fosfato e de zinco foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott.

3.2.2 Análise da capacidade de promoção de crescimento de bananeira por *Streptomyces* spp. *in vitro*

Os isolados de *Streptomyces* considerados promissores após os testes anteriores foram selecionados para teste de promoção de crescimento em mudas de bananeira micropropagadas, da cultivar Prata-Anã, adquiridas da empresa Flora Biotecnologia LTDA (Itajaí – SC). A metodologia utilizada foi baseada em Queiroz et al. (2006) e Qin et al. (2015) e descrita a seguir. Os isolados selecionados, CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66, foram inoculados em meio ISP – 2 (extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, dextrose 4 g, ágar 20 g, água destilada 1 litro), e incubados a 28 °C por 5 dias. Após esse período foram preparadas as suspensões de inóculo com a lavagem e raspagem das placas com 10 ml de solução MS (Murashige e Skoog, 1962) por placa. A suspensão preparada contava com um total de 4 placas para 400 ml de solução MS (mistura em pó de sais de MS 4,3 g, sacarose 30 g, inositol 10 g, AIB 0,5 ml, complexo vitamínico de MS 10 ml (ácido nicotínico 50 mg, piridoxina.HCl 50 mg, glicina 20 mg, tiamina.HCl 10 mg), água destilada 1 litro). O experimento foi composto por 5 tratamentos, sendo eles: Tratamento 1 – CAB – C 25, Tratamento 2 – CAB – C 50, Tratamento 3 – CAB – S 66, Tratamento 4 – Consórcio (3 isolados) e Tratamento 5 – Controle, onde cada tratamento era formado por 15 mudas micropropagadas. Sob condições assépticas, em fluxo laminar, as mudas inicialmente foram retiradas dos frascos originais e submetidas a um ‘toalete’, onde com auxílio de pinça e bisturi foi realizada a retirada de raízes e folhas senescentes. Em seguida, 5 mudas foram colocadas em um frasco de policarbonato estéril (Ralm) contendo 50 ml da suspensão do inóculo, durante 15 min. Posteriormente, as mudas foram transferidas para frascos de vidro de 500 ml contendo 100 ml de meio MS (meio MS em pó 4,3 g, sacarose 30 g, Phytigel® 2,5 g, inositol 100 mg, AIB 0,5 mg, vitaminas (ácido nicotínico 50 mg, piridoxina 50mg, glicina 20 mg, tiamina 10 mg), água destilada 1 litro), uma muda por frasco. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno randômico autoclavável de 67.5 mm de diâmetro

(Biotampas, Ralm). Esse processo foi realizado em todos os tratamentos e ao final todos os frascos foram acondicionados em sala de crescimento com irradiância controlada de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provida por duas lâmpadas LED (SMD 100, 18W, Vilux®, Vitória, ES, Brasil), sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

A colonização das raízes foi observada pela formação de uma turbidez de aspecto esbranquiçado ao longo das raízes. Os efeitos da promoção de crescimento foram avaliados durante 15 dias através da medição da altura do pseudocaule, número de folhas e de raízes. O controle negativo constituiu a planta sem inóculo microbiano.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os frascos contendo as mudas foram dispostos aleatoriamente numa bancada em fileiras, e, dessa forma, cada fileira continha um frasco de cada tratamento, totalizando cinco frascos por fileira.

3.2.3 Potencial para biocontrole - Teste de Antagonismo

Os isolados de *Streptomyces* foram avaliados quanto à atividade inibitória frente ao crescimento do fitopatógeno *Pseudocercospora musae*, responsável por causar a doença Sigatoka-Amarela em bananeiras. As análises foram conduzidas de acordo com Thampi e Bhai (2017) com modificações. Isolados de *Streptomyces* foram estriados em dois locais (comprimento de 4 cm) em placa de Petri contendo meio BDA (Kasvi), a uma distância de 2,5 cm da borda da placa. Na mesma placa foi estriado o patógeno (comprimento de 4 cm) entre os dois inóculos do isolado investigado quanto ao potencial de biocontrole. As inoculações, do isolado e do patógeno, foram realizadas sequencialmente. As placas foram incubadas em BOD a 28°C durante 15 dias, e o controle experimental correspondeu ao inóculo apenas do patógeno. Este experimento foi conduzido em replicata experimental e biológica.

3.3 Caracterização genética dos isolados de *Streptomyces* investigados

3.3.1 Análise do polimorfismo genético dos isolados de *Streptomyces* spp. por rep-PCR

O polimorfismo genético dos isolados foi determinada pela técnica de rep-PCR, utilizando o primer BOXA1R (5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3') conforme Rossi et al. (2013). Inicialmente o DNA dos isolados foi obtido através de lise térmica, onde com auxílio de uma alça descartável de 10 μl foi coletada uma pequena porção da bactéria inoculada anteriormente em meio ISP-2, essa porção foi ressuspensa em 1ml de água ultrapura, seguido do aquecimento a 98°C por 10 min, em bloco de aquecimento, e centrifugação por 1 min, e ao final o sobrenadante foi retirado e adicionado a reação de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em 25 µl por amostra contendo 10,5 µl de água, 1x de tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM do primer BOX, 2,5 µl DMSO, 1,5 U de GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, USA) e 25 ng de DNA. As condições do ciclo de amplificação foram baseadas em Lapaz et al. (2017), com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 min, hibridação a 50°C durante 1 min e extensão a 65°C durante 8 min; e uma etapa de extensão final a 65°C por 10 min, no termociclador C1000™ Thermal cycler (BioRad, Richmond, USA). Os fragmentos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e analisados posteriormente.

3.3.2 Sequenciamento e caracterização genômica de isolados *Streptomyces* spp.

A partir dos resultados supracitados, 3 isolados considerados mais promissores, levando-se em consideração outros resultados obtidos por Melo (2019) e Gomes (2020), foram escolhidos para o sequenciamento dos genomas. Para isso, o DNA total foi obtido, utilizando o kit comercial FastDNA™ SPIN KIT (MP Biomedicals) de acordo com as recomendações do fabricante a partir da massa micelial dos isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66 cultivados na superfície de papel celofane sobre o meio ISP-2 sólido previamente incubados à temperatura de 28°C por 2 dias. As amostras de DNA obtidas foram avaliadas em função da quantidade (rendimento) e aspectos qualitativos (integridade) a partir de análises em espectrofotômetro (Nanodrop), eletroforese em gel de agarose e por Qubit (fluorescência). As amostras que apresentaram qualidade adequada foram enviadas a empresa MacroGen (Coreia do Sul) e sequenciadas a partir da plataforma Illumina TruSeq. A construção de uma biblioteca foi realizada utilizando o kit TruSeq Nano DNA e a análise básica (montagem) dos genomas foi feita pelo método De Novo. As análises para identificação das espécies foi realizada através da análise de ANI (Average Nucleotide Index), onde foi realizado o download de genomas de *Streptomyces* disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information), o alinhamento dos genomas utilizando a ferramenta BLASTn (versão 2.6.0), a seleção dos melhores hits obtidos para a análise de ANI, o cálculo do índice de ANIm e a seleção dos genomas com os dez maiores valores de ANIm para cada isolado de acordo com Richter & Rosselló-Móra (2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

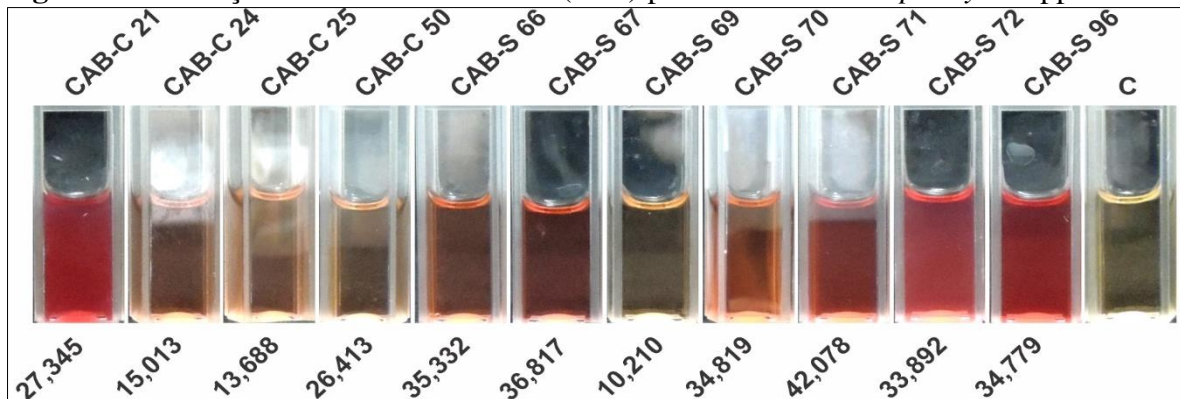
Os 11 isolados promissores a partir de parâmetros avaliados anteriormente por Melo (2019) foram caracterizados *in vitro* em relação à produção de compostos envolvidos em promoção de crescimento vegetal. Assim, a caracterização fenotípica foi baseada na análise dos seguintes parâmetros: produção de AIA; solubilização de fosfato e zinco; produção de sideróforos, capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de ácido cianídrico.

4.1 Caracterização fenotípica: habilidade em promoção de crescimento vegetal

A promoção de crescimento de plantas pode ocorrer por vários mecanismos que inclui a produção de fitohormônios, que desempenham um papel importante para as plantas (Keswani et al., 2020). O ácido indol-3-acético, também conhecido como AIA, é uma auxina predominante e indispensável ao crescimento e metabolismo das plantas. AIA é considerada uma molécula fundamental para o crescimento vegetal (Duca e Glick, 2020), atuando direta e indiretamente em diversos processos da planta e se destacando como molécula de sinalização (Weijers et al., 2018). Muitos microrganismos benéficos da rizosfera são produtores de AIA como a naturalmente produzida por plantas (Keswani et al., 2020). Assim, a primeira molécula a ser analisada nos isolados de *Streptomyces* foi AIA.

A produção de AIA foi evidenciada em todos os isolados analisados com valores variando de 10,21 ng/ml, (CAB – S 69) a 42,08 ng/ml (CAB – S 71), sendo este último o destaque na produção de AIA entre os isolados (Figura 5). A produção de AIA é de extrema importância, pois este hormônio estimula o alongamento celular modificando condições celulares, como aumento do conteúdo osmótico da célula e da permeabilidade de água na célula e diminuição da pressão na parede celular conforme (Keswani et al., 2020). Trabalhos como de Liu et al. (2019), Thampi e Bhai (2017), Zhu et al. (2021), Syiemiong e Jha (2019), entre outros, que analisaram *Streptomyces* spp. como promotores de crescimento vegetal obtiveram resultados positivos para produção desse fitohormônio, corroboram com a importância desse mecanismo de promoção de crescimento de planta, sendo característica conservada para maioria das bactérias desse gênero. AIA é importante para as plantas também para a indução da produção de raízes mais longas com mais pêlos radiculares, promovendo maior absorção de nutrientes, sendo a raiz o órgão da planta mais sensível às mudanças promovidas por AIA (Keswani et al. 2020). Esse fitohormônio também tem sido muito estudado devido ao seu caráter benéfico na interação microrganismos – planta, pois favorece uma maior exsudação das raízes modulando a diversidade e atividade das bactérias rizosféricas (Duca e Glick 2020).

Figura 5 – Produção de ácido indolacético (AIA) por isolados de *Streptomyces* spp.

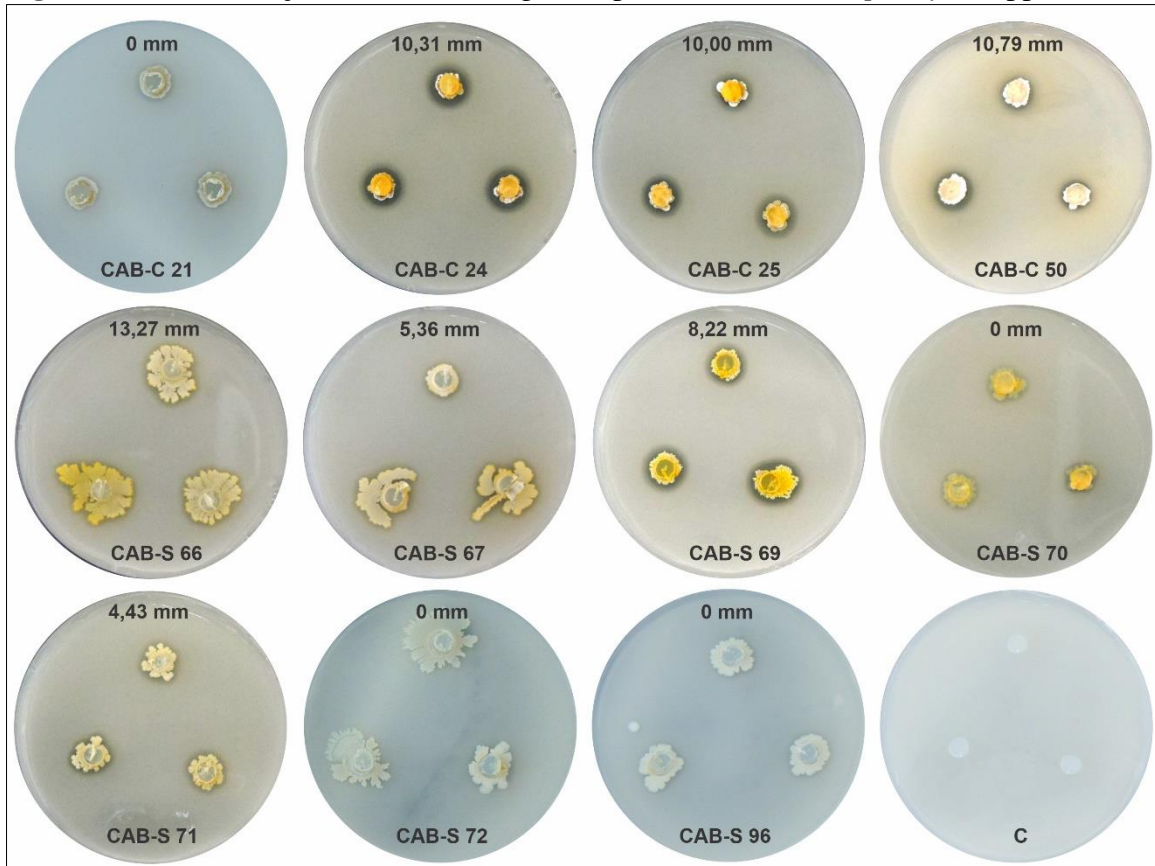


A produção de AIA foi estimada a partir da leitura da absorvância de cada amostra por espectrofotometria no comprimento de onda de 530 nm. A amostra era composta pelo sobrenadante proveniente de cada isolado e o reagente Salkowsky, na proporção 1:1. A produção foi observada com a mudança de coloração da amostra para tons de rosa. **Fonte:** Autora.

A solubilização de fosfato e zinco é outro parâmetro importante na avaliação de microrganismos como promotores de crescimento vegetal, visto que enriquece o solo e o fósforo é um dos elementos mais abundantes nos organismos vivos, sendo um dos 16 elementos essenciais para as plantas (Aallam et al., 2021). No setor agrícola este elemento tem papel chave, pois apresenta menor mobilidade e disponibilidade para as plantas na maior parte das condições de solo (Barreiro e Martínez-Castro, 2019). Biologicamente, o fósforo, como fosfato inorgânico, é um macronutriente de extrema importância, principalmente para as biomoléculas (Sharpley et al., 2018). O efeito do fosfato inorgânico, no metabolismo de *Streptomyces* vem sendo descrito desde os anos de 1970, sobre a produção de diversos antibióticos por esse gênero (Barreiro e Martínez-Castro, 2019).

Ao analisar os isolados de *Streptomyces*, com relação a solubilização de fosfato, 7 dos 11 isolados foram capazes de solubilizar fosfato (63,3%). O isolado CAB – S 71 apresentou o menor halo de solubilização (4,33 mm) e o isolado CAB – S 66 com o maior (13,33 mm) (Figura 6), configurando microrganismos potenciais capazes de converter fosfato insolúvel em uma forma facilmente assimilável, inclusive pelas plantas. Esta característica evidencia o potencial dos isolados de *Streptomyces* em amenizar o problema de fósforo imobilizado no solo, conseqüentemente uma maior disponibilidade influencia no crescimento e rendimento de vegetais, e, também, reduz o uso de insumos químicos estimulando uma agricultura mais sustentável (Aallam et al., 2021). Assim, o uso dessas bactérias como biofertilizantes é uma alternativa para reparar a deficiência de fósforo, visto que se trata de um nutriente indispensável em processos fisiológicos e bioquímicos, conforme Chouyia et al. (2020).

Figura 6 – Solubilização de fosfato inorgânico por isolados de *Streptomyces* spp.



A solubilização de fosfato foi avaliada em placas de Petri contendo meio Pikovskaya e discos equidistantes dos isolados distribuídos sobre o meio, sendo observada através da formação de um halo ao redor do disco. Valores médios de diâmetros de halos (n) inseridos na figura para cada isolado. **Fonte:** Autora.

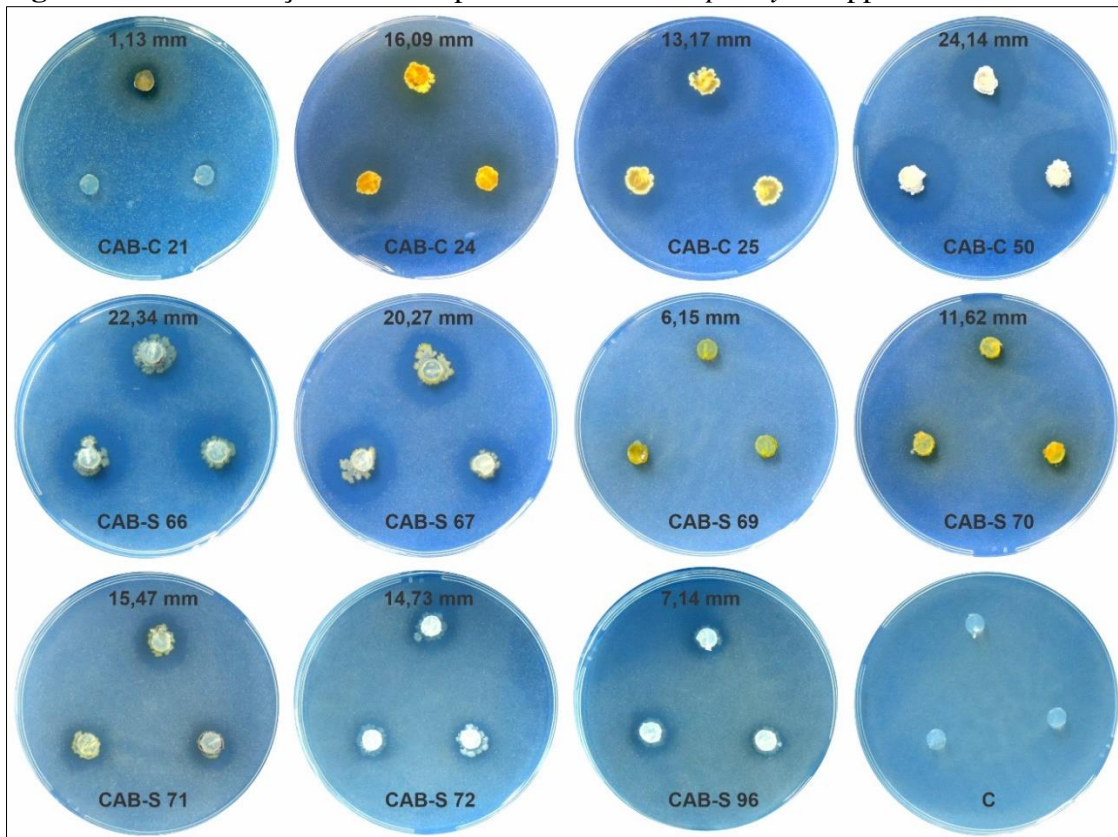
Além do fósforo, o zinco (Zn) também é considerado elemento essencial e participa como cofator da atividade de várias enzimas envolvidas na promoção de crescimento vegetal, sua deficiência é inerente a diferentes solos. A fonte potencial desse micronutriente são compostos inorgânicos adsorvidos ao solo, o que dificulta o acesso e biodisponibilidade para as plantas. Entretanto, microrganismos solubilizadores de zinco são alternativas para suplementação nutricional do solo (Mitra et al., 2020). O processo de solubilização do Zn, por rizobactérias, ocorre por meio de diversos mecanismos, como excreção de ácidos orgânicos, extrusão de prótons ou produção de agentes quelantes (Eshaghi et al., 2019). Considerando a análise de solubilização de Zn, todos os isolados apresentaram resultado positivo, sendo todos são potenciais solubilizadores de Zn (Figura 7).

A deficiência de Zn nos solos é comum, assim microrganismos com capacidade de solubilização deste nutriente representa alternativa à aplicação química de Zn. A

disponibilidade de Zn tende a diminuir com o tempo, mesmo com uma aplicação rotineira, e, também, podem apresentar a introdução de outros elementos tóxicos no solo, como o Cádmio (Shafigh et al., 2019).

De uma forma geral, os estudos apontam que microrganismos solubilizadores de Zn conseguem suprir as necessidades exigidas pelas plantas devido ao aumento na absorção desse micronutriente; dessa forma, esses solubilizantes são muito importantes na nutrição dos vegetais (Prasad et al. 2019; Shafigh et al., 2019).

Figura 7 – Solubilização de Zinco por isolados de *Streptomyces* spp.



A solubilização de Zinco foi avaliada em placas de Petri contendo meio de sais minerais e discos equidistantes dos isolados distribuídos sobre o meio, sendo observada através da formação de um halo ao redor do disco. Valores médios de diâmetros de halos (n) inseridos na figura para cada isolado. **Fonte:** Autora.

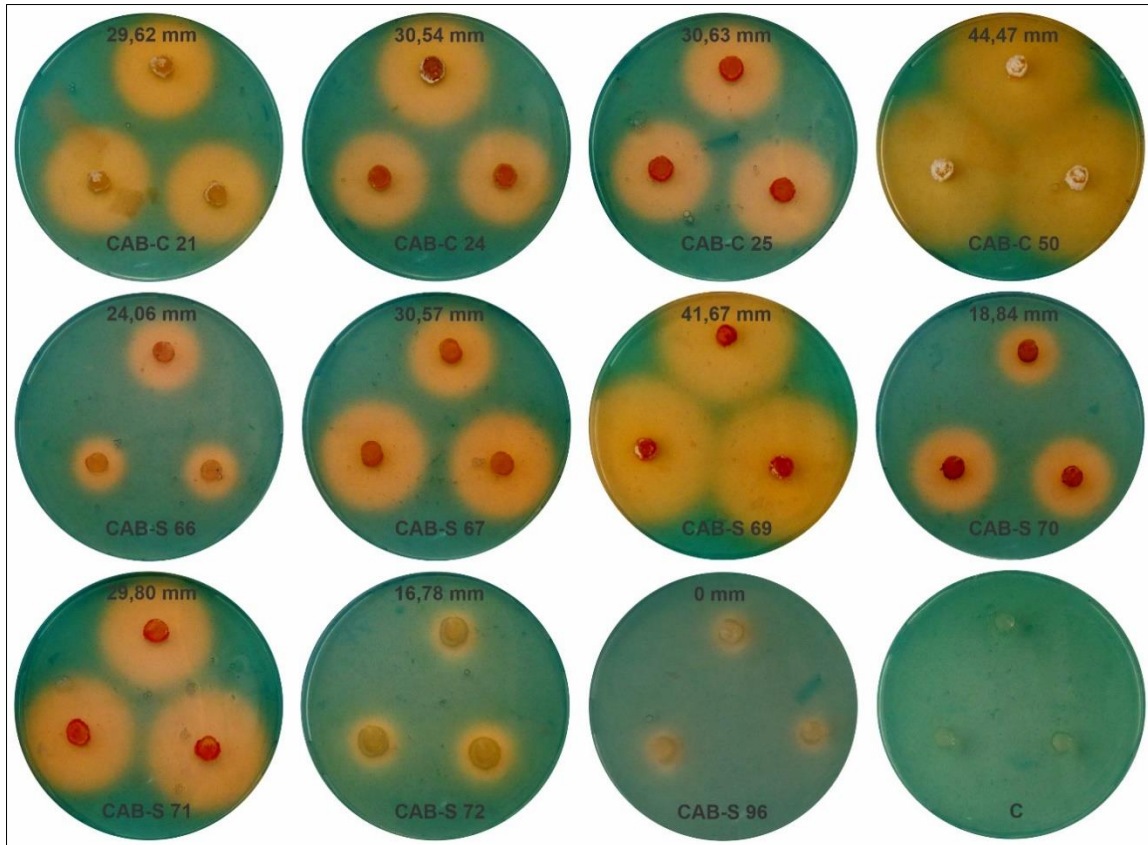
Outro elemento importante no solo e no crescimento vegetal é o Ferro (Fe), sendo abundante e essencial, contudo, apresenta baixa biodisponibilidade (Albelda-Berenguer et al., 2019). Fe participa de diversos processos metabólicos como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo; na transferência de elétrons no processo de respiração celular e sínteses de DNA e RNA. Entretanto, devido a sua baixa disponibilidade no ambiente, microrganismos desenvolveram estratégias específicas de absorção, como a produção de sideróforos (Maglangit

et al., 2019). Sideróforo é composto protéico quelante de Fe (Ghosh et al., 2020), que apresenta afinidade elevada e específica com Fe, permitindo que esse elemento seja retirado do ambiente pelos microrganismos para garantir sua sobrevivência sob condição de deficiência de Fe (Al Shaer et al., 2020). Portanto, os sideróforos auxiliam no transporte do ferro férrico insolúvel, do ambiente para a célula (Rezanka et al., 2019). Microrganismos promotores de crescimento de plantas podem apresentar produção de sideróforos, sendo assim fator fundamental para PGP e supressão de doenças (Ghosh et al., 2020).

No teste para avaliar a produção de sideróforos, somente o isolado CAB – S 96 não foi capaz de quelar Fe, portanto, não sendo capaz de produzir sideróforos nas condições investigadas. O isolado CAB – S 72 apresentou o menor valor mensurado, 16,7 mm e o isolado CAB – C 50 o maior valor, 44,4 mm (Figura 8). Isso reforça o potencial dos isolados de *Streptomyces* analisados como PGP, atuando como biofertilizantes corroborando com Rezanka et al. (2019). Esses afirmam que o uso de sideróforos como fertilizantes naturais contribui no aumento do rendimento de colheitas e com potencial efeito no controle biológico de pragas, representando uma ferramenta de competição por Fe por exemplo contra *Fusarium oxysporum*. Muitos trabalhos corroboram com os nossos resultados, comprovando que o gênero *Streptomyces* tem grande potencial na promoção do crescimento de plantas, inclusive na produção de sideróforos.

Sideróforos são estudados há muitos anos, com mais de 500 estruturas descritas e com o interesse prolongado de novos estudos, como reiteram Albelda-Berenguer et al. (2019). O elemento Fe é requerido por microrganismos para sua patogenicidade e as rizobactérias benéficas produzem sideróforos para biodisponibilizar o Fe férrico presente no solo. Portanto, a inibição do crescimento do patógeno ocorre, também, pela competição pelo Fe, sendo que, ao mesmo tempo, essas bactérias disponibilizam ferro para as plantas, de acordo com Rehan et al. (2021).

Figura 8 – Produção de sideróforos por isolados de *Streptomyces* spp.



A produção de sideróforos foi avaliada em placas de Petri contendo meio Gaus N 1, acrescido de solução CAS (Cromo Azurol), e discos equidistantes dos isolados distribuídos sobre o meio, sendo observada com a formação de halo ao redor do disco. Valores médios de diâmetros de halos (n) inseridos na figura para cada isolado. **Fonte:** Autora.

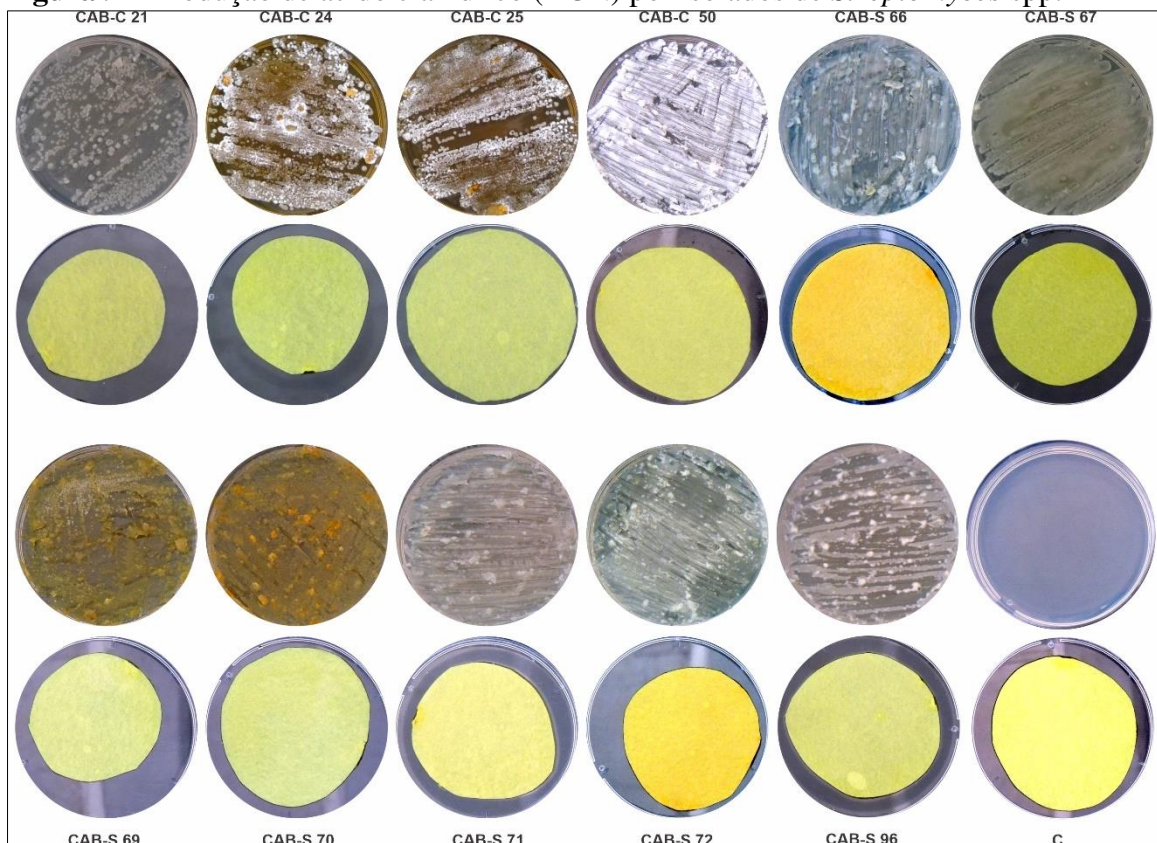
Os testes de produção de ácido cianídrico (HCN) e fixação biológica de nitrogênio (FBN) representam análises importantes para indicar a possibilidade de produção desses mecanismos, neste caso pelos isolados de *Streptomyces* investigados. Os resultados descritos a seguir estão dispostos nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

O Ácido cianídrico, cianeto de hidrogênio ou HCN é um metabólito volátil, formado a partir da glicina por meio da ação da enzima HCN sintetase, e muitos gêneros de bactérias apresentam a capacidade de produzi-lo (Kumar et al., 2015). A produção de HCN como metabólito secundário inibe o crescimento da maioria de fungos fitopatogênicos através da síntese de enzimas que degradam parede celular; por outro lado também aumenta a disponibilidade de nutrientes, pois HCN interfere na mobilidade de elementos minerais, e, indiretamente, promove o crescimento de plantas (Yavarian et al., 2021).

No que se refere à produção de HCN, nas condições avaliadas, somente dois isolados foram capazes de produzi-lo, sendo eles o CAB – S 66 e CAB – S 71 (Figura 9). Kumar et al. (2015) apontam a produção de HCN como mecanismo indireto de promoção de crescimento de planta, com redução ou prevenção dos efeitos causados pelos patógenos na planta, devido à

produção de substâncias inibidoras ou pela indução da resistência da planta. Rizobactérias produtoras de HCN não causam impacto negativo às plantas hospedeiras, segundo Rehman et al. (2020), e podem atuar como agente para o biocontrole de ervas daninhas. A produção de HCN por *Streptomyces* tem sido relatada em muitos estudos, como de Singh et al. (2019), Chaiharn et al. (2020), Anusha et al. (2019), confirmando o efeito benéfico desse mecanismo na promoção de crescimento de plantas e a capacidade deste gênero em produzir este composto.

Figura 9 – Produção de ácido cianídrico (HCN) por isolados de *Streptomyces* spp.

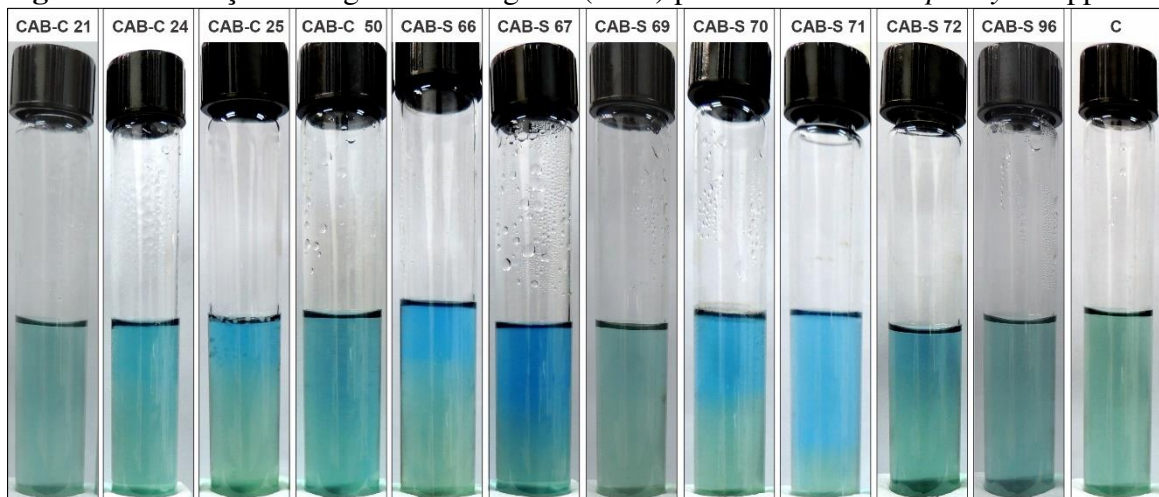


A produção de ácido cianídrico foi avaliada a partir do crescimento dos isolados em placas de Petri contendo meio Bennett suplementado com glicina. Houve a adição de um disco de papel filtro Whatman N° 1, embebido em solução de ácido pícrico, na tampa da placa. A produção foi observada através da mudança de coloração do disco de papel filtro. **Fonte:** Autora.

O nitrogênio é o principal elemento que limita o crescimento das plantas, sendo um constituinte fundamental de macromoléculas fundamentais à vida como DNA, RNA e proteínas e encontra-se, principalmente, na natureza na forma gasosa (N_2), logo inacessível diretamente para plantas e animais (Prasad et al., 2019). A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é uma fonte essencial de nitrogênio para as plantas, auxiliando como atividade agrícola favorável ao meio ambiente. O uso de PGPR, como uma forma de suprir a deficiência de nitrogênio em plantas, é uma alternativa para a produção agrícola (Rehman et al., 2020). O gênero

Streptomyces também é estudado com relação à FBN (Gopalakrishnan et al., 2020). Nas condições investigadas, apenas os isolados CAB – C 24, CAB – C 25, CAB – C 50, CAB – S 66, CAB – S 67, CAB – S 70, CAB – S 71 e CAB – S 72, apresentaram capacidade de FBN (Figura 10). A importância do Nitrogênio está relacionada a manutenção e melhora do crescimento e produtividade da cultura, e o processo de FBN auxilia na redução da necessidade de fertilizantes químicos a base de N. O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, como algumas espécies de *Streptomyces*, aumenta o crescimento da planta com a disponibilidade de N através do processo de FBN, e de outros nutrientes (Htwe et al., 2019).

Figura 10 – Fixação biológica de nitrogênio (FBN) por isolados de *Streptomyces* spp.



A fixação biológica de nitrogênio dos isolados foi avaliada em tubos de ensaio contendo meio Nfb semissólido, com a inoculação em forma de picada e a fixação biológica foi observada através da mudança de coloração do meio de cultura. **Fonte:** Autora.

A caracterização fenotípica dos isolados de *Streptomyces* investigados neste trabalho revelam que a maior parte deles apresentam habilidades em promoção de crescimento vegetal. Assim um único isolado, CAB – S 66, foi capaz de produzir todos os fatores investigados, seis isolados produziram 83% (CAB – C 24, CAB – C 25, CAB – C 50, CAB – S 67, CAB – S 71 e CAB – S 72), dois isolados produziram 67% (CAB – 69 e CAB – S 70), e os demais em aproximadamente a metade dos fatores investigados (CAB – C 21 e CAB – S 96).

4.2 *Streptomyces* atuantes em controle biológico - Antagonismo

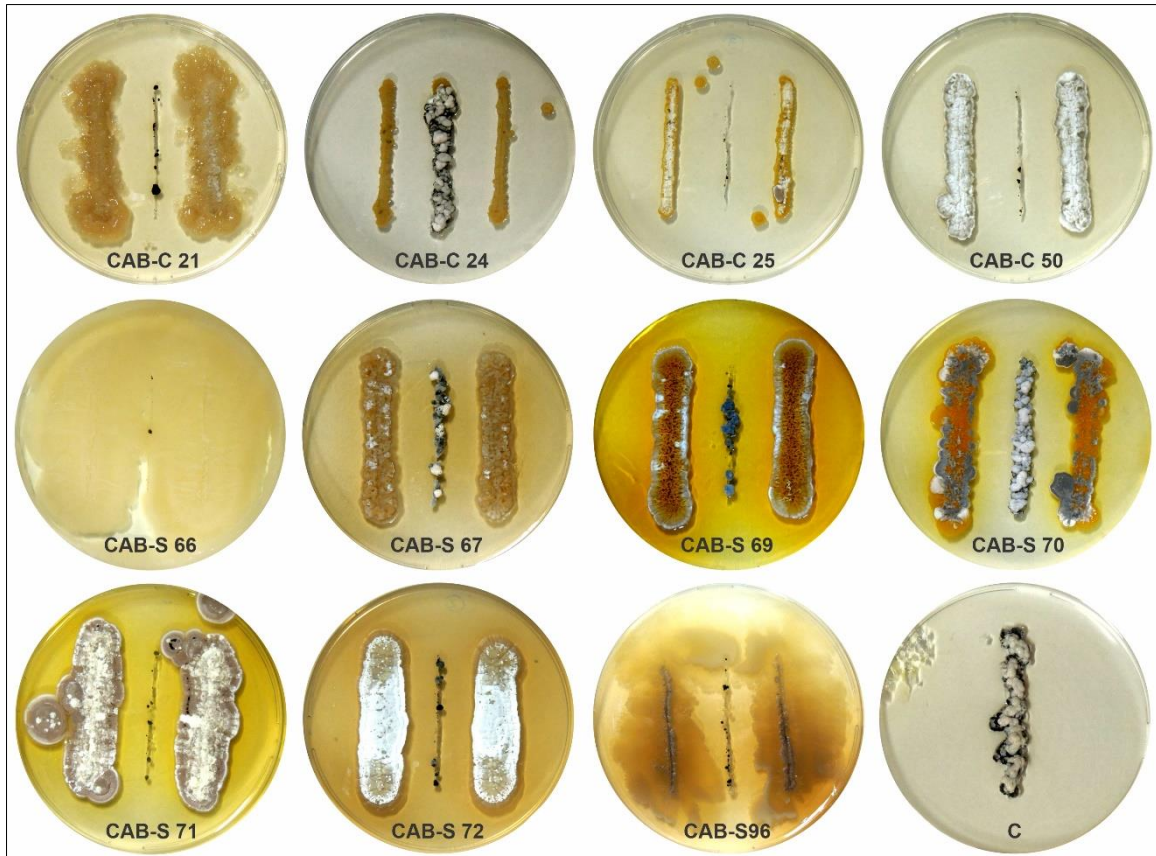
A doença Sigatoka – Amarela tem como agente etiológico o fungo *Pseudocercospora musae*, considerado grave problema na bananicultura nacional. Apresenta maior relevância em regiões de chuvas frequentes, acarretando perdas em torno de 50% da produção, sendo

responsável pela redução da área foliar da planta que, conseqüentemente, diminui a quantidade e o tamanho dos frutos (Quirino et al., 2014).

Os isolados de *Streptomyces* foram analisados em teste de antagonismo com o fungo causador da Sigatoka – Amarela. Os isolados CAB – C 21, CAB – C 25, CAB – C 50, CAB – S 66, CAB – S 71, CAB – S 72 e CAB – S 96 apresentaram capacidade em inibir o fungo *P. musae* (Figura 11).

Os desafios na bananicultura mundial são grandes, sendo os maiores a dificuldade em controlar doenças como Mal – do – Panamá, Sigatoka – Amarela e Sigatoka – Negra (González et al., 2018). Quirino et al. (2014), relatam que o gênero *Pseudocercospora* tem sido estudado em diversas culturas, porém os agentes causais da Sigatoka – Amarela e da Sigatoka – Negra apresentam destaque devido ao impacto econômico provocado. Alguns gêneros bacterianos são reconhecidos como promissores no biocontrole em campo como *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. e *Bacillus* sp., e alguns gêneros fúngicos, como *Gliocadium* sp., *Ampelomyces* sp. e *Trichoderma* sp. Assim, linhagens de *Streptomyces* apresentam características importantes como agentes de biocontrole, como a produção de quitinases extracelulares que atuam contra patógenos fúngicos. As quitinases agem decompondo a quitina e assim há aquisição de nutrientes e energia, conforme Castillo et al. (2016), que avaliaram e concluíram o potencial de biocontrole de uma linhagem de *Streptomyces galilaeus* contra o patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, causador da Sigatoka – Negra. Segundo Rehan et al. (2021), o gênero *Streptomyces* é um recurso microbiano fundamental no controle de fungos patogênicos em bananeiras, reafirmando seu potencial de agente biológico.

Figura 11 – Avaliação da capacidade de antagonismo microbiano por isolados de *Streptomyces* contra o fungo *Pseudocercospora musae*.



A capacidade de antagonismo foi avaliada por meio de placas de Petri contendo meio BDA. Houve a inoculação, no formato de traço, dos isolados e do patógeno de forma sequencial. A inibição foi observada através da inibição do crescimento do patógeno. **Fonte:** Autora.

Na literatura ainda são escassos trabalhos avaliando o potencial de *Streptomyces* contra a *Pseudocercospora musae*, o que representa mais uma habilidade importante nos isolados investigados neste trabalho.

4.3 Promoção de crescimento de bananeira por *Streptomyces* spp. *in vitro*

O sistema de cultura de tecidos permite o desenvolvimento de plantas em condições assépticas controladas, fornecendo nutrientes, água e energia essenciais para o crescimento (Phillips e Garda, 2019). Consiste na produção de mudas partindo de explantes que contêm tecidos meristemáticos de matrizes selecionadas (Vieira, 2012).

As técnicas de cultura *in vitro* são fundamentais para produção de plantas livres de doenças, rápida multiplicação e produção de metabólitos; e na literatura há uma variedade de métodos e aplicações das técnicas disponíveis (Espinosa-Leal et al., 2018). A produção de mudas de bananeiras é amplamente realizada pela micropropagação. Nessa técnica a produção de mudas ocorre ao longo dos meses em condições controladas utilizando meios de cultura, tendo como vantagens uma produção em larga escala, com uniformidade, rápida

disponibilidade, idênticas a matriz e sem a presença de patógenos (Pereira et al., 2020). Mudanças oriundas da micropropagação, com genótipos favoráveis e livre de patógenos, melhoram a qualidade dos materiais de plantio. No entanto, mudas micropropagadas são mais suscetíveis à doença, pois estão livres de microrganismos benéficos, como endofíticos (Kavino e Manoranjitham, 2018).

Na micropropagação há uma remoção da microbiota, tanto patogênica quanto natural, associada às mudas, o que tem levado a utilização de microrganismos ou bioinoculantes em mudas micropropagadas de bananeira, objetivando fornecer nutrientes, promover o crescimento e controlar patógenos (De Souza et al., 2017). A incorporação de microrganismos benéficos não caracteriza o surgimento de problemas à cultura, podendo estabelecer um ganho se mantidos na planta devido ao seu potencial de biocontrole e de PGP (Vieira, 2012). Introduzir artificialmente microrganismos benéficos, como endofíticos ou rizobactérias, na fase de enraizamento pode oferecer proteção às mudas no estágio inicial de crescimento, prolongando a vida útil do material de plantio (Kavino e Manoranjitham, 2018).

A microbiolização é o processo de introdução de bactérias, na fase de enraizamento e/ou aclimatização, com objetivo de promover o crescimento e a sanidade das plantas, ao mesmo tempo que as plantas oferecem nutrientes e habitat, confirmando uma interação benéfica entre microrganismo e planta. A adição de bactérias no processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira, na fase de enraizamento e/ou de aclimatização, visa principalmente a produção de ácido indolacético (AIA) bacteriano para promoção de crescimento das mudas com interferência na indução e na diferenciação do sistema radicular vegetal, no aumento de massa das raízes, no estímulo do alongamento radicular e de raízes laterais, e com isso a redução no tempo de obtenção das mudas (Silva et al., 2016). Para del Carmen Jaizme-Vega et al. (2004), a inoculação de microrganismos proporciona benefícios durante a fase inicial de aclimatação, contribuindo com a amenização de estresse e estabelecimento da microbiota do solo na rizosfera.

No presente experimento foram utilizados três isolados de *Streptomyces*, CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66, individualmente e em consórcio, para avaliação da promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira variedade Prata – Anã, através da técnica de cultura *in vitro* empregando a microbiolização das mudas (Figura 12).

Figura 12 – Experimento *in vitro* de microbiolização de mudas de bananeira tipo Prata-Anã com isolados de *Streptomyces*.



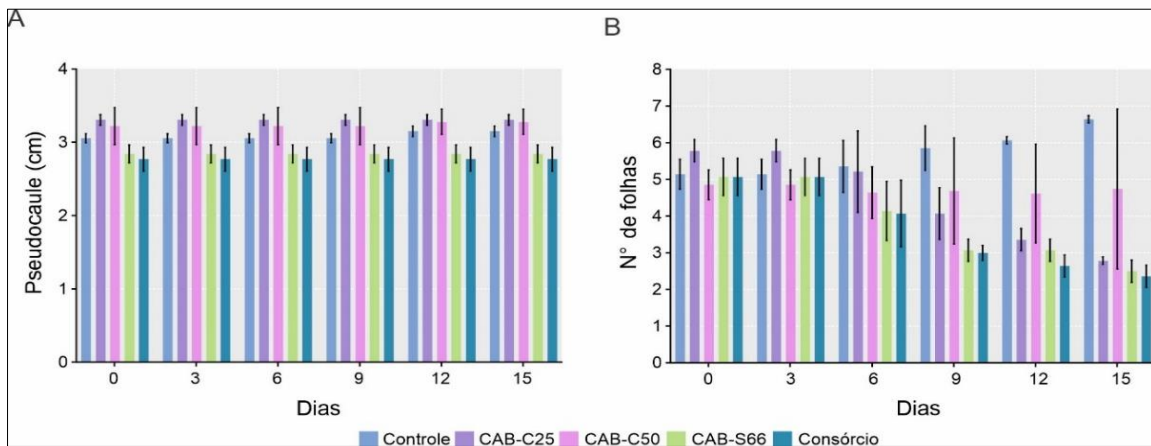
A: controle, **B:** tratamento 1 (CAB – C 25), **C:** tratamento 2 (CAB – C 50), **D:** tratamento 3 (CAB – S 66), **E:** consórcio, ambos com 2 dias de início do experimento. **F:** controle, **G:** tratamento 1 (CAB – C 25), **H:** tratamento 2 (CAB – C 50), **I:** tratamento 3 (CAB – S 66), **J:** consórcio, ambos no final do experimento (15 dias). **Fonte:** Autora.

As variáveis avaliadas foram altura do pseudocaulo, número de folhas e de raízes, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13. Para a variável, altura de pseudocaulo, o tratamento Controle apresentou pouco aumento na altura a partir do décimo segundo dia, como já era esperado. Os tratamentos CAB – C 25, CAB – S 66 e Consórcio, não apresentaram acréscimo na altura durante o período de avaliação. Já o tratamento CAB – C 50, apresentou ligeiro incremento de altura do décimo segundo dia em diante, semelhante ao comportamento do controle. Com relação à variável, número de folhas, o tratamento Controle apresentou aumento a partir do sexto dia, que inicialmente contava com uma média de aproximadamente 5 folhas passando para uma média próxima a 7 folhas, ao final das avaliações. Os tratamentos CAB – C 25, CAB – S 66 e Consórcio, apresentaram redução no número de folhas com início no sexto dia e que se manteve contínuo até o final e, em ambos, a média do número de folhas foi reduzida a cerca da metade. Logo, o tratamento CAB – C 50 apresentou número constante de folhas por todo período de avaliação, com média em torno de 5 folhas. Quanto à variável número de raízes, no tratamento Controle foi observado o maior crescimento de raízes a partir da terceira avaliação (sexto dia). Os tratamentos CAB – C 25, CAB – S 66 e Consórcio não apresentaram formação de raízes ao longo das avaliações. E no tratamento CAB – C 50, houve a formação de raízes em algumas experimentais, em torno do nono dia de experimento, no entanto, quando calculada a média o valor era zerado devido a maioria das experimentais não

apresentarem crescimento. Dessa forma, não foi feita a construção de um gráfico para essa variável.

As variáveis analisadas, nos tratamentos com os isolados CAB – C 25 e CAB – S 66, não apresentaram incrementos, ao longo dos dias nas duas réplicas biológicas realizadas. Nos tratamentos CAB – C 25, CAB – S 66 e Consórcio, houve a senescência da maior parte das mudas, onde o escurecimento, de pseudocaule e das folhas, iniciou-se entre seis e nove dias de experimento, progredindo ao longo das avaliações. Contudo, o isolado CAB – C 50 apresentou resultado positivo, individualmente, para as variáveis observadas e, também, por não ocorrer a morte das mudas ao longo do experimento. Devido ao comportamento visto nos experimentos, alguns fatores foram considerados na tentativa de explicar os resultados obtidos, como a concentração de auxinas microbianas, a concentração do inóculo inicial, a sensibilidade das mudas durante a fase de enraizamento, a competição por nutrientes e por oxigênio na interação planta-bactéria e a produção de HCN.

Figura 13 – Parâmetros do cultivo e microbiolização *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira.



A. Altura do pseudocaule. **B.** Número de folhas. **Fonte:** Autora.

As auxinas são grupo de fitohormônios de grande importância que induzem respostas de crescimento em plantas, e o ácido indolacético (AIA) é o hormônio mais comum dentro da classe das auxinas, produzido por plantas e microrganismos, sendo considerado um regulador de crescimento vegetal, assim descrito por Keswani et al. (2020). Sabe-se, através do teste de produção de AIA realizado, que os três isolados são produtores de AIA, porém aparentemente apenas o isolado CAB – C 50 pode ter produzido AIA em quantidade adequada para as mudas, refletindo nos resultados satisfatórios obtidos nas variáveis analisadas e na sobrevivência das mudas ao longo dos dias. Já, os tratamentos com os outros isolados e a combinação dos três, pode ter influenciado numa alta produção desse regulador de crescimento, excedendo o nível

suportado pelas mudas, e conseqüentemente a senescência delas. Esse fator é apontado por Paz (2009), onde uma concentração excessiva ou reduzida de um fitohormônio produzido por bactérias prejudica a diferenciação radicular causando a morte da plântula. Essa afirmação é complementada por Patten e Glick (1996), que relatam que a concentração de AIA microbiano é um fator crítico na fase de enraizamento, já que pode causar a inibição do crescimento da planta influenciando na promoção de crescimento. Para Enebak et.al. (1998), a mortalidade das mudas é algo comum ao se trabalhar com bactérias promotoras de crescimento. A introdução de bactérias, de acordo com Patten e Glick (2002), em mudas ocorre a transformação de muitas células em patogênicas ou saprofíticas, causando um bloqueio no desenvolvimento vegetal.

Segundo Keswani et al. (2020), diversos resultados são esperados em plantas colonizadas por bactérias produtoras de AIA, desde a fitoestimulação até a patogênese podendo haver um processo comensal ou patogênico, sendo assim dependente da quantidade de hormônio produzido pelo microrganismo, que em grandes quantidades provoca a inibição do desenvolvimento radicular no lugar de estímulo, e da sensibilidade do tecido do hospedeiro (planta) as mudanças nas concentrações de AIA. Observamos que ao longo dos anos tem sido argumentado, por diferentes autores, que a alta concentração de auxinas é um fator determinante na interação planta-microrganismo e no desenvolvimento vegetal.

Bactérias e plantas apresentam interações que são classificadas em comensalismo, mutualismo e antagonismo, e a região de maior contato é a zona radicular, que contém grande diversidade de bactérias que através do contato com raízes realizam penetrações no hospedeiro, assim argumentado por Orlikowska et al. (2017). Afirmam também, que microrganismos presentes em meio de cultura, mesmo não sendo patogênicos, podem causar efeitos prejudiciais nas culturas, afetando a variação dos resultados experimentais. E que o uso de bactérias na fase *in vitro* exige que alguns parâmetros precisam ser considerados, como densidade de inoculação, logo pode ser mais adequado a utilização de bactérias na fase de aclimação. No presente trabalho, a concentração de inóculo dos isolados estava na faixa de 10^8 UFC/ml, conforme o trabalho de Melo (2019) em casa de vegetação, e trabalhos, como de del Carmen Jaizme-Vega et al. (2004), também utilizaram inóculos com esta concentração. Entretanto, essa concentração é adequada para experimentos *in vivo*, para ensaios *in vitro* é uma concentração elevada. A adequação de uma concentração inicial de inóculo pode ser testada para determinar a concentração ideal para inoculação *in vitro*.

A competição, tanto por nutrientes quanto por oxigênio, é um fator crucial. No experimento houve uma limitação de trocas gasosas dentro do frasco que condicionou a muda inoculada com a bactéria, ocorrendo uma competição por oxigênio entre a muda e o

microrganismo. *Streptomyces* são bactérias aeróbias, conforme Gopalakrishnan et al. (2020), seu desenvolvimento e sobrevivência requer a presença obrigatória de oxigênio, que tem uma grande influência na produção de antibióticos, segundo Hasani et al. (2014). Para Andreote et al. (2010), algumas interações podem ocorrer para aquisição de nutrientes pelas plantas, indução de resistência sistêmica e supressão de organismos causadores de doenças.

Outro fator a ser considerado no experimento é a produção de HCN. Esse composto tóxico para muda pode ter sido produzido pelo isolado a partir do aminoácido glicina, presente no meio de cultura, e precursor desse composto. O HCN, ácido cianídrico ou cianeto de hidrogênio, um composto volátil, também conhecido como uma toxina, desempenha importante papel nas interações bióticas. Do ponto de vista ecológico é uma molécula inibidora de microrganismos concorrentes e, também, é um importante regulador do crescimento bacteriano, aponta Anand et al. (2021). Anusha et al. (2019), citam que a produção de HCN por microrganismos é abrangentemente relatada pelo papel na supressão de doenças, juntamente com outros mecanismos. Para Avalos et al. (2019), compostos voláteis são moléculas de fácil difusão através do ar, água ou solo, fundamentais nas interações inter e intra – espécies. Afirmam, também, que o gênero *Streptomyces* são produtores prolíficos de compostos voláteis. Isso confirma a produção de HCN por parte dos nossos isolados de *Streptomyces* devido a presença da glicina.

A microbiolização *in vitro*, de bactérias promotoras de crescimento de plantas, mesmo apresentando pouca evidência deve ser feita com cautela, sendo conveniente realizar mais estudos para compreensão da ecofisiologia dos microrganismos. E apesar da interação divergente visualizada no experimento, entre as mudas e os isolados, a inoculação de microrganismos benéficos é uma das tecnologias alternativas para um melhor desenvolvimento da planta, garantindo a sobrevivência do vegetal e podendo aumentar sua produtividade, como apontado por Oliveira et al. (2010). No trabalho de del Carmen Jaizme-Veja et al. (2004) com a inoculação de *Bacillus* spp. em diferentes cultivares de bananeira, observaram que a inoculação bacteriana, em fase de aclimação, induz significativamente o desenvolvimento das mudas para ambas cultivares, aumentando o conteúdo mineral foliar em mudas da cultivar Grande Naine. E com os resultados obtidos concluíram que, há uma viabilidade no uso de PGPR durante a fase de aclimação das mudas, e que, os microrganismos, além de contribuírem com o desenvolvimento e saúde da planta, são cruciais para manutenção do ambiente rizosférico das mudas. Para Kavino e Manoranjitham (2018), a bacterização *in vitro* de mudas de bananeira com consórcios de espécies bacterianas proporcionou um crescimento mais rápido das mudas. Assim, consideram, a bacterização de mudas micropropagadas de bananeira, uma estratégia

viável e destacam a associação de espécies de bactérias um fator determinante na indução da resistência sistêmica das mudas.

Observando os resultados do experimento, o tratamento controle, sem a presença de bactéria, correspondeu ao esperado apresentando maior formação de raízes. Já os tratamentos com inoculação dos isolados de *Streptomyces* não corresponderam às expectativas, possivelmente a sensibilidade dessa etapa juntamente com a presença de microrganismos, prejudicaram o desenvolvimento de um novo sistema radicular para manutenção das mudas devido a competição entre planta e bactéria por nutrientes, acarretando a senescência de muitas plântulas. A fase de enraizamento *in vitro* apresenta uma desvantagem, pois as raízes formadas podem não ser eficientes na absorção de água e de nutrientes. Essas raízes podem conter poucos pêlos radiculares e conexões vasculares, e o desenvolvimento iniciar apenas quando retiradas dos frascos. E o não desenvolvimento suficiente das raízes acarreta a não sustentação do crescimento da planta, causando redução no desenvolvimento ou até morte da muda, relatam Paiva e Paiva (2001). E Suman (2017) também afirma que na cultura de tecidos a capacidade limitada de enraizamento das mudas é um desafio a ser vencido. A soma dos fatores supracitados pode ter potencializado a senescência da maior parte das mudas.

Os resultados obtidos e os comportamentos observados revelam a necessidade de mais estudos visando uma melhor compreensão da interação entre planta – bactéria, ressaltando que muitos estudos comprovam a eficiência da microbiolização de bactérias na cultura de tecidos. De Souza et al. (2017) consideram que o uso de inoculantes microbianos, que promovem o crescimento e incrementam a produtividade das plantas, tem sido considerado como uma possibilidade sustentável para a redução na utilização de adubos químicos. Outro ponto destacado, no uso de bioinoculantes, é restabelecer uma microbiota, pois a ausência de uma microbiota diversificada provoca a redução de crescimento e vigor, e a suscetibilidade a pragas e doenças. Para da Silva et al. (2018), as PGPR atuam promovendo o crescimento da planta, inibindo o crescimento de patógenos e estimulando as defesas da planta hospedeira, sendo assim uma importante ferramenta na produção de mudas micropropagadas, pois possibilita um incremento de biomassa, altura, e área foliar.

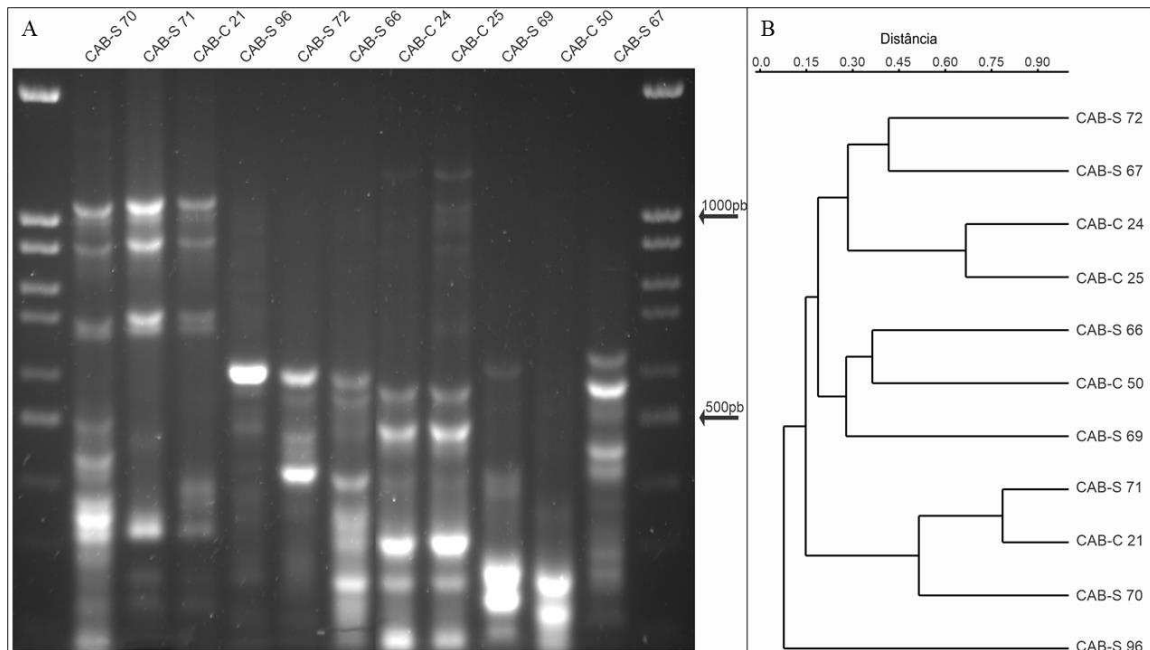
4.4 Caracterização genética dos isolados de *Streptomyces* spp.

Técnicas de impressão digital de DNA (*DNA fingerprinting*) são usadas para avaliação de polimorfismos genéticos em microrganismos com o objetivo de identificação de marcadores associados a determinadas características e na diferenciação inicial dos isolados, com a

possibilidade de separação de grupos taxonômicos (Borba et al., 2020). A rep-PCR, reação em cadeia da polimerase de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos, é considerada uma das técnicas mais confiáveis e largamente empregada para estudos de diagnóstico molecular, ecologia microbiana, microbiologia ambiental e médica; fornecendo de forma fácil, rápida e com menor custo a detecção da diversidade de genomas microbianos estudados (Naghoni et al., 2017). De acordo com Law et al. (2018) esta técnica tem ação discriminatória equivalente ou superior quando comparada a outros métodos, como RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) e AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado). Uma vez que a rep-PCR é uma técnica simples e rápida, foi então utilizada para investigar o polimorfismo genético dos 11 isolados de *Streptomyces* estudados a fim de confirmar que são isolados distintos.

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que se tratam de isolados diferentes genotipicamente e identificar aspectos taxonômicos importantes. Um grupo foi dividido em três subgrupos, e o isolado CAB – S 96 distribuído independente dos demais (Figura 14). No primeiro subgrupo os isolados, CAB – S 72 e CAB – S 67 apresentam proximidade com relação a sua origem, o solo, e a alguns mecanismos de promoção de crescimento. Ainda no primeiro subgrupo, os isolados CAB – C 24 e CAB – C 25 apresentam proximidade tanto a origem, o composto, quanto a todos os testes de PGP, e, também, possuem similaridade das bandas no cladograma. O segundo subgrupo conta com uma afinidade do isolado CAB – S 66, com o CAB – S 69 por serem oriundos do solo, e, também, com o isolado CAB – C 50 devido aos testes de PGP. Já o subgrupo três apresenta uma similaridade dos isolados CAB – S 70 e CAB – S 71 por causa da mesma origem, o solo, e os resultados dos testes de PGP ocasiona a proximidade com o isolado CAB – C 21, este subgrupo possui uma similaridade na distribuição das bandas no cladograma. Assim, houve resultados positivos dos quatro isolados para produção de AIA e sideróforos, solubilização de fosfato e de zinco, e fixação biológica de nitrogênio, que reforçar o agrupamento desses isolados. No cladograma a proximidade de perfil de bandas, desse subgrupo, foi observada apenas para os isolados CAB – C 24 e CAB – C 25, conforme Figura 14, o que também confirma que se trata de um mesmo isolado.

Figura 14 – Polimorfismo genético dos isolados de *Streptomyces* spp por rep-PCR.



A. rep-PCR dos isolados com primer BOXA1R em gel de agarose 1,5%. **B.** Cladograma: análise das relações filogenéticas entre os isolados, gerado através do software PAST (Hammer, Harper & Ryan, 2001). **Fonte:** Autora.

De acordo com os resultados obtidos, a lise térmica seguida da análise de rep-PCR foi suficiente para obter resultados básicos, mostrando são isolados distintos (exceção dos isolados CAB – C 24 e CAB – C 25) e que os mesmos são agrupados quanto à origem de obtenção dos mesmos. A disponibilidade de diversas técnicas moleculares, como a rep-PCR, tem contribuído grandemente nos estudos taxonômicos do gênero *Streptomyces*, como apontam Law et al. (2018). Para Badaya e Srivastava (2016), a rep-PCR representa de forma geral a variabilidade intra e interespecies, sendo uma abordagem útil para discriminação e caracterização de linhagens; assim, avaliaram a variabilidade genética de linhagens de *Streptomyces*, revelando o potencial de rep-PCR em agrupar isolados de comportamento patogênico.

4.5 Sequenciamento e caracterização genômica de isolados *Streptomyces* spp.

A descoberta em 1944 da estreptomicina, primeiro antibiótico isolado de bactérias, ocasionou um destaque ao filo Actinobacteria devido a capacidade de produção de um amplo espectro de compostos bioativos. Desses compostos, mais de 10.000 são produzidos pelo gênero *Streptomyces*, e, atualmente, muitas pesquisas são realizadas para a descoberta de novas espécies desse gênero, com auxílio do sequenciamento do genoma que, também, contribui para uma melhor exploração de novos metabólitos secundários úteis (Ayed et al., 2020). Uma excelente ferramenta para rastreamento de um genoma em relação a presença de genes

biossintéticos é a mineração do genoma, que se tornou um método frequente, nos últimos anos, para *Streptomyces* (Kumar et al., 2020). As técnicas moleculares permitiram uma identificação taxonômica de bactérias com maior eficiência em relação a identificação rápida e alto rendimento (Law et al., 2018).

A análise ANI, *Average Nucleotide Index* é uma categoria de análise computacional com objetivo de definir limites das espécies de procariontes, onde o cálculo abrange a fragmentação das sequências do genoma, a pesquisa de sequência de nucleotídeos, o alinhamento e cálculo de identidade (Yoon et al., 2017). Para o sequenciamento genômico, alguns critérios foram usados para a escolha dos isolados, como: resultados anteriores obtidos por Melo (2019) na promoção de crescimento vegetal e biocontrole de *F. oxysporum* em casa de vegetação; potencial enzimático e alteração do pH ambiental obtidos por Gomes (2020) e a confirmação da produção de compostos bioativos envolvidos em PGP e antagonismo a *M. musicola* obtidos neste trabalho.

Assim, os isolados selecionados foram CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66. Para os resultados da análise de ANI, apenas valores de ANIm acima de 0.95 foram aceitos, como sugerido por Richter & Rosselló-Móra (2009). Desta forma, foi possível classificar apenas o isolado CAB – C 50 em nível de espécie, que correspondeu a *Streptomyces albulus*. No entanto, a mesma definição não foi possível para os demais isolados (Tabela 1). Os resultados mostraram a possibilidade de CAB – C 25 ser classificado como *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces pactum*, *Streptomyces xinghaiensis*, *Streptomyces griseoaurantiacus* ou apenas *Streptomyces* sp. (Tabela 1). Para o isolado CAB – S 66, *Streptomyces aquilus*, *Streptomyces pluripotens*, *Streptomyces rimosus* ou apenas *Streptomyces* sp. Para CAB – S 66, o isolado CAB – C 25 também apareceu como opção, relevando que ambos podem pertencer a mesma espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da análise de ANI (Average Nucleotide Index) desenvolvida com os isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66.

CAB – C 25		
Nº de acesso do genoma	Espécie	ANIm
GCF_000720725.1	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>Rimosus</i>	0.9707410264640559
GCF_013870595.1	<i>Streptomyces</i> sp. WELS2	0.9706650711003899
GCF_009834125.1	<i>Streptomyces</i> sp. GS7	0.9701288289752602
GCF_002005225.1	<i>Streptomyces pactum</i>	0.9700986186506213
GCF_000700005.2	<i>Streptomyces xinghaiensis</i>	0.9699551601703044
GCA_900090185.1	<i>Streptomyces</i> sp. AmelKG-D3	0.9693422254011643
GCA_013913525.1	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	0.9690680620495467
GCA_000932205.1	<i>Streptomyces</i> sp. MBRL 601	0.9442245009518445
GCF_006974005.1	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	0.9400071157955695

GCF_000331005.1	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> Car8	0.8984453638509751
CAB – C 50		
N° de acesso do genoma	Espécie	ANIm
GCF_000935185.1	<i>Streptomyces albulus</i>	0.9526246788960493
GCF_000403765.2	<i>Streptomyces albulus</i> CCRC 11814	0.9506926003866781
GCF_000504065.1	<i>Streptomyces albulus</i> PD-1	0.9506613896963306
GCF_000963515.1	<i>Streptomyces albulus</i>	0.950633208886964
GCF_000695235.1	<i>Streptomyces albulus</i>	0.9506068208976762
GCF_003851665.1	<i>Streptomyces albulus</i>	0.9505182208574116
GCF_000935185.3	<i>Streptomyces albulus</i>	0.950469496853728
GCF_000935185.2	<i>Streptomyces albulus</i>	0.950380217573611
GCF_000816025.1	<i>Streptomyces</i> sp. 769	0.9015204433093754
GCF_001704275.1	<i>Streptomyces noursei</i> ATCC 11455	0.9014808964825842
CAB – S 66		
N° de acesso do genoma	Espécie	ANIm
GCF_000816025.1	<i>Streptomyces</i> sp. 769	0.9526246788960493
GCA_001974775.1	<i>Streptomyces</i> sp. WAC00263	0.9506926003866781
GCF_003955715.1	<i>Streptomyces aquilus</i>	0.9506613896963306
CAB-25		
GCA_013362155.1	<i>Streptomyces</i> sp.	0.9506068208976762
GCF_003945525.1	<i>Streptomyces</i> sp. WAC 01438	0.9505182208574116
GCF_000816465.1	<i>Streptomyces pluripotens</i>	0.950469496853728
GCF_008704655.1	<i>Streptomyces rimosus</i>	0.950380217573611
GCF_000725475.1	<i>Streptomyces durhamensis</i>	0.9015204433093754
GCA_010550285.1	<i>Streptomyces</i> sp. SID7499	0.9014808964825842

Fonte: Autora.

A tabela 2 mostra os resultados obtidos com o sequenciamento do genoma para isolados selecionados. O genoma, dos três isolados de *Streptomyces*, compreende um tamanho entre 8,4 a 11,5 Mpb com conteúdo G+C superior a 70%, compatível com o Filo Actinobacteria, gênero *Streptomyces*.

Tabela 2. Características dos genomas de *Streptomyces* selecionados para caracterização.

Características	CAB – C 25	CAB – C 50	CAB – S 66
Tamanho (pb)	8,446,719	9,390,315	11,585,873
Status	28 contigs	144 contigs	96 contigs
Conteúdo G+C (%)	71.94	72.08	71.17
CDS	7340	8090	10292
rRNA	7	8	10
tRNA	90	95	100
tmRNA	1	1	1

Fonte: Autora.

O gênero *Streptomyces* apresenta diversidade genômica o que está refletido na quantidade de sequências codificantes, tamanho genômico e conteúdo G+C. Trata-se de cromossomos lineares grandes com aproximadamente 8 – 12 Mpb e um alto conteúdo G+C

com cerca de 67 – 78% (Law et al., 2018), corroborando com os valores obtidos no presente trabalho e confirmando a identificação inicial realizada por Melo (2019). Trabalhos realizados com isolados do gênero *Streptomyces*, por Ser et al. (2019), Holmes et al. (2018), Ser et al. (2020), Ayed et al. (2020), entre outros, reforçam as características encontradas com os isolados do presente trabalho, como genoma superior a 7 Mpb, conteúdo G+C maior que 70%, CDS maior que 5.000. É confirmado por Law et al. (2018), que os genes codificadores de proteínas (CDS) melhoram a resolução e robustez em nível de espécie de *Streptomyces* e podem ser usados como uma abordagem aceitável para a diferenciação de espécies.

Os resultados obtidos revelam que se trata de espécies distintas, visto que altos valores foram obtidos com outras espécies cujos genomas estão disponíveis nos bancos de dados, tudo indica que os três isolados selecionados não são novas espécies. Este é o primeiro passo e muito trabalho ainda será feito na caracterização genotípica de *Streptomyces*. Com este trabalho disponibilizamos mais três genomas de linhagens de *Streptomyces*.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Quanto aos testes de promoção de crescimento de plantas *in vitro*, os isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66 obtiveram resultados positivos para maior parte dos testes realizados. Em relação ao teste de antagonismo *in vitro* os isolados CAB – C 21, CAB – C 25, CAB – C 50, CAB – S 66, CAB – S 71, CAB – S 72 e CAB – S 96 comprovaram ser eficientes na inibição do fungo causador da Sigatoka-amarela.

No que se refere a microbiolização *in vitro* das mudas micropropagadas de bananeira, com a adição de microrganismos benéficos, é visto que mais estudos devem ser realizados para melhor entendimento da interação planta – bactéria, no entanto, essa prática pode contribuir, como bioinoculante, na produção de mudas micropropagadas.

A diversidade genética dos isolados, através da técnica de rep-PCR revelou que os isolados são específicos, com exceção dos isolados CAB – C 24 e CAB – C 25. E o agrupamento dos isolados ocorreu quanto a origem de obtenção dos mesmos, solo ou compostagem.

Com base nos resultados obtidos, inicialmente, através dos testes de promoção de crescimento de plantas e inibição de fitopatógeno, os isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66 foram selecionados como os mais promissores. E o sequenciamento do genoma, dos três isolados de *Streptomyces*, identificou que *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albulus* e

Streptomyces aquilus correspondem aos isolados CAB – C 25, CAB – C 50 e CAB – S 66, respectivamente.

O gênero *Streptomyces* é promissor como representante na promoção de crescimento vegetal, como melhoria na qualidade do solo e equilíbrio da microbiota do solo e da rizosfera, e ainda com habilidade em controlar fitopatógenos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aallam, Y., Dhiba, D., Lemriss, S., Souiri, A., Karray, F., Rasafi, T. E., Saïdi, N., Haddioui, A., El Kabbaj, S., Virolle, M. J. & Hamdali, H. (2021). **Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco.** *Microorganisms*, 9(5), 914.

Agricultural Biologicals Market. (2020). **Agricultural Biologicals Market by Function (Biocontrol, Biofertilizers, Biostimulants), Product Type (Microbials, Macrobials, Semiochemicals, Natural), Mode of Application (Foliar spray, Soil and Seed treatment), Crop Type, and Region - Global Forecast to 2025.** Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/agricultural-biological-market-100393324.html> . Acesso em 11 de junho de 2021.

Albelda-Berenguer, M., Monachon, M., & Joseph, E. (2019). **Siderophores: From natural roles to potential applications.** *Advances in Applied Microbiology*, 106, 193-225.

Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). **Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria.** *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39-45.

Alori, E. T., & Babalola, O. O. (2018). **Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 2213.

Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Beatriz, G., & Albericio, F. (2020). **Hydroxamate siderophores: Natural occurrence, chemical synthesis, iron binding affinity and use as Trojan horses against pathogens.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112791.

Anand, A., Falquet, L., Abou-Mansour, E., L'Haridon, F., Keel, C., & Weisskopf, L. (2021). **Much more than a toxin: hydrogen cyanide is a volatile modulator of bacterial behaviour.** bioRxiv: The Preprint Server for Biology.

Andreote, F. D., Da Rocha, U. N., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., & van Overbeek, L. S. (2010). **Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*).** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 97(4), 389-399.

Anuário brasileiro de Horti&Fruti, (2021). Benno Bernardo Kist... [et al.]. – Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2021.

- Anusha, B. G., Gopalakrishnan, S., Naik, M. K., & Sharma, M. (2019). **Evaluation of *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. for biocontrol of Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.)**. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 52(5-6), 417-442.
- Aouiche, A., Bijani, C., Zitouni, A., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2014). **Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* spp. PAL114 isolated from a Saharan soil**. Journal de Mycologie Medicale, 24(2).
- Avalos, M., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M., & van Wezel, G. P. (2020). **Production of ammonia as a low-cost and long-distance antibiotic strategy by *Streptomyces* species**. The ISME Journal, 14(2), 569-583.
- Ayed, A., Wibberg, D., Zendah el Euch, I., Frese, M., Limam, F., & Sewald, N. (2020). **Draft genome sequence of *Streptomyces tunisialis* DSM 105760 T**. Archives of Microbiology, 202, 2013-2017.
- Badaya, R., & Srivastava, J. (2016). **Molecular variability in ariability in *Streptomyces* spp. a causal organism of common scab of potato (*Solanum tuberosum* L.)**. The Bioscan: An International Quartely Journal of Life Sciences, 11(4), 2791 – 2794.
- Barreiro, C., & Martínez-Castro, M. (2019). **Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites**. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(4), 1643-1658.
- Borba, M. P., Ballarini, A. E., Witusk, J. P. D., Lavin, P., & Van Der Sand, S. (2020). **Evaluation of BOX-PCR and REP-PCR as Molecular Typing Tools for Antarctic *Streptomyces***. Current Microbiology, 77(11), 3573-3581.
- Castillo, B. M., Dunn, M. F., Navarro, K. G., Meléndez, F. H., Ortiz, M. H., Guevara, S. E., & Palacios, G. H. (2016). **Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(3), 44.
- Chaiharn, M., Theantana, T., & Pathom-Aree, W. (2020). **Evaluation of Biocontrol Activities of *Streptomyces* spp. against Rice Blast Disease Fungi**. Pathogens, 9(2), 126.
- Chang, T. L., Huang, T. W., Wang, Y. X., Liu, C. P., Kirby, R., Chu, C. M., & Huang, C. H. (2021). **An actinobacterial isolate, *Streptomyces* sp. Yx44, produces broad-spectrum antibiotics that strongly inhibit *Staphylococcus aureus***. Microorganisms, 9(3), 630.
- Chouyia, F. E., Romano, I., Fechtali, T., Fagnano, M., Fiorentino, N., Visconti, D., ... & Pepe, O. (2020). **P-Solubilizing *Streptomyces roseocinereus* MS1B15 with multiple plant growth-promoting traits enhance barley development and regulate rhizosphere microbial population**. Frontiers in Plant Science, 11.
- Cordeiro, Z., Rocha, H.S., & Araújo, A.G. (2011). **Metodologia para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório**. Embrapa Mandioca e Fruticultura – Documentos (INFOTECA-E), 32 p.: il.
- Couillerot, O., Vatsa, P., Loqman, S., Ouhdouch, Y., Jane, H., Renault, J.-H., Clément, C., & Barka, E. A. (2013). **Biocontrol and biofertilizer activities of the *Streptomyces anulatus* S37: an endophytic actinomycete with biocontrol and plant-growth promoting activities**.

Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin, 86, 271–276.

Croplife Brasil. 2021a. **Mercado de defensivos biológicos deve avançar 33% no Brasil em 2021**. Disponível em: <https://forbes.com.br/forbesagro/2021/04/mercado-de-defensivos-biologicos-deve-avancar-33-no-brasil-em-2021-diz-croplife/>. Acesso em 11 de junho de 2021.

Croplife Brasil, 2021b. **Adoção de biológicos em hortifrúteis**. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/adocao-de-biologicos-em-hortifrutis/#from-home>. Acesso em 17 de setembro de 2021.

Da Silva, C. D. F., Brito, T. L. D., Taniguchi, C. A., Lopes, L. A., Pinto, G. A., & de Carvalho, A. C. (2018). **Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 22(11), 782-787.

del Carmen Jaizme-Vega, M., Rodríguez-Romero, A. S., & Guerra, M. S. P. (2004). **Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated bananas**. Fruits, 59(2), 83-90.

De Souza, G. L. O. D., Da Silva, D. F., Nietsche, S., Xavier, A. A., & Pereira, M. C. T. (2017). **Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings**. Revista Brasileira de Fruticultura, 39(2).

Dita, M. A., Waalwijk, C., Paiva, L., Kema, G., & Souza Junior, M. T. (2010). **Kit diagnóstico para a raça 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, agente causal do mal-do Panamá da bananeira**. In Embrapa Mandioca e Fruticultura-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: Simpósio Sobre Inovação E Criatividade Científica Na Embrapa, 2., 2010, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2010.

Dobereiner, J.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. (1996). **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. - Brasília: EMBRAPA - SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB.

Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). **Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria**. Applied Microbiology and Biotechnology, 1-13.

Dutta, J., & Thakur, D. (2020). **Evaluation of Antagonistic and Plant Growth Promoting Potential of *Streptomyces* sp. TT3 Isolated from Tea (*Camellia sinensis*) Rhizosphere Soil**. Current Microbiology, 77(8), 1829-1838.

Enebak, SA & Wei, G., & Kloepper, Joseph. (1998). **Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings**. Forest Science, v.44, n.1, p.139-144.

Eshaghi, E., Nosrati, R., Owlia, P., Malboobi, M. A., Ghaseminejad, P., & Ganjali, M. R. (2019). **Zinc solubilization characteristics of efficient siderophore-producing soil bacteria**. Iranian Journal of Microbiology, 11(5), 419.

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). **In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds**. Planta, 248(1), 1-18.

- Etesami, H., & Glick, B. R. (2020). **Halotolerant plant growth-promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants.** *Environmental and Experimental Botany*, 178, 104124.
- FAO, (2019). **Countries by commodity.** Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em 29 de setembro de 2021.
- Fasusi, O. A., Cruz, C., & Babalola, O. O. (2021). **Agricultural sustainability: microbial biofertilizers in rhizosphere management.** *Agriculture*, 11(2), 163.
- Ghosh, S. K., Bera, T., & Chakrabarty, A. M. (2020). **Microbial siderophore—A boon to agricultural sciences.** *Biological Control*, 144, 104214.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). **A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796.
- Gomes, D. S. A. (2020). **Potencial bioquímico e perfil de crescimento de isolados de *Streptomyces* spp.** Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- González, D. N., Chávez, M. A. Á., Gutiérrez, R. L., Cupul, W. C., Ochoa, J. M., & Velasco, E. G. (2018). **Suitability of *Cordyceps bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for biological control of *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) in an organic Mexican banana plantation: laboratory and field trials.** *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125(1), 73-81.
- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., & Prasanna, S. L. (2020). *Streptomyces*. In: *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press Inc, pp. 55-71.
- Goteti, P. K., Emmanuel, L. D. A., Desai, S., & Shaik, M. H. A. (2013). **Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.).** *International Journal of Microbiology*, vol. 2013.
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2013). **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*, 29(10), 1821–1829.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.** *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Hasani, A., Kariminik, A., & Issazadeh, K. (2014). **Streptomyces: characteristics and their antimicrobial activities.** *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (1), 63 – 75.
- Holmes, N. A., Devine, R., Qin, Z., Seipke, R. F., Wilkinson, B., & Hutchings, M. I. (2018). **Complete genome sequence of *Streptomyces formicae* KY5, the formicamycin producer.** *Journal of Biotechnology*, 265, 116-118.
- Htwe, A. Z., Moh, S. M., Soe, K. M., Moe, K., & Yamakawa, T. (2019). **Effects of biofertilizer produced from *Bradyrhizobium* and *Streptomyces griseoflavus* on plant growth,**

nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and seed yield of mung bean, cowpea, and soybean. *Agronomy*, 9(2), 77.

Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., & Rajkumar, S. (2014). **Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth.** *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 4), 778–788.

Jones, S. E., Ho, L., Rees, C. A., Hill, J. E., Nodwell, J. R., & Elliot, M. A. (2017). ***Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals.** *Elife*, 6, e21738.

Kavino, M., & Manoranjitham, S. K. (2018). ***In vitro* bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: novel ways to combat *Fusarium* wilt.** *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 371-387.

Keswani, C., Singh, S. P., Cueto, L., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Singh, S. P., Blázquez, M. A. & Sansinenea, E. (2020). **Auxins of microbial origin and their use in agriculture.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-17.

Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., & Camargo, L. E. A. (2005). **Manual de Fitopatologia** (Vol. 2, p. 651). São Paulo: Agonômica Ceres.

Kumar, A., Vandana, R.S., Singh, M., Pandey, K.D. (2015). **Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach for disease management.** In: Singh, J.S., Singh, D.P. (Eds.), *Microbes and environmental management*. Studium Press, New Delhi, pp. 195-209.

Kumar, R. G. N., Mishra, J. P., & Prasad, R. (2020). ***In vitro* evaluation of fungicides against *Mycosphaerella musicola* causing sigatoka leaf spot of banana.** *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(3), 1635-1637.

Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzola, M. J. (2017). **Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay.** *Plant Disease*, 101(8), 1362–1372.

Law, J. W. F., Tan, K. X., Wong, S. H., Ab Mutalib, N. S., & Lee, L. H. (2018). **Taxonomic and characterization methods of *Streptomyces*: a review.** *Progress in Microbes & Molecular Biology*, 1(1).

Leach, R. (1941). **Banana leaf spot *Mycosphaerella musicola*, the perfect stage of *Cercospora musae* Zimm.** *Tropical Agriculture, Trinidad and Tobago*, 18(5).

Liu, D., Yan, R., Fu, Y., Wang, X., Zhang, J., & Xiang, W. (2019). **Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2.** *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–16.

Lopes, U. P., & Michereff, S. J. (2018). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos.** 1. ed. – Recife: EDUFRPE, 208 p.: il.

Maglangit, F., Tong, M. H., Jaspars, M., Kyeremeh, K., & Deng, H. (2019). **Legonoxamines AB, two new hydroxamate siderophores from the soil bacterium, *Streptomyces* sp. MA37.** *Tetrahedron Letters*, 60(1), 75-79.

- MAPA, 2020. **Programa Nacional de Bioinsumos**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-lanca-nesta-quarta-feira-27-o-programa-nacional-de-bioinsumos>. Acesso em 17 de setembro de 2021.
- MAPA, 2021a. **O Programa Bioinsumos**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/>. Acesso em 17 de setembro de 2021.
- MAPA, 2021b. **Brasil deve ser destaque mundial no uso de bioinsumos nos próximos anos**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-deve-ser-destaque-mundial-no-uso-de-bioinsumos-nos-proximos-anos>. Acesso em: 17 de setembro de 2021.
- Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). **An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria**. *Current Microbiology*, 43(1), 51-56.
- Melo, R. C. C. (2019). **Microbiota do solo de bananeira comercial e do composto orgânico, isolamento de actinobactérias e avaliação do potencial biotecnológico**. Tese (Doutorado Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Mitra, D., Ganeshamurthy, A. N., Sharma, K., Radha, T. K., & Rupa, T. R. (2020). **Soil physico-chemical properties and in-vitro zinc solubilization of rhizo-microbes from the different rhizospheric soil samples of harsh environment**. *Annals Food Science and Technology*, 21(1), 226-232.
- Murashige T, Skoog F. (1962). **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
- Naghoni, A., Emtiazi, G., Amoozegar, M. A., Etemadifar, Z., & Fazeli, S. A. S. (2017). **REP-PCR analysis to study prokaryotic biodiversity from Lake Meyghan**. *International Letters of Natural Sciences*, 61, 69-84.
- Nomura, E. S. (2020). **Cultivo da Bananeira**. Campinas, CDRS. 178p. 23cm (Manual Técnico, 82).
- Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2018). **Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1179–1188.
- Oliveira, J. R. G. D., Moraes, T. A. D. L., Melo, N. F. D., & Yano-Melo, A. M. (2010). **Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile***. *Bragantia*, 69, 687-694.
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). **Bacteria in the plant tissue culture environment**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 487-508.
- Paiva, R. & Paiva, P. D. O. (2001). **Cultura de Tecidos**. Pós-Graduação (Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 97 p.: il.
- Passos, M. A., de Cruz, V. O., Emediato, F. L., de Teixeira, C. C., Azevedo, V. C. R., Brasileiro, A. C., Amorim, E. P., Ferreira, C. F., Martins, N. F., Togawa, R. C., Papas Júnior, G. J., da Silva Jr, O. B., & Miller, R. N. (2013). **Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development**. *BMC Genomics*, 14(1), 1-17.

- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). **Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid**. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-220.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). **Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system**. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Paz, I. C. P. (2009). **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.
- Pereira, W. J., Issa, C. G. C., de Pinto, A. F., Lemos, D. C. S., Barbosa, A. M., Pereira, K. C., de Paula, M. S. P., & do Carmo Vieira, M. (2020). **Estabelecimento *in vitro* de bananeiras em diferentes meios de cultura submetidas a agentes antioxidantes**. *Brazilian Journal of Development*, 6(1), 4973-4984.
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). **Plant tissue culture media and practices: an overview**. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3), 242-257.
- Pignati, W. A., Lima, F. A. N. D. S., Lara, S. S. D., Correa, M. L. M., Barbosa, J. R., Leão, L. H. D. C., & Pignatti, M. G. (2017). **Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance**. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22, 3281-3293.
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). **Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges**. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture* (pp. 129-157).
- Qiao, J. Q., Wu, H. J., Huo, R., Gao, X. W., & Borriss, R. (2014). **Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action**. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 1–14.
- Qin, S., Miao, Q., Feng, W. W., Wang, Y., Zhu, X., Xing, K., & Jiang, J. H. (2015). **Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil**. *Applied Soil Ecology*, 93, 47-55.
- Queiroz, B. P. V. De, Aguilar-vildoso, C. I., Melo, I. S., Universitário, C., São, S. De, Jesus, L. C. De, & Bosco, R. D. (2006). **Visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias**. *Summa Phytopathologica*, 32,95–97.
- Quirino, Z. B. R., Talamini, V., Muniz, A. D. S., da Silva Junior, J. F., Ledo, A. D. S., & Oliveira, F. (2014). **Progresso da Sigatoka amarela na cultivar Prata-anã em Sergipe**. *Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Rani, K., Dahiya, A., Masih, J. C., & Wati, L. (2018). **Actinobacterial biofertilizers: an alternative strategy for plant growth promotion**. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(09), 607-614.
- Rehan, M., Alsohim, A. S., Abidou, H., Rasheed, Z., & Al Abdulmonem, W. (2021). **Isolation, Identification, Biocontrol Activity, and Plant Growth Promoting Capability of a Superior *Streptomyces tricolor* Strain HM10**. *Polish Journal of Microbiology*, 70(2), 245.

- Rehman, F. U., Kalsoom, M., Adnan, M., Toor, M., & Zulfiqar, A. (2020). **Plant growth promoting rhizobacteria and their mechanisms involved in agricultural crop production: A review.** *SunText Review of Biotechnology*, 1(2), 1-6.
- Řezanka, T., Palyzová, A., Faltýsková, H., & Sigler, K. (2019). **Siderophores: amazing metabolites of microorganisms.** In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 60, pp. 157-188). Elsevier.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). **Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.
- Romano-Armada, N., Yañez-Yazlle, M. F., Irazusta, V. P., Rajal, V. B., & Moraga, N. B. (2020). **Potential of bioremediation and PGP traits in *Streptomyces* as strategies for bio-reclamation of salt-affected soils for agriculture.** *Pathogens*, 9(2), 117.
- Rossi, C. C., Guimaratilde, W. V., de Queiroz, M. V., & Bazzolli, D. M. S. (2013). **Face to face with *Actinobacillus pleuropneumoniae*: landscape of the distribution of clinical isolates in southeastern Brazil.** *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2916-2924.
- Salwan, R., & Sharma, V. (2020). **Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria.** *Microbiological Research*, 231, 126374.
- Satheeraja, S. V., & Jebakumar, S. R. D. (2011). **Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from mangrove sediment.** *Journal of Basic Microbiology*, 51(1), 71–79.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. (2017). **Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes.** *3 Biotech*, 7(2), 1–10.
- Schlimpert, S., Flärdh, K., Buttner, M. (2016). **Fluorescence Time-lapse Imaging of the Complete *S. venezuelae* Life Cycle Using a Microfluidic Device.** *Journal of Visualized Experiments*, (108), e53863.
- Shafigh, M., Hamidpour, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Mozafari, V., & Furrer, G. (2019). **Bioavailability of Zn from layered double hydroxides: the effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR).** *Applied Clay Science*, 182, 105283.
- Sharpley, A., Jarvie, H., Flaten, D., & Kleinman, P. (2018). **Celebrating the 350th anniversary of phosphorus discovery: A conundrum of deficiency and excess.** *Journal of Environmental Quality*, 47(4), 774-777.
- Ser, H. L., Tan, W. S., Yin, W. F., Chan, K. G., Ab Mutalib, N. S., & Lee, L. H. (2019). **Whole genome sequence of *Streptomyces humi* strain MUSC 119T isolated from intertidal soil.** *Progress in Drug Discovery & Biomedical Science*, 2(1).
- Ser, H. L., Law, J. W. F., Tan, W. S., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2020). **Whole genome sequence of *Streptomyces colonosanans* strain MUSC 93JT isolated from mangrove forest in Malaysia.** *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 3(1).

- Silva, H., Vieira, R., Cardoso, K., & Araújo, K. (2016). **Processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira por microbiolização com rizobactérias produtoras de ácido indolacético**. Embrapa Mandioca e Fruticultura-Circular Técnica (INFOTECA-E).
- Singh, R. P., Manchanda, G., Maurya, I. K., Maheshwari, N. K., Tiwari, P. K., & Rai, A. R. (2019). ***Streptomyces* from rotten wheat straw endowed the high plant growth potential traits and agro-active compounds**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 17, 507-513.
- Soumare, A., Boubekri, K., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., & Kouisni, L. (2020). **From isolation of phosphate solubilizing microbes to their formulation and use as biofertilizers: status and needs**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7, 425.
- Sousa, J. A. de J., & Olivares, F. L. (2016). **Plant growth promotion by streptomycetes: Ecophysiology, mechanisms and applications**. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 3(1), 1–12.
- Subramaniam, G.; Arumugam, S.; Rajendran, V.; Vadlamudi, S. (2016). **Plant Growth Promoting Microbes for Field Applications**. In: Microbial Inoculants in Sustainable Agriculture Productivity; Springer: New Delhi, India, 239–251.
- Suman, S. (2017). **Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana**. Biochemical and Cellular Archives, 17(1), 1-26.
- Syiemiong, D., & Jha, D. K. (2019). **Antibacterial potential of Actinobacteria from a Limestone Mining Site in Meghalaya, India**. Journal of Pure and Applied Microbiology, 13(2), 789-802.
- Thampi, A., & Bhai, R. S. (2017). **Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.)**. Biological Control, 109, 1–13.
- Tripathi, N., Hills, CD, Singh, RS, & Atkinson, CJ (2019). **Utilização de resíduos de biomassa em produtos de baixo carbono: aproveitando um importante recurso potencial**. NPJ Clima e Ciências Atmosféricas, 2 (1), 1-10.
- Valadares, A. A., Alves, F., & Galiza, M. (2020). **O Crescimento do uso de agrotóxicos: uma análise descritiva dos resultados de Censo Agropecuário 2017**.
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). **Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery**. Nature Reviews Microbiology, 18(10), 546-558.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., & Goormachtig, S. (2016). ***Streptomyces* as a plant's best friend?** FEMS Microbiology Ecology, 92(8).
- Vieira, R. S. (2012). **Aplicação de rizobactérias e bactérias endofíticas para promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira**. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Bahia.
- Vijayabharathi, R., Sathya, A., & Gopalakrishnan, S. (2015). **Plant growth-promoting microbes from herbal vermicompost**. In **Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants**. Springer, Cham. 71 – 88.

- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). **Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes**. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4).
- Wang, X., Whalley, W. R., Miller, A. J., White, P. J., Zhang, F., & Shen, J. (2020). **Sustainable cropping requires adaptation to a heterogeneous rhizosphere**. *Trends in Plant Science*, 25, 1194 – 1202.
- Weijers, D., Nemhauser, J., & Yang, Z. (2018). **Auxin: small molecule, big impact**. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 133-136.
- Yavarian, S., Jafari, P., Akbari, N., & Feizabadi, M. M. (2021). **Selective screening and characterization of plant growth promoting bacteria for growth enhancement of tomato, *Lycopersicon esculentum***. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(1), 121.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). **A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(10), 1281-1286.
- You, J. L., Cao, L. X., Liu, G. F., Zhou, S. N., Tan, H. M., & Lin, Y. C. (2005). **Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 679-682.
- Zhu, Z., Tian, Z., & Li, J. (2021). **A *Streptomyces morookaensis* strain promotes plant growth and suppresses *Fusarium* wilt of banana**. *Tropical Plant Pathology*, 46(2), 175-185.
- Zimmerman, A. 1902. **Über einige an tropischen Kulturpflanzen beobachtete pilze**. *Zentralbl. Parasitenkd. Infectionskr.* 2 Abt. 8:219.