

GIULIANA SHELLY LIZANA FLORES

**CONTROLE BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR
Streptomyces spp.**

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: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Leandro Grassi de Freitas
Thalita Suelen A. Monteiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

L789c
2023
Lizana Flores, Giuliana Shelly, 1993-
Control biológico e promoção de crescimento vegetal por
Streptomyces spp.: / Giuliana Shelly Lizana Flores. - Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (65 f.): il. (algumas color.).
Orientador: Marisa Viera de Queiroz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia Agrícola, 2023.
Referências bibliográficas: .
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.567>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Feijão - Doenças e pragas - Controle biológico; 2. Fungos fitopatogênicos; 3. Antracnose; 4. Actinobactéria; 5. Plasmídeos; I. Queiroz, Marisa Viera de II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola III. Título

CDD 22. ed. 635.65294

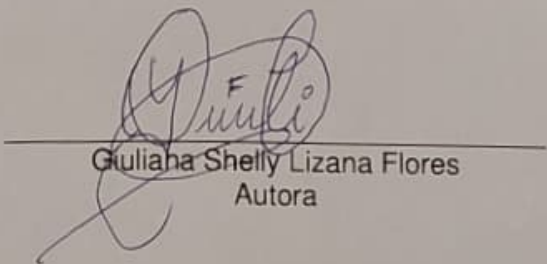
GIULIANA SHELLY LIZANA FLORES

CONTROLE BIOLÓGICO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR
Streptomyces spp.

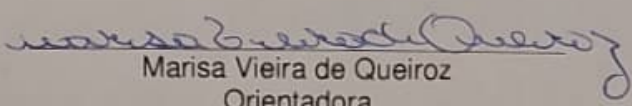
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de abril de 2023

Assentimento:



Giuliana Shelly Lizana Flores
Autora



Marisa Vieira de Queiroz
Orientadora

*Dedico este trabalho a meus pais, irmãos,
principalmente minha mãe Chavela, meus
avós (Amália e Saturnino†) e ao professor
Fredy Rivas, que acreditaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que ilumina e guia meu caminho pela graça da vida, por confortar meu coração e me dar forças durante todos os momentos difíceis, por todas as batalhas que venci, e também que perdi, pois todos esses acontecimentos me ensinaram lições importantes na minha vida pessoal, familiar, social e profissional.

Agradecimento eterno a minha mãe Chavela, que a pesar da distância sempre acreditou em mim, me dando forças nos momentos de fraquezas. Aos meus avós, Amalia e Saturnino, meu avô que agora é um anjo no céu, e que está mais perto de mim.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, minha orientadora, fico grata pela paciência e a dedicação constante, além de toda a atenção, disponibilidade ao ensinar e auxiliar em todo o trajeto desta pesquisa e na minha formação na UFV.

A Dra. Thalita, minha coorientadora, pelos conselhos na pesquisa, sua ajuda essencial e dicas para uma boa pesquisa.

Aos professores Dr. Maurício Dutra Costa, Dr. Leandro Grassi de Freitas, pelos ensinamentos no transcurso de meus estudos e aos membros da banca examinadora pela contribuição ao trabalho.

A todos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, que fizeram parte deste caminho da Pós-graduação, Patrícia, Mirele, Janaína, Felipe, Osiel, Bruna e Raíssa, além de ser meus colegas que participaram desta pesquisa, que são uma família que esteve comigo nos momentos bons e de fraqueza, em que levarei boas lembranças desta turma unida. Também fico grata a Ariane.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao corpo docente pelos ensinamentos que foram chaves para minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com o trabalho.

Nunca deixe que sua persistência e paixão se transformem em teimosia e ignorância. Nossa maior glória não está em nunca falhar, mas em nos levantar cada vez que falhamos. Persistência e determinação são sempre recompensadas.

(Autor desconhecido)

RESUMO

FLORES, Giuliana Shelly Lizana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2023. **Controle biológico e promoção de crescimento vegetal por *Streptomyces* spp.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Leandro Grassi de Freitas e Thalita Suelen Avelar Monteiro.

O feijoeiro é cultivado em diversos sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, tanto por pequenos como por grandes produtores. No entanto, as reduções causadas na produtividade das lavouras pelos fitopatógenos são significativas. O uso de agrotóxicos para o controle de doenças, como os fertilizantes químicos, pode ocasionar problemas ambientais a médio e longo prazo. Nesse contexto, a busca por novas alternativas para o controle de doenças e melhoria das condições do solo tem crescido nos últimos anos. Assim, neste estudo, dois isolados de *Streptomyces* spp. (4L e 6O) coletados do solo foram caracterizados de acordo com a sua morfologia e fisiologia, e avaliados quanto a sua capacidade de controlar fitopatógenos por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. A capacidade de promoção de crescimento vegetal dos isolados de *Streptomyces* spp. foi avaliada por meio da detecção de fixação biológica de nitrogênio, da produção de ácido 3-indol-acético (AIA), de amônia e de sideróforos e da solubilização de fósforo. Foram também avaliadas a capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas (quitinase, xilanase, celulase e pectinase), assim como β -1,3-glucanase. Além disso, foi demonstrada a presença de megaplasmídeo nessas bactérias mediante o método de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os resultados dos testes *in vitro* mostraram a capacidade antagonista dos isolados frente aos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* (agente causal da antracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (agente causal da podridão ou mofo branco), e *Rhizoctonia solani* (agente causal da podridão radicular). A maior porcentagem de inibição de *C. lindemuthianum* foi obtida pelo isolado 6O que foi de 68,47%; para *S. sclerotiorum* foi de 51,22% pelo isolado 4L; e para *R. solani*, os dois isolados de *Streptomyces* spp. inibiram o crescimento do fungo com a mesma eficiência (38,47%). Experimentos realizados *in vivo* confirmaram esses resultados, em que os isolados de *Streptomyces* spp. reduziram a severidade da antracnose nas folhas em 25% para o isolado 6O e em 30% para o 4L; do mofo branco em 90% e da podridão radicular em 10% em relação ao controle positivo. Ambos os isolados foram capazes de incrementar a biomassa radicular e aérea em 20%, assim como o

comprimento da raiz e da parte aérea em 25%. Observou-se ainda que ambos os isolados apresentam megaplasmídeo com tamanho aproximado de 97 kb. Concluiu-se que esses microrganismos possuem potencial como biocontroladores de doenças e promotores de crescimento para a cultura do feijão, além de apresentar um megaplasmídeo que pode ser importante para a produção de novos metabólitos secundários. Assim, esses isolados de *Streptomyces* spp. podem ser alternativa viável para a agricultura sustentável.

Palavras-chave: Fungo fitopatogênico. Actinobactéria. Megaplasmídeo. Enzimas lignocelulolíticas.

ABSTRACT

FLORES, Giuliana Shelly Lizana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2023. **Biological control and plant growth promotion by *Streptomyces* spp.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Leandro Grassi de Freitas and Thalita Avelar Monteiro.

The common bean is cultivated in different production systems and in all Brazilian regions, both by small and large producers. However, the reductions caused in crop productivity by phytopathogens are significant. The use of pesticides to control diseases, such as chemical fertilizers, can cause environmental problems in the medium and long term. In this context, the search for new alternatives for disease control and improvement of soil conditions has grown in recent years. Thus, in this study, two isolates of *Streptomyces* spp. (4L and 6O), collected from the soil were characterized according to their morphology and physiology, and evaluated for their ability to control phytopathogens through *in vitro* and *in vivo* assays. The ability of *Streptomyces* spp. isolates to promote plant growth was evaluated by detecting biological nitrogen fixation, production of 3-indole-acetic acid (IAA), ammonia, and siderophores and phosphorus solubilization. The ability to produce lignocellulytic enzymes (chitinase, xylanase, cellulase and pectinase) as well as β -1,3-glucanase were also evaluated. In addition, the presence of megaplasmids in these bacteria was demonstrated using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method. The results of the *in vitro* tests showed the antagonistic capacity of the isolates against the fungi *Colletotrichum lindemuthianum* (causal agent of anthracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (causal agent of rot or white mold), and *Rhizoctonia solani* (causal agent of root rot). The highest percentage of inhibition of *C. lindemuthianum* was obtained by isolate 6O, which was 68.47%; for *S. sclerotiorum* it was 51.22% for isolate 4L; and for *R. solani*, the two isolates of *Streptomyces* sp. inhibited the growth of the fungus with the same efficiency (38.47%). Experiments performed *in vivo* confirmed these results, in which isolates of *Streptomyces* spp. reduced the severity of anthracnose on leaves by 25% for isolate 6O and by 30% for 4L; white mold in 90% and root rot in 10% compared to the positive control. Both isolates were able to increase root and shoot biomass by 20%, as well as root and shoot length by 25%. It was also observed that both isolates have a megaplasmids with an approximate size of 97 kb. It was concluded that these microorganisms have potential as disease biocontrollers and growth promoters for

bean crop, in addition to presenting a megaplasmids that may be important for the production of new secondary metabolites. Thus, these isolates of *Streptomyces* spp. can be a viable alternative for sustainable agriculture.

Keywords: Phytopathogenic fungus. Actinobacteria. Megaplasmid. lignocellulolytic enzymes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1.	Microrganismos, condições de cultura e manutenção	16
2.2.	Caracterização morfológica e fisiológica	17
2.2.1	Montagem de lâminas para microcultivo	17
2.2.2	Testes de assimilação de fontes de carbono	17
2.2.3	Ensaio de tolerância a cloreto de sódio	18
2.2.4	Ensaio de tolerância a diferentes valores de pH	18
2.3.	Avaliação do potencial biotecnológico	18
2.3.1	Produção de enzimas lignocelulolíticas	18
2.3.2	Análise da atividade de β -1,3-glucanase	19
2.3.3	Avaliação do potencial antagônico de <i>Streptomyces</i> spp. por meio de testes <i>in vitro</i>	20
2.3.4	Avaliação do antagonismo bacteriano via produção de compostos voláteis <i>in vitro</i>	21
2.4.	Avaliação do potencial antagônico de <i>Streptomyces</i> spp. por meio de testes <i>in vivo</i>	22
2.5.	Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	24
2.5.1	Produção de amônia	24
2.5.2	Fixação biológica de nitrogênio	24
2.5.3	Solubilização de fosfato inorgânico	25
2.5.4	Produção de Ácido 3-indol-acético (AIA)	25
2.5.5	Produção de sideróforos	25
2.6.	Deteccão de plasmídeos por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	26
2.7.	Avaliação da promoção de crescimento vegetal	27
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1.	Crescimento e caracterização morfológica e fisiológica	28
3.2.	Avaliação do potencial biotecnológico	34
3.2.1	Análise de enzimas lignocelulolíticas	34

3.2.2	Avaliação do potencial antagônico de <i>Streptomyces</i> sp. 4L e 6O <i>in vitro</i>	38
3.3.	Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento <i>in vitro</i>	42
3.3.1	Produção de sideróforos, solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA e amônia	42
3.4.	Deteção de plasmídeo em <i>Streptomyces</i> spp. por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	45
3.5.	Avaliação do potencial antagônico de <i>Streptomyces</i> spp. por meio de testes <i>in vivo</i>	47
3.6.	Avaliação da promoção de crescimento em plantas do feijão	51
4	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

O feijão é um grão que apresenta valor nutritivo, sendo rico em fibras, minerais, carboidratos, proteínas e vitaminas. A produção mundial do feijão em 2020 foi de 27 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020), posicionando o Brasil em terceiro lugar com produção de 2,87 milhões de toneladas na safra 2020/21 (CONAB, 2022). No entanto, a produção do feijão é afetada por fatores abióticos e bióticos distintos, entre eles a incidência de doenças ocasionadas por patógenos, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causando entre 30 e 90% de perdas (BORÉM E MIRANDA, 2009). Entre as doenças de importância epidemiológica estão a antracnose (causada por *Colletotrichum lindemuthianum*), o mofo branco (causada por *Sclerotinia sclerotiorum*) e a podridão radicular (causada por *Rhizoctonia solani*). O controle dessas doenças tem se dado principalmente pelo uso de produtos químicos que podem aumentar a produtividade, mas prejudicam a saúde humana e provocam desequilíbrio do agroecossistema.

Uma das principais doenças e de grande preocupação dos produtores é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, que infecta toda a planta em seus diferentes estágios de desenvolvimento (ARAÚJO, 1988). O fungo causa lesões que se estabelecem nas nervuras principais e secundárias da folha e dos pecíolos, com manchas de coloração marrom-escuras (SCHWARTZ, 1991). À medida que a doença progride, causa a morte de tecidos da planta e vagem, causando perda da produção que pode chegar entre 80 a 100% (SHARMA *et al.*, 2008; PADDER *et al.*, 2017). A podridão ou mofo branco, causada pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, afeta mais de 600 espécies de plantas, sendo considerada um dos fatores limitantes à produção e à qualidade do feijão em todo o mundo (TU, 1997; BOLAND e HALL, 1994). Quando os escleródios (estruturas reprodutivas) encontram ambiente ótimo (temperatura em torno de 18 a 22 °C e alta umidade) podem germinar formando o apotécio, em que produz os ascósporos que são liberados no solo ou no ar, infectando o hospedeiro (ABAWI e GROGAN, 1979; VENETTE, 1998). Numerosas estratégias de manejo enfrentam desafios devido à persistência e tolerância a longo prazo dos escleródios fúngicos (ARFAOUI *et al.*, 2018). A podridão radicular é causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, que é um patógeno que vive no solo e afeta o crescimento da planta, causando lesões necróticas na raiz, caule, semente e folha, *damping-off* ou tombamento e murchamento da planta (LAMARI e BERNIER, 1985; OMAR, 1996),

podendo sobreviver como escleródios no solo ou resíduos vegetais. As perdas na produção provocadas por esse fungo podem chegar ao redor de 100% (SINGH e SCHWARTZ, 2010). Assim, a busca por alternativas menos agressivas ao meio ambiente é necessária, como por exemplo, o uso de microrganismos que atuam no controle biológico e na promoção de crescimento da planta (DIAZ-DIAZ *et al.*, 2022). Neste panorama, microrganismos como as actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces* tem sido alvo de estudos.

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas que habitam ecossistemas terrestres (solo), aquáticos (água doce e salgada) e em menores quantidades no ar. Sendo de vida livre ou saprofíticas, mas algumas formam associações mutualísticas ou parasitárias com plantas e animais (HAZARIKA e THAKUR, 2020). Dentro do filo Actinobactéria, o gênero predominante é *Streptomyces* e, segundo Williams e Vickers (1988), 95% dos isolados do solo pertencem a este gênero.

As actinobactérias apresentam grande plasticidade fenotípica e diferem na presença ou ausência de micélio aéreo, na cor do micélio, na estrutura e aparência dos esporos (comprimento e arranjo) e na produção de pigmentos melanóides difusíveis. Também exibem variação na morfologia celular, podendo apresentar forma cocóide (*Micrococcus*), de bastonete (*Mycobacterium*) e bastonete cocóide (*Arthrobacter*), hifas ramificadas com esporos (*Micromonospora*), formas de hifas fragmentadas (*Nocardia*) e micélio ramificado permanente (*Streptomyces* e *Frankia*) (BARKA *et al.*, 2016). As condições ambientais como pH, salinidade, fontes nutricionais (C e N) e temperatura também alteram a morfologia das actinobactérias (LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1965).

O ciclo de vida de *Streptomyces* é particularmente complexo, o que implica em desenvolvimento multicelular coordenado com diferenciação fisiológica e morfológica. Quando o esporo encontra condições ótimas em termos de fatores ambientais e nutricionais, como a N-Acetilglucosamina (GlcNAc) que é o monômero de quitina e fonte de carbono e nitrogênio (RIGALI *et al.*, 2008), germina e cresce para formar o micélio vegetativo. A GlcNAc atua como molécula de sinalização de nutrientes para bactérias, por conseguinte, em ambiente oligotrófico, GlcNAc ativa uma via de sinalização para a produção de antibióticos (JAVAD e NAGHMEH, 2017). Quando a diferenciação morfológica é iniciada, o micélio aéreo é produzido, e ambos os micélios (aéreo e vegetativo) crescem por extensão de pontas, e ao atingir suficiente biomassa, um sinal de interrupção do crescimento é transmitido, iniciando a etapa da

esporulação, sendo formadas as cadeias de esporos de diferentes comprimentos e arranjos (KEIJSER *et al.*, 2003).

As actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces* possuem amplo potencial para aplicação biotecnológica, devido à sua capacidade de produção de metabólitos secundários, compostos voláteis, sideróforos, produção de enzimas extracelulares, entre outros (CHATER *et al.*, 2010; MANVISAGAN *et al.*, 2014). Esse gênero produz ampla variedade de compostos antibióticos (de SIMEIS e SERRA, 2021; ALAM *et al.*, 2022), que representam entre 70-80% dos produtos bioativos naturais, com aplicações na medicina, agricultura, bioquímica e indústria de alimentos (HARIR *et al.*, 2018; ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020). Para o melhor estudo dos compostos do metabolismo secundários produzidos por *Streptomyces*, Alam *et al.* (2022) dividiram em 4 classes os metabólitos descobertos: i) compostos com atividades reguladoras, como sideróforos, agentes morfogênicos e promotores de crescimento; ii) compostos com atividade antagonista, como antiprotozoários, antibacterianos, antifúngicos e antivirais, iii) compostos agrobiológicos como inseticidas, pesticidas e herbicidas; iv) drogas farmacêuticas, que incluem agentes neurológicos, imunomoduladores, agentes antitumorais e inibidores enzimáticos.

A produção de antibióticos e outros metabólitos secundários está correlacionada com a fase estacionária do ciclo de vida de *Streptomyces*, quando o desenvolvimento ou multiplicação é interrompido (BIBB, 2005). Com a depleção de nutrientes, o micélio vegetativo é autoliticamente degradado por mecanismo de morte celular programada (PCD), liberando composto de aminoácidos (RETAMAL-MORALES *et al.*, 2017), açúcares aminados, nucleotídeos e lipídios ao redor do micélio lisado, o que atrai microrganismos móveis membros da microbiota do solo. Nesse momento, a produção de compostos antimicrobianos é ativada para a proteção dos nutrientes liberados pela autólise (MÉNDEZ *et al.*, 1985; DAVE e INGLE, 2022).

Além dos compostos já identificados por meio da utilização de outras técnicas, o sequenciamento de nova geração (NGS) e a mineração de genoma tem revelado que as actinobactérias têm o potencial para a produção de metabólitos secundários diversos, por meio da detecção de genes que codificam as proteínas essenciais para a síntese desses compostos. Esses genes estão dispostos em grupos conhecidos como *Clusters* de Genes Biossintéticos (BGCs) em megaplasmídeos lineares (NOVAKOVA *et al.*, 2013; CIMERMANCIC *et al.*, 2014). Atualmente, a classificação baseada em morfologia e análise de compostos químicos das actinobactérias tem sido

completada por dados taxonômicos moleculares, obtidos pela análise da sequência do rDNA 16S. Esse filo bacteriano apresenta ampla variação no tamanho dos genomas, de menos de 1 Mb em algumas espécies de *Tropheryma*, a mais de 12 Mb em algumas espécies de *Streptomyces*, e também tem um alto teor de guanina-citosina (G + C) (BARKA *et al.*, 2016; ANDAM *et al.*, 2016), variando de 51% em algumas *Corynebacterium* até mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia* (SEGARAN *et al.*, 2017). Muitos desses gêneros apresentam ainda megaplasmídeos lineares com tamanhos maiores que 50 kb (KINASHI *et al.*, 1994; CORNELL *et al.*, 2018), como também plasmídeos circulares com tamanho de 8 – 31 kb (ZHANG, 2008).

A produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por actinobactérias também tem sido explorada (SCHOLLER *et al.*, 2002) e mais de 1400 COVs foram detectados em *Streptomyces* (JONES e ELLIOT, 2017). Os metabólitos voláteis podem se difundir no ar e no solo, sendo usados na supressão de patógenos de plantas, formação de biofilme, entre outros (NETZKER *et al.*, 2020). Do mesmo modo, tais bactérias podem produzir fitohormônios, induzir resistência sistêmica (ISR) em plantas, solubilizar fosfato, produzir sideróforos (SALWAN e SHARMA, 2020; BOUKHATEM *et al.*, 2022), fixar biologicamente nitrogênio (BNF), interferir em sinais de detecção de *quorum sensing* (QS) e apresentar capacidade antagônica aos patógenos (BHATTACHARYYA e JHA, 2012; KUMAR e SINGH, 2020).

Muitas cepas do gênero *Streptomyces* produzem enzimas líticas extracelulares que contribuem nas propriedades antagônicas frente aos patógenos de plantas (CHATER *et al.*, 2010, BERLEMONT e MARTINY, 2013; SALWAN e SHARMA, 2020). Enzimas líticas, como a protease, lipase, quitinase (MAHADEVAN e CRAWFORD, 1997) e glucanase (TREJO-ESTRADA *et al.*, 1998), são consideradas parte da estratégia no biocontrole, por sua função na degradação da parede celular dos fungos. Outras enzimas como pectinase, xilanase e celulase, degradam a biomassa vegetal (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017; RAVINDRAN *et al.*, 2018), ajudando a proteger o meio ambiente ao degradar diferentes agrossídus (AMADI *et al.*, 2022), como a matéria orgânica do solo.

O uso dessas bactérias promotoras de crescimento de plantas é uma prática ecológica para a agricultura, mediante vários processos diretos ou indiretos. Por exemplo, a maioria dos solos agrícolas no Brasil são deficientes em fósforo, apresentando teores médios de 1,0 mg kg⁻¹ na forma disponível para a planta (FONTANA, 2021); o nitrogênio no solo se encontra em forma não disponível (N₃),

exigindo aos agricultores o uso de fertilizantes químicos solúveis, prejudicando a microbiota do solo. Por causa disso, bactérias promotoras de crescimento como *Streptomyces* spp. podem converter o fósforo e o nitrogênio insolúveis do solo em formas solúveis que as plantas podem assimilar (ALORI *et al.*, 2017).

Na atualidade, diferentes espécies de *Streptomyces* vêm sendo usadas como inoculantes para biocontrole, tais como Mycostop® (Verdera, Finlândia) e Actinovate (Natural Industries, Incorporated, Estados Unidos), baseados em *Streptomyces griseoviridis* K61 e *Streptomyces lidicus* WYEC 108, respectivamente, o que demonstra a relevância desse gênero para a agricultura e ecologia do solo (MITRA *et al.*, 2022).

Em um estudo com Actinobactérias realizado por Ortiz (2022) foram isoladas e identificadas 10 actinobactérias do solo, que foram avaliadas quanto ao controle do nematoide de galhas (*Meloidogyne javanica*) em tomate. Os resultados mostraram a capacidade destas actinobactérias em parasitar os ovos e reduzir a penetração de juvenis nas raízes. Segundo as análises filogenéticas, a maioria das bactérias isoladas pertencem ao gênero *Streptomyces*. No presente estudo, dois desses isolados do gênero *Streptomyces* (4L e 6O) foram caracterizadas quanto a capacidade de inibição dos fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e *R. solani*, a promoção de crescimento vegetal, a produção de enzimas lignocelulolíticas (quitinase, celulase, pectinases, xilanase e glucanase), como também a presença de megaplasmídeos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos, condições de cultivo e manutenção

Foram utilizadas as actinobactérias isoladas do solo por Ortiz (2022), que fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM) no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro/UFV) (tabela 1). Para uso nos testes, as bactérias foram reativadas e cultivadas em ágar GYM (4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 4 g L⁻¹ de extrato de malte, 2 g de CaCO₃, 4 g L⁻¹ de glicose, 12 g L⁻¹ de ágar) durante nove dias a 28 °C. Os fungos fitopatogênicos utilizados foram *C. lindemuthianum* isolado A2 2-3 pertencente a raça fisiológica 89, *S. sclerotiorum* código 2987 da coleção do LGMM e *R. solani* B0B4 isolado do eucalipto da coleção do Laboratório de Patologia Florestal - UFV. O cultivo para a obtenção dos inóculos foi realizado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (marca KASVI) durante cinco dias a 25 °C.

Tabela 1- Isolados de actinobactérias do solo utilizados neste trabalho

Código	Origem	Identificação
4 L	Universidade Federal de Viçosa (UFV) - Viçosa, MG	<i>Streptomyces</i> sp.
6 O	São Gabriel do Oeste, Mato Grosso do Sul	<i>Streptomyces</i> sp.

2.2. Caracterização morfológica e fisiológica

2.2.1. Montagem de lâminas para microcultivo

Foram depositados 40 µL de suspensão de esporos de cada isolado ao redor de lamínulas esterilizadas colocadas sobre 20 mL de meio ISP2 (4 g L⁻¹ extrato de levedura, 10 g L⁻¹ extrato de malte, 4 g L⁻¹ dextrose e 20 g L⁻¹ ágar) distribuídos em uma placa de Petri. A cultura foi incubada a 28 °C ±2 por um período de nove dias. Após o período de incubação, cada lamínula foi retirada com auxílio de uma pinça estéril e foi invertida e posicionada cuidadosamente sobre uma gota de corante azul algodão em uma lâmina. As lâminas foram observadas sob microscópio de luz (Nikon Eclipse E600) com aumentos de 40 e 100X e as imagens foram fotografadas.

Para confirmar a classificação dos isolados de *Streptomyces* spp. de acordo com a morfologia e arranjo de esporos, foram adotados os parâmetros descritos no manual de Bergey (BERGEY e HOLT, 1994).

2.2.2. Testes de assimilação de fontes de carbono

Foi testado o crescimento das bactérias em oito fontes de carbono, sendo elas: galactose, manitol, celulose, amido, xilose, sacarose, inositol e arabinose. Cada fonte de carbono foi adicionada ao meio ISP9 em uma concentração final de 1% (p/v). O crescimento em meio ISP9 com glicose 1% (0,05 M) foi usado como controle positivo e o crescimento em meio ISP9, sem nenhuma fonte de carbono, foi usado como controle negativo (PROSSER e PALLERONI, 1978). A inoculação foi feita de acordo com o NMP (número mais provável). Em um microtubo Eppendorf de 2 mL foi adicionado 1 mL de uma suspensão de bactérias que foi agitada (10^0). Depois foram feitas diluições em série de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Uma vez feitas as diluições, as placas foram marcadas de acordo à figura 1. Com uma pipeta estéril, uma alíquota de 0,2 mL de cada diluição foi transferida para uma posição específica marcada em cada placa.

As culturas foram incubadas a 28 °C por um período de sete dias e foi avaliado o desenvolvimento das colônias nos meios com as diferentes fontes de carbono, que foram comparadas com os controles. Foram realizadas três repetições biológicas.

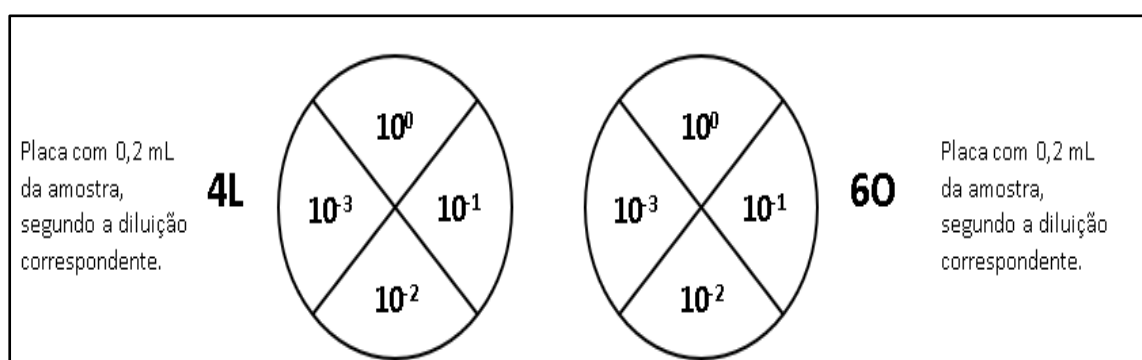


Figura 1. Organização dos inóculos das suspensões de células dos isolados de *Streptomyces* spp. nos meios com diferentes fontes de carbono. Em cada quadrante foi inoculada uma gota de 0,2 mL de cada diluição das suspensões de *Streptomyces* sp. 4L e *Streptomyces* sp. 6O.

2.2.3. Ensaio de tolerância a cloreto de sódio

As bactérias foram inoculadas em placas com meio ISP2 sem NaCl e com NaCl, nas seguintes concentrações: 1% (0,17 M), 2% (0,34 M), 4% (0,68 M), 5% (0,85 M), 6% (1,02 M), 8% (1,36 M), 10% (1,71 M), 12% (2,02 M) e 13% (2,22 M) (GOOD *et al.*, 1966; XU *et al.*, 2006). As culturas foram incubadas a 28 °C durante sete dias. Foram realizadas três repetições biológicas.

2.2.4. Ensaio de tolerância a diferentes valores de pH

As bactérias foram inoculadas em placas contendo meio ISP2 nos valores de pH de 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 e incubadas a 28 °C durante sete dias. Foram realizadas três repetições biológicas.

2.3. Avaliação do potencial biotecnológico

2.3.1. Produção de enzimas lignocelulolíticas

Os isolados foram analisados quanto a produção de celulase, pectinase e xilanase em meio sólido. Para a produção de celulase foi usado o ágar CMC (carboximetilcelulose 0,2%) (KASANA *et al.*, 2008) e para xilanase foi usado o ágar xilano, que foi enriquecido com ágar nutriente e xilana 0,2% (PRIYA *et al.*, 2012). Os isolados foram inoculados no centro das placas, que foram colocadas a 28 °C por sete dias. Após a incubação, os meios de cultura foram cobertos completamente com o corante de revelação Vermelho Congo 1% (0,014 M) e as placas foram deixadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o excesso de corante foi retirado e o meio de cultura foi coberto com uma solução de NaCl (1M). Foram considerados positivos para a produção de celulase e xilanase os isolados em que foi observado um halo ao redor da colônia. O diâmetro de cada halo foi medido com paquímetro digital.

Para a análise da produção de pectinases foi usado o Pectinase Screening Agar Media (PSAM), que contém pectina cítrica 10 g L⁻¹ em sua composição, além de NaNO₃ (2 g L⁻¹), KCl (0,5 g L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g L⁻¹), K₂HPO₄ (1 g L⁻¹), triptona (0,5 g L⁻¹), ágar (20 g L⁻¹), e pH 5,5 (OUMER e ABATE, 2018). As placas foram colocadas a 28 °C durante sete dias. Depois desse período, o meio de cultura foi coberto com solução de iodeto de potássio (50 mM) e as placas foram deixadas a temperatura

ambiente por 5 minutos. Foram considerados positivos para a produção de pectinases os isolados em que foi observado um halo ao redor da colônia.

Para a análise de quitinase foi misturada uma solução com quitina coloidal ao meio MLN (Meio sólido livre de nitrogênio) (HAMID *et al.*, 2013). As bactérias foram inoculadas e as culturas foram incubadas a 28 °C por sete dias. Após esse período, o meio de cultura foi coberto com Vermelho Congo 1% (0,014 M), e as placas foram deixadas a temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso de corante foi retirado e o meio de cultura foi coberto com uma solução de NaCl (1M). A formação do halo ao redor da colônia, indicou a produção de quitinase.

2.3.2. Análise da atividade de β -1,3-glucanase

A análise de atividade de β -1,3-glucanase foi obtida medindo a formação de açúcar redutor usando o método colorimétrico (WU *et al.*, 2018, com modificações). Para avaliar a atividade dessa enzima foi usado o meio mínimo líquido (KHPO_4 1 g L⁻¹, NaNO_3 3 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g L⁻¹ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g L⁻¹) adicionado de laminarina (5 g L⁻¹). Os isolados (10^6 esporos mL⁻¹) foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer contendo 20 mL do meio. Os frascos foram colocados sob agitação rotativa a 200 rpm e 30 °C por 72 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas por 4 minutos a 9.300 g. Uma alíquota de 440 μL do sobrenadante foi transferida para um tubo de 2 mL e foram acrescentados 180 μL de tampão acetato de amônio 100 mM (pH 5,5). A mistura foi mantida em banho-maria a temperatura de 37 °C por 4 horas. Para finalizar a reação foram adicionados 800 μL de 3,5-dinitrosalicilato (DNS), a mistura foi fervida por 5 minutos e depois colocada em gelo por 5 minutos. Foi medida a absorbância (540 nm) usando o espectrofotômetro. Em concordância com as condições padrão do ensaio, uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto. Todos os testes foram realizados em triplicata para cada tratamento.

2.3.3. Avaliação do potencial antagônico de *Streptomyces* spp. por meio de testes *in vitro*

Os testes foram realizados de acordo com a metodologia de Kunova *et al.* (2016), onde em um lado da placa de Petri contendo meio de cultura BDA foram

inoculados os isolados de *Streptomyces* spp. (uma estria a 1,5 cm da borda da placa) e, após 24 horas, no lado oposto, foi inoculado o fungo fitopatogênico (Figura 2). Para o controle negativo, as placas foram inoculadas apenas com o fungo fitopatogênico. As culturas foram incubadas a 25 °C. O teste foi feito com todos os fitopatógenos em estudo, com três repetições biológicas.

A porcentagem da inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos (IC) foi calculada aplicando a fórmula:

$$IC = [(C-T) / C] \times 100$$

Onde:

- C é o crescimento micelial do controle
- T é o crescimento micelial nos tratamentos.

O crescimento micelial do fitopatógeno foi medido quando a colônia da placa controle atingiu 3 cm de raio. Os valores foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

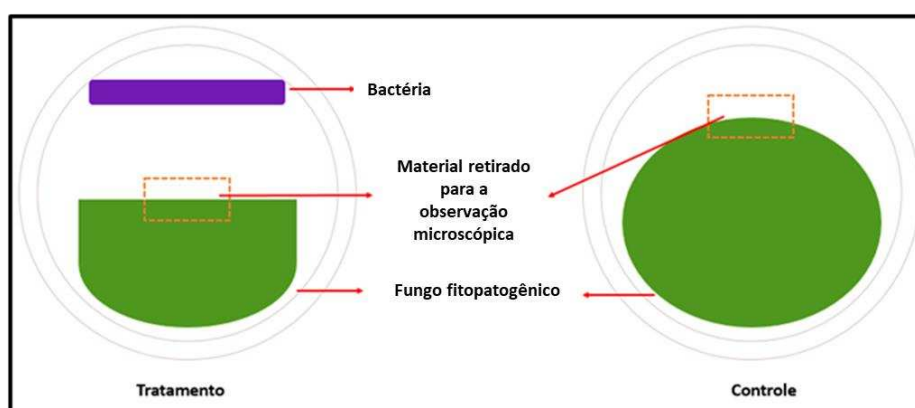


Figura 2. Esquema da organização do experimento de cultura pareada de *Streptomyces* spp. e do fungo fitopatogênico. São mostradas também (retângulos pontilhados em vermelho) as regiões da colônia que foram retiradas para a observação microscópica.

2.3.3.1 Análise microscópica das hifas dos fungos fitopatogênicos

Quando a colônia do fitopatógeno atingiu 3 cm de raio nas placas de Petri do controle, foi retirado um bloco de meio de cultura da região das pontas das hifas das placas de Petri dos tratamentos, de acordo com a Figura 2. O excesso de meio de cultura foi retirado e o micélio foi colocado sobre uma lâmina. Em seguida, foi adicionada uma gota de água sobre o material coletado e colocada cuidadosamente uma lamínula. As hifas foram observadas sob microscópio de luz (Nikon Eclipse E600) com aumentos de 40 e 100X e fotografadas.

2.3.4. Avaliação do antagonismo bacteriano via produção de compostos voláteis *in vitro*

A inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos via produção de compostos voláteis foi avaliada usando o método de duas placas de Petri face a face (YANG *et al.*, 2018). Em uma placa de Petri com meio BDA foi inoculado um disco de micélio de 5 mm e na outra placa com meio GYM foi inoculada a bactéria. As tampas das placas foram retiradas e com cuidado as duas placas foram juntadas face a face, posteriormente sendo hermeticamente vedadas com Parafilm e incubada a 25 °C por cinco dias (Figura 3). Para o controle negativo foi realizada o mesmo procedimento, mas foi inoculado somente o fungo. A inibição do crescimento micelial do fitopatógeno foi medido quando a colônia da placa controle atingiu 2 cm de raio. O cálculo de inibição foi realizado como descrito no item 2.3.3. O experimento foi conduzido com três repetições biológicas e o ensaio foi repetido três vezes.

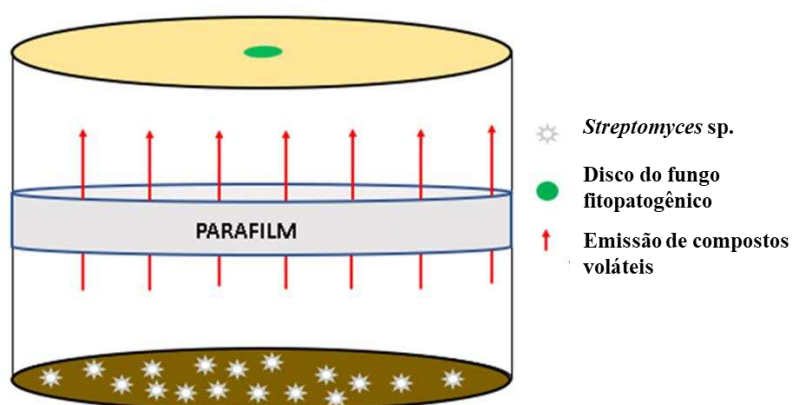


Figura 3. Método de duas placas de Petri invertidas face a face. Os meios de cultura usados foram meio GYM para *Streptomyces* spp. e meio BDA para fungos fitopatogênicos. Fonte: YANG *et al.* (2018).

2.4. Avaliação do potencial antagônico de *Streptomyces* spp. por meio de testes *in vivo*

Sementes do feijão (*P. vulgaris* L.), variedade Pérola, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 0,5% por 5 minutos, e lavadas em água destilada esterilizada. Para a pré-germinação, as sementes foram colocadas em placa Petri contendo disco de papel filtro umedecido, que foi coberta com papel alumínio, e incubada a 25 °C por três dias. Para o tratamento, as sementes pré-germinadas foram colocadas em copos pequenos (volume de 25 mL) e posteriormente foram adicionados 2 mL da suspensão bacteriana (10^6 esporos mL⁻¹); para os controles (não tratadas) foram adicionados 2 mL de água destilada estéril as sementes pré-germinadas, sendo estas incubadas por 2-3 horas a 25 °C.

Em vasos de plástico com dimensões de 7,5 x 10,7 cm foram adicionados 500 g do substrato Topstrato®, em seguida foram colocadas as sementes pré-germinadas tratadas e não tratadas, e cultivadas na casa de vegetação. Depois de dez dias de crescimento da planta (2 folhas verdadeiras, estágio V2), foi inoculado o fungo de acordo com cada experimento para cada fitopatógeno.

Para os testes com *S. sclerotiorum* foram feitos 4 tratamentos x 10 repetições biológicas e 3 repetições experimentais. Os tratamentos foram os seguintes: a e b) as sementes foram embebidas em água destilada estéril (a, controle positivo e b, controle negativo); c e d) as sementes foram embebidas em suspensão de *Streptomyces* spp. 10^6 esporos mL⁻¹ (c, isolado 4L e d, isolado 6O). Depois de dez dias de crescimento, nos tratamentos a, c e d foi colocado um disco de micélio fúngico em cada folha do feijoeiro e as plantas foram transferidas para a casa de apoio, onde permaneceram em ausência de luz e presença de umidade. Após a inoculação, foi avaliado o progresso da doença diariamente por meio dos valores segundo a escala de notas descrita por Tolêdo-Souza e Costa (2003), que se baseia, principalmente, na intensidade e comprimento da lesão, em que: 1 = nenhum sintoma visível; 2 = lesão circular começando a se desenvolver; 3 = lesão até 1,0 cm de comprimento; 4 = lesões entre 1,0 e 1,5 cm; 5 = lesões maiores que 1,5 cm; 6 = lesões no pedúnculo e presença de micélio e murcha em uma das folhas; 7 = lesões no pedúnculo e presença de micélio e murcha em ambas as folhas; 8 = sintomas de murcha geral; 9 = planta morta.

Para *C. lindemuthianum* foram feitos 4 tratamentos x 10 repetições biológicas e 3 repetições experimentais. Os tratamentos foram os seguintes: a) plantas que

tiveram as sementes previamente tratadas com as bactérias receberam a suspensão aquosa com 10^6 conídios mL^{-1} , mediante aspersão nas folhas; b) plantas não tratadas com as bactérias receberam a suspensão aquosa com 10^6 conídios mL^{-1} , mediante aspersão nas folhas (controle positivo); c) plantas não tratadas com as bactérias receberam água destilada estéril na parte aérea mediante aspersão (controle negativo). Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas em câmara de crescimento na ausência de luz (escuro), e após esse período, foram transferidas para bancadas da casa de vegetação. A avaliação da supressão da antracnose foi feita após cinco ou sete dias da inoculação do fitopatógeno. As folhas lesionadas foram escaneadas e a área foliar foi quantificada por meio do programa Quant V.1.0 (VALE *et al.*, 2001). A severidade da doença foi expressa em percentagem de área lesionada.

Para *R. solani*, foram feitos 4 tratamentos x 10 repetições biológicas e 3 repetições experimentais. Os tratamentos foram os seguintes: a) inoculação de um disco do micélio do fungo na base do caule das plantas que haviam sido tratadas com as bactérias há dez dias; b) inoculação de um disco do micélio do fungo na base do caule das plantas não tratadas com as bactérias (controle positivo); c) plantas sem tratamento (controle negativo). Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas em câmara de crescimento na ausência de luz (escuro) e após esse período foram distribuídas em bancadas da casa de vegetação. A avaliação do tombamento foi feita após 10-15 dias da inoculação do fitopatógeno. Após a inoculação, foi avaliado o progresso da doença diariamente, por meio do registro dos valores segundo escala de notas descrita por Goulart (2018), que se baseia, principalmente, na intensidade e comprimento da lesão, em que: 0 = plantas saudias; 1 = intensidade leve, apenas uma lesão no hipocótilo, coloração marrom-avermelhada, alongada (menor ou igual a 0,5 cm); 2 = intensidade moderada, lesões alongadas medindo entre 0,5 e 2 cm, isoladas ou coalescidas, coloração marrom-avermelhada presentes no hipocótilo e/ou no sistema radicular; 3 = intensidade severa, lesão alongada e extensa (maior que 2cm), deprimida e com constrição, coloração marrom-avermelhada, abrangendo o hipocótilo e o sistema radicular.

Os valores foram submetidos a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Com os dados da severidade foi calculado o índice de doença (ID) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os valores foram submetidos a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Formula para o cálculo do AACPD

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(Y_{i+1} + Y_i)}{2} \right] [X_{i+1} + X_i]$$

Sendo:

- Y_i : Severidade da doença (nota por parcela em %) na i -ésima observação;
- Y_{i+1} : Severidade da doença na época da avaliação $i+1$;
- X_i : tempo (dias) na i -ésima observação;
- X_{i+1} : época da avaliação $i+1$;
- n : número total de observações.

2.5. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*

2.5.1. Produção de amônia

Uma suspensão de esporos bacterianos (10^6 esporos mL^{-1}) foi inoculada em uma solução de peptona 1% e incubada a 28 °C por sete dias com agitação a 120 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 9.300 g por 5 minutos e 0,5 mL do sobrenadante foi misturado com 0,5 mL de reagente Nessler. O surgimento de coloração amarela para marrom demonstrou resultado positivo para a produção de amônia (CAPPUCCINO e SHERMAN, 2014).

2.5.2. Fixação biológica de nitrogênio

O meio usado para o teste de fixação biológica de nitrogênio foi o meio semissólido NFb, ao qual para um volume de 1 L foram adicionados 4 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA-1,64%) e 2 mL de solução azul bromotimol (0,5%), sendo misturados manualmente e adicionados em tubos de ensaio em volume de 10 mL da solução (BODDEY e DOBEREINER, 1995). Os isolados foram inoculados pelo

método de picagem e os tubos foram incubados por 7-8 dias a 28 °C. Os isolados que mudaram a cor do meio NFb de verde para azul e formaram um halo na superfície do meio foram considerados como positivo para fixação de nitrogênio.

2.5.3. Solubilização de fosfato inorgânico

Os isolados foram inoculados no centro de placas de Petri com National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) e depois incubados por sete dias a 28 °C. A formação do halo transparente ao redor da colônia da bactéria, foi considerada como resultado positivo para solubilização de fosfato (NAUTIYAL, 1999).

2.5.4. Produção de Ácido 3-indol-acético (AIA)

Foi realizado o método descrito por Tang e Bonner (1948). Uma suspensão de esporos bacterianos (10^6 esporos mL⁻¹) foi inoculada em 10 mL de Caldo Triptona Soja (TBS), suplementado com triptofano (5 mM). Em seguida, as culturas foram incubadas por sete dias a 28 °C e depois centrifugadas a 9.300 g por 5 minutos, na qual uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi misturada com 1 mL do reagente de Salkowski. Os isolados que mudaram de coloração para rosa foram considerados positivos para a produção de AIA (BANO e MUSARRAT, 2003).

2.5.5. Produção de sideróforos

Os isolados foram cultivados em ágar nutriente e incubados a 28 °C por cinco dias. Depois desse período, foram adicionados 10 mL da solução de ágar chrome azurol S (CAS) ($60,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CAS, $72,9 \text{ mg L}^{-1}$ de brometo de hexadeciltrimetilamônio, $30,24 \text{ g L}^{-1}$ de piperazina-1,4-bis (2-ácido etanossulfônico), 10 mL L^{-1} de 1 mM FeCl₃. 6H₂O em 10 mM HCl e ágar bacteriológico 0,9% p/v). Em seguida, a cultura foi incubada a 28 °C por 24 horas e os isolados em que houve formação do halo cor amarela ao redor das colônias foram considerados positivos para a produção de sideróforos (VAN BERGELJK *et al.*, 2022).

2.6. Detecção de plasmídeos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Para a detecção de plasmídeos foi utilizado o protocolo descrito por Novakova *et al.* (2013) com modificações. Os isolados de *Streptomyces* spp. foram cultivados em meio de CGGM (para 100 mL do meio: casamino-ácido 2,4 g; glicose 0,5 g; glicina 0,5% e MgCl₂ 4 mM), a 28 °C, por 24 e 72 horas com agitação constante. Adicionou-se 2 mL da cultura a um tubo de 1,5 mL e foi realizado uma centrifugação por 5 minutos a 800 *g*. Depois o sobrenadante foi descartado e 0,25 g das células foram transferidas para outro tubo de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL de EDTA 100 mM e as células foram incubadas em banho-maria a 75 °C por 10 minutos. Posteriormente, se acrescentou 500 µL de agarose 2% Low Gelling Temperature Agarose Type VII (Sigma-Aldrich) constituída de 0,2 g de agarose em 10 mL de *Isolation Buffer* (20 mM HEPES, 100 mM NaCl e 200 mM EDTA pH 8,0). A mistura foi mantida a 50°C durante 5 minutos e depois depositada em moldes (para formação dos *plugs*) fornecidos pelo fabricante (Bio Rad) e colocada para solidificar a temperatura ambiente. Os *plugs* foram mantidos em EDTA 50 mM e armazenados a 4°C até a etapa de lise celular.

Cinco *plugs* foram transferidos para tubos contendo 5 mL de tampão lizosima (10 mg mL⁻¹ em *Isolation Buffer*), e incubadas em banho-maria por 6 horas a 37 °C. A solução de lizosima foi removida e foram adicionados 5 mL da solução com proteinase K (200 µg mL⁻¹) preparada em NDS (50 mM EDTA pH 8,0; 10 mM de Tris-HCl pH 9,0 e 1% sarcosil), e o tubo foi incubado por 24 horas a 50 °C. Após esse período de lise foram realizadas duas lavagens dos *plugs* com EDTA 50 mM mais sarcosil 1% por um tempo de 30 minutos para cada lavagem. Os *plugs* foram armazenados em EDTA 50 mM a 4 °C. Para a detecção de plasmídeos lineares, a corrida foi realizada no CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems (Bio Rad) em tampão TBE 0,5X (MANIATIS *et al.*, 1982) a 14 °C durante 16 horas. Os parâmetros da corrida foram: 5 V/cm; temperatura, 14 °C; *initial switch*, 5 s; *final switch*, 40 s; tempo, 16 horas (McDOUGAL *et al.*, 2003). Depois da corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 1,5 µg/ml por 1 hora e lavado em água destilada durante 45 minutos. Os plasmídeos foram observados por exposição do gel a luz ultravioleta e foi realizada a fotodocumentação.

2.7. Avaliação da promoção de crescimento vegetal

Sementes do feijão (*P. vulgaris* L.) foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 0,5% por 5 minutos, e lavadas em água destilada estéril. Para a pré-germinação as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido, cobertas com papel alumínio e incubadas a 25 °C por três dias. Para o tratamento as sementes pré-germinadas foram colocadas em copos pequenos (volume de 25 mL), onde foram adicionados 2 mL da suspensão de esporos bacterianos (10^6 esporos mL⁻¹) e foram incubadas a 25 °C por 2-3 horas. As plântulas para o controle foram imersas em água destilada esterilizada. As plântulas foram semeadas em vasos (capacidade de 2 kg) contendo 2 kg do solo mais 200 g de substrato Topstrato® e irrigadas para manter 60% da capacidade da retenção de água. Após 45 dias, as plantas foram avaliadas quanto ao tamanho da parte aérea, tamanho da raiz, número de folhas, peso fresco e peso seco. As medições foram realizadas com auxílio de régua e a parte aérea foi medida a partir da base do caule. A parte aérea e a raiz foram cortadas em pedaços menores e pesados com auxílio de balança de precisão. Em seguida, para o peso da biomassa seca, a parte aérea e a raiz foram colocadas em sacos de papel e mantidos em estufa para secagem e pesados. Foram realizados 3 tratamentos e 10 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento e caracterização morfológica e fisiológica de *Streptomyces* spp.

Os resultados mostraram que os isolados de *Streptomyces* spp. 4L e 6O (Figura 4) ao crescer em meio sólido ISP2 apresentaram cadeia longa com mais de 5 esporos, sendo que no isolado 4L, os arranjos foram em espirais (Figura 4A), enquanto para o isolado 6O, as cadeias de esporos apresentaram-se como ganchos abertos (Figura 4B). Esses arranjos são característicos desse gênero e classificados na seção de *retinaculum* (SHIRLING e GOTTLIEB, 1968). A morfologia desses isolados é similar à de *Streptomyces* sp. SP5, que contém cadeias de esporos flexuosas com ganchos, entre 20 a 30 esporos por cadeia (DEVI *et al.*, 2022), e de *Streptomyces oryzae* S16-07, que também apresentou cadeias de esporos com alças abertas, espirais e/ou ganchos com mais de 10 esporos por cadeia (MINGMA *et al.*, 2015).

Outra característica morfológica interessante a se avaliar é a produção de pigmentos melanóides (BARKA *et al.*, 2015). Os isolados de *Streptomyces* spp. apresentaram diferenças fenotípicas quando foram cultivados em meios de cultura diferentes. Ambos os isolados apresentaram cor branca do micélio aéreo e vegetativo, quando foi inoculado em meio ISP9. Além disso, os isolados não formaram esporos, sendo que o isolado 4L apresentou hifas muito finas sem esporos. No entanto, quando cultivados nos meios GYM, ISP2 e BDA, a cor do micélio aéreo e vegetativo do isolado 6O foi cinza-branco, e a do isolado 4L foi branco. Para Manhas *et al.* (2023) as cores de micélio vegetativo de *Streptomyces justiciae* cepa RA-WS2 variou quando foi cultivado em diferentes meios de cultura, sendo marrom em ISP1, ISP2, ISP5, ISP6 e ISP7 e citrino e amarelo claro em ISP3 e ISP4, respectivamente. As cores do micélio aéreo e vegetativo de *Streptomyces* spp. variam de acordo com os diferentes meios de cultura, pH, fontes de carbono, salinidade, entre outros.

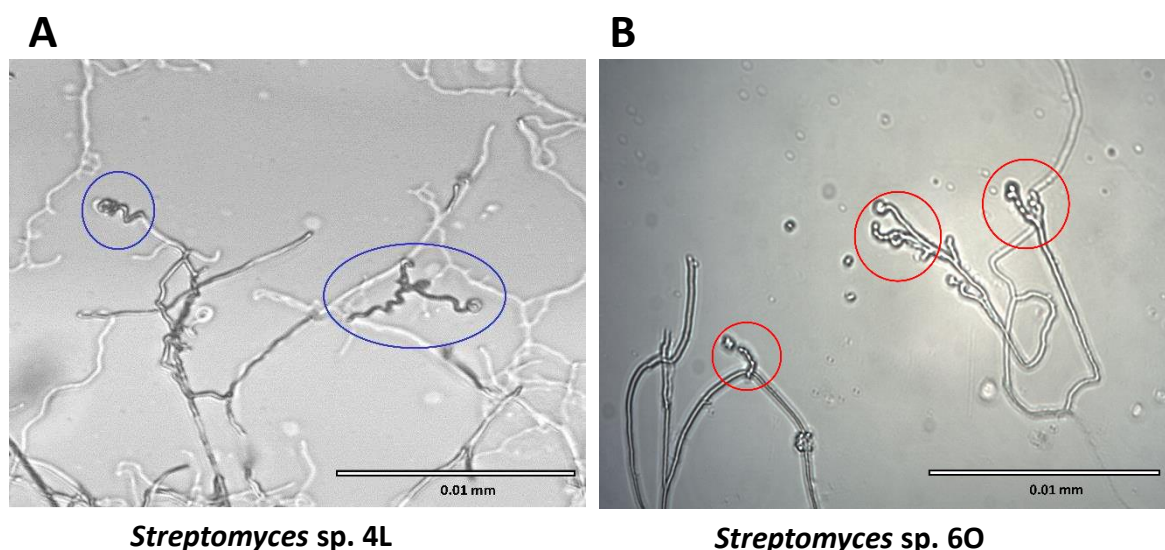


Figura 4. Morfologia de *Streptomyces* spp. A) Microcultivo de *Streptomyces* sp. 4L - cadeias de esporos de hifas aéreas em espirais (círculo azul); B) Microcultivo de *Streptomyces* sp. 6O - cadeia de esporos com ganchos abertos (círculo vermelho); observados sob microscópio de luz (Nikon Eclipse E600).

Os isolados de *Streptomyces* spp. 4L e 6O foram cultivados em meio ISP9 com diferentes concentrações de fontes de carbono (Figura 5). Segundo a avaliação qualitativa, o isolado 6O apresentou maior crescimento nos meios suplementados com amido, manitol, galactose, inositol, sacarose e xilose (Figura 5B). Além disso, esse isolado cresceu até em diluições de 10^{-3} . O isolado 4L mostrou o mesmo comportamento, exceto em xilose e sacarose (Figura 5A), onde o crescimento foi até a diluições de 10^{-1} . Nos meios com amido e manitol seu crescimento foi até a diluição 10^{-3} e para galactose e inositol foi até a diluição 10^{-2} . Infere-se que o isolado 4L precisa de maior quantidade de esporos para seu crescimento, além das fontes de carbono. No entanto, para o isolado 6O, houve o crescimento em quantidades menores de esporos. Boumehira *et al.* (2022) isolaram cepas de *Streptomyces* spp. do solo no deserto argelino do Saara, no qual o isolado *Streptomyces* sp. ADR1 foi capaz de usar as seguintes fontes de carbono: D-glicose, D-xilose, L-ramnose, L-arabinose, D-frutose, D-manitol, glicerol, D-sacarose, D-melibiose, quitina e pectina.

Por outro lado, para a os meios contendo glicose, houve crescimento dos isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O, mas não se observou esporulação (Figura 5A e B), isso pode ter ocorrido devido ao fato que a glicose reprime a diferenciação

morfológica e a produção de antibióticos. Em presença de diferentes fontes de carbono, *Streptomyces* spp. metabolizam primeiro a glicose e reprimem a transcrição dos genes necessários para a utilização das fontes secundárias de carbono e esse processo é denominado como repressão catabólica de carbono (CCR). Assim o metabolismo da segunda fonte de carbono só é ativado quando a glicose é esgotada, relacionando-se com o início da produção de antibióticos e esporulação (ROMERO-RODRIGUES *et al.*, 2018). Esse efeito de repressão pela glicose foi observado em outras espécies de *Streptomyces* como *S. albidoflavus* (KANG e LEE 1997), *S. griseus* (SEO *et al.*, 2002) e *S. coelicolor* (COLSON *et al.*, 2008).



Figura 5. Cultivo de isolados de *Streptomyces* sp. 4L (A) e 6O (B) em meio de cultura ISP9 com diferentes fontes de carbono e diferentes quantidades de inóculo em diluições seriadas.

Os isolados de *Streptomyces* spp. foram avaliados qualitativamente quanto a capacidade de crescer em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl). Eles apresentaram uma diminuição do crescimento à medida que a concentração de NaCl foi aumentada (tabela 2). O isolado 4L tolerou a concentração de NaCl de 2%, sendo o melhor crescimento a 1% de NaCl (Figura 6A). Por outro lado, o isolado 6O tolerou até 6% de NaCl, mas seu crescimento foi menor em concentrações de 8 e 10% (Figura 6B).

Na avaliação do crescimento dos isolados em diferentes valores de pH, observou-se (Figura 6 C e D) que o isolado 4L teve crescimento limitado no pH 4, 10, 11 e 12, mas o crescimento foi melhor no pH 5, 6, 7, 8 e 9. Por outro lado, o comportamento do isolado 6O foi diferente, tolerando o meio ácido (pH 4, 5 e 6), neutro (pH 7) e alcalino (pH 8, 9, 10, 11 e 12). Na tabela 2, é apresentado o resumo dos resultados de crescimento em diferentes concentrações de NaCl, ressaltando-se os níveis de crescimento das colônias de *Streptomyces* spp. nessas condições.

Os fatores ambientais como o pH e a concentração de sal também influenciam o crescimento e as características morfológicas. Avaliar a influência desses fatores ambientais ajuda a selecionar cepas com capacidade de crescer em ambientes estressantes.

Tabela 2. Crescimento de *Streptomyces* sp. 4L e 6O em diferentes concentrações de NaCl e valores de pH.

Salinidade (% NaCl)	4L	6O		Valor de pH	4L	6O
0	++	+++		4,0	+	+
1	++	+++		5,0	+++	+++
2	+	+++		6,0	+++	+++
4	-	++		7,0	++	+++
5	-	++		8,0	++	+++
6	-	++		9,0	++	+++
8	-	-		10,0	+	+++
10	-	-		11,0	+	++
12	-	-		12,0	+	++
13	-	-				

(+) crescimento em nível normal, (++) crescimento em nível médio, (+++) crescimento em nível alto,
(-) não houve crescimento

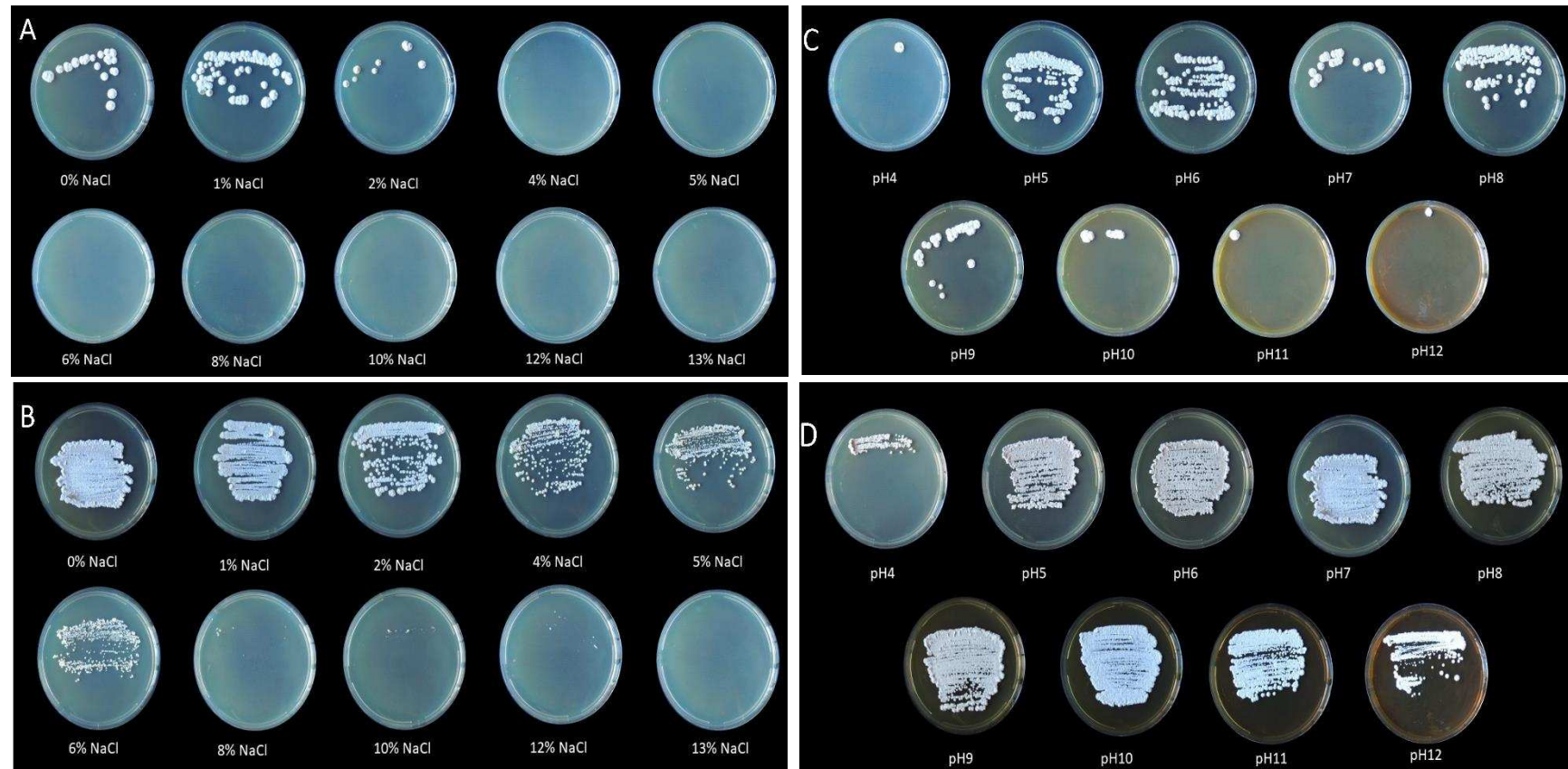


Figura 6. Crescimento de *Streptomyces* sp. 4L e 6O em diferentes concentrações de NaCl e valores de pH. A e C) Isolado 4L; B e D) Isolado 6O.

3.2. Avaliação do potencial biotecnológico

3.2.1. Análise de enzimas lignocelulolíticas

Nos ensaios realizados de produção de enzimas, ambos os isolados (4L e 6O) mostraram capacidade para hidrolisar a celulose presente no meio ágar CMC, mediante a produção de celulase extracelular, sendo confirmado pela formação do halo ao redor da colônia (Figura 7), onde o halo observado no isolado 4L teve maior diâmetro (30,27 mm) do que o apresentado pelo isolado 6O (25,27 mm). Diaz-Diaz *et al.* (2022) avaliaram qualitativamente a atividade enzimática de celulases em cepas de *Streptomyces* spp., observando a formação do halo ao redor da colônia, que variou de 36,3 a 90,0 mm. Devido ao resultado observado, o isolado 4L poderia produzir maior quantidade dessa enzima, o que favoreceria na decomposição dos resíduos vegetais presentes no solo, competindo assim com os microrganismos não benéficos. No entanto, é necessária a realização de ensaios quantitativos (dosagem enzimática) para confirmar a maior produção.

Os isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O mostraram a capacidade de hidrolisar a xilana, através da produção da enzima xilanase (Figura 7). O isolado 6O teve maior diâmetro do halo (36,76 mm) que 4L (31,58), havendo diferença estatística entre eles. Shrestha *et al.* (2021) também avaliaram a atividade enzimática de *Streptomyces* spp. isoladas do solo florestal do Canadá, obtendo resultados positivos. Na atualidade os estudos sobre produção de xilanase estão enfocados na aplicação agroindustrial pelo potencial biotecnológico, um deles por exemplo, na bioconversão de resíduos agrícolas e a produção de etanol celulósico (KUMAR *et al.*, 2018; EMBRAPA, 2021). A xilanase é responsável pela hidrólise completa do polissacarídeo linear β -1,4-xilana em compostos mais simples que são constituídos principalmente por xilose, quebrando assim a hemicelulose (POPA *et al.*, 2016).

Também os isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O têm a habilidade de degradar a pectina cítrica do meio de cultura PSMA (Figura 7). O isolado 4L apresentou maior diâmetro (47,94 mm) de halo, que o isolado 6O (36,78 mm) (Figura 7). Mihajlovski *et al.* (2021) também observaram que as cepas *Streptomyces fulvissimus* CKS7 e *S. hydrogenans* YAM1 (HOSSEINI, *et al.*, 2021) foram capazes de crescer em meio que contém pectina, por meio da análise da hidrólise do substrato (formação do halo ao redor das colônias). Analisando os resultados, pode ser inferido

que a pectinase degradou a pectina do meio, um polissacarídeo complexo presente na parede celular da planta, encontrando-se na lamela média e é responsável pela coesão celular (SHRESTHA *et al.*, 2021). A pectinase é importante no processo fitopatológico, na simbiose planta-micróbio e na decomposição de material vegetal, contribuindo assim na ciclagem do carbono (BONNIN e PELLOUX, 2020).

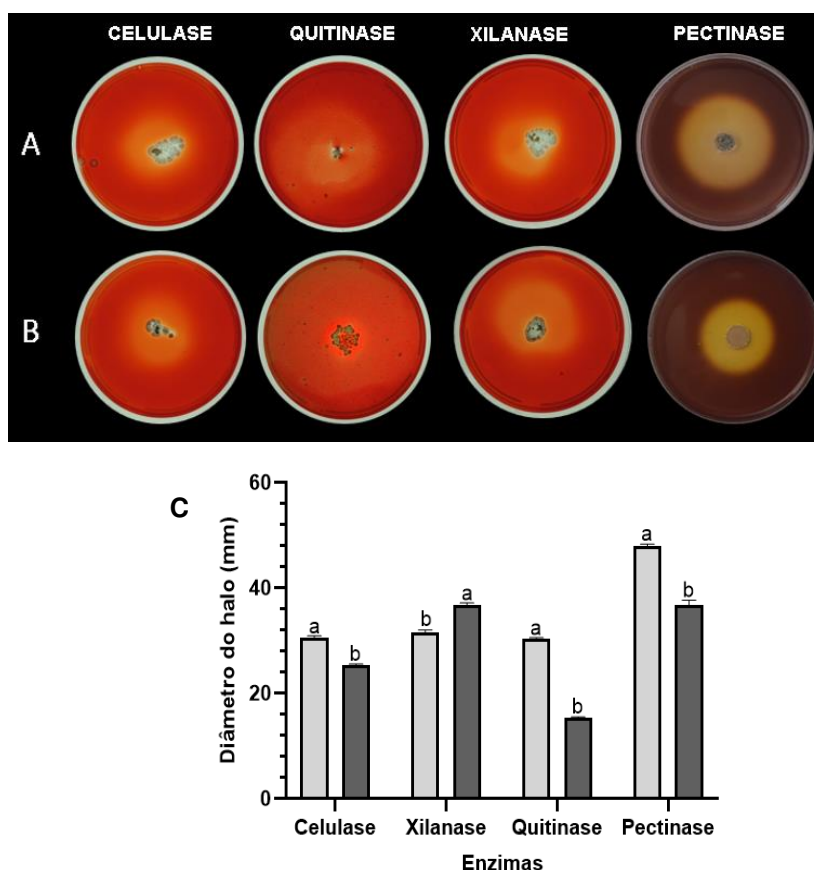


Figura 7. Produção das enzimas lignocelulolíticas celulase, quitinase, xilanase e pectinase pelos isolados de *Streptomyces* sp. 4L (A) e 6O (B). Para celulase, quitinase e xilanase foi usado o corante de revelação vermelho congo (0,014 M) e para a pectinase foi usado a solução iodeto de potássio (50 mM); C) Diâmetro do halo da produção enzimática de *Streptomyces* sp. 4L (barra cinza) e 6O (preto). Letras iguais nas colunas indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A avaliação da produção de quitinase por *Streptomyces* sp. 4L e 6O revelou a formação de halos com diâmetro em 30,30 mm (isolado 4L) e 15,38 mm (isolado 6O) com diferença estatística (Figura 7). A princípio, o isolado 4L tem capacidade de produzir mais quitinase do que o isolado 6O. No entanto, análises quantitativas também devem ser realizadas para confirmar esse resultado. Os resultados estão de acordo com Diaz-Diaz *et al.* (2022), que observaram na cepa de *Streptomyces* sp. CBQ-EBa-5 a formação de um halo de 35,5 mm. Liu *et al.* (2016) também mostraram que *S. hydrogenans* SSD60 e *S. spororaveus* SDL15 tinham forte atividade quitinolítica, desenvolvendo um halo claro ao redor da colônia de 30,35 mm.

Por outro lado, os isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O mostraram produção de β -1,3-glucanase com valores de 8,838 (isolado 6O) e 6,906 (isolado 4L) U mL⁻¹, dados que são similares aos resultados obtidos por Zacky e Ting (2013), que foram 7,96 e 4,95 U mL⁻¹ para *Streptomyces griseus* e por Boukaew *et al.* (2016) que obtiveram 8,86 U mL⁻¹ da atividade enzimática em *Streptomyces philanthi* RM-1-1-38.

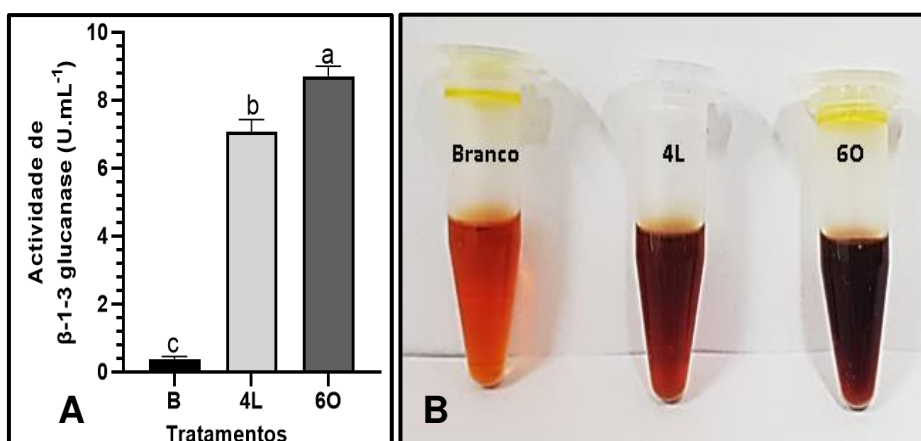


Figura 8. Análise da atividade de β -1,3-glucanase por *Streptomyces* spp. **A)** Isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O. Letras diferentes nas colunas indicam que as médias diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **B)** Imagens dos tubos da reação para detecção da enzima β -1,3-glucanase mostrando diferença de coloração entre o branco (controle) e as amostras.

Streptomyces spp. secretam diversos tipos de enzimas extracelulares que têm aplicações na indústria e nas práticas agrícolas. Algumas dessas enzimas degradam a parede celular de outros microrganismos patogênicos, sendo um mecanismo para o controle biológico de patógenos fúngicos, como a quitinase e β -1,3-glucanase (WU *et al.*, 2018). Além disso, algumas dessas enzimas como as celulases, xilanases e hemiceluloses degradam as paredes celulares das plantas, fornecendo energia e fonte de carbono (glicose e/ou derivados) para o metabolismo e crescimento do microrganismo (HOUFANI *et al.*, 2017; CELAYA-HERRERA *et al.*, 2021).

A enzima extracelular β -1,3-glucanase também é importante para os microrganismos produtores, uma vez que inibe o crescimento dos fitopatogênicos por meio da degradação da parede celular. Esta enzima atua nas ligações de β -1,3 glicosídica (BOUKAEW, 2016; KUSAYKIN *et al.*, 2017) em componentes da parede celular dos fungos.

Streptomyces spp. presentes no solo poderiam cumprir o papel de degradar a pectina da planta morta (por exemplo da matéria orgânica), e secretar outras enzimas como β -1,3-glucanase ou quitinase que afetam a estrutura da parede celular dos fungos, competindo por nutrientes no nicho ecológico. Assim, pode ser concluído que os isolados estudados têm potencial para produzir enzimas extracelulares, possivelmente com as funções descritas acima.

3.2.2. Avaliação do potencial antagônico de *Streptomyces* spp. *in vitro*

Os resultados dos experimentos de cultura dupla demonstraram a atividade antagonista dos isolados de *Streptomyces* spp. 4L e 6O ao inibir o crescimento e degradar as paredes celulares dos micélios dos fitopatógenos, possivelmente pela produção de diferentes compostos antifúngicos e enzimas extracelulares. Na avaliação contra *S. sclerotiorum*, o isolado 4L apresentou porcentagem de inibição maior do que o isolado 6O, 51,32% e 42,25%, respectivamente (Figura 9). A inibição de *S. sclerotiorum* pela presença dos isolados foi observado em microscopia de luz (Figura 9), onde foi possível detectar alterações nas estruturas da parede das hifas deste fungo, sendo que para *Streptomyces* sp. 4L as pontas das hifas apresentaram-se inchadas ou com formato de balões, e para o isolado 6O houve um crescimento descontínuo nas hifas. Os resultados são concordantes com os de Gebily *et al.* (2021), onde *Streptomyces* spp. inibiram significativamente o crescimento micelial do fungo

patogênico *S. sclerotiorum* em comparação com o controle, em que as porcentagens de redução do crescimento de *S. sclerotiorum* variaram entre 52,30 e 60,17%. Neste estudo, observou-se ainda que o tempo de crescimento de *Streptomyces* spp. em meio BDA tem influência na produção de compostos antifúngicos, e assim, para obter maior atividade antagônica a incubação das bactérias deve ser 72 horas antes da inoculação do fungo. Jardim *et al.* (2022) também observaram a capacidade antagônica de *Streptomyces* spp. isoladas do solo no estado de Paraná, frente ao fungo *S. sclerotiorum*. Por outro lado, Yang *et al.* (2022) determinaram que o metabólito secundário wuyiencin de *Streptomyces albulus* CK-15 inibiu o crescimento micelial e a formação de escleródios de *S. sclerotiorum*.

Os isolados de *Streptomyces* spp. 4L e 6O também inibiram o crescimento de *C. lindemuthianum*. O isolado 6O provocou inibição de 68,47%, o que foi significativamente maior do que os 47,11% observado na presença do isolado 4L, havendo diferença estatística entre os resultados (Figura 9). Com o uso da microscopia de luz foi observado o crescimento do micélio fúngico anormal com inchaços (isolado 6O) e deformações na parede celular (isolado 4L e 6O) (Figura 9). Tu (1987) relatou que *Streptomyces griseus* parasitou *C. lindemuthianum* crescendo na superfície de suas hifas gerando deformações nas hifas do fungo, e Gholami *et al.* (2013) demonstraram que *Streptomyces cyaneofuscatus* e *S. flavofuscus* inibiram o crescimento micelial do *C. lindemuthianum* em 75,55 e 79,99%, respectivamente.

No teste da cultura dupla do fungo patogênico *R. solani*, também foi observada o potencial que tem os isolados 4L e 6O para reprimir o crescimento das hifas do fungo, provocando distorções na parede celular das hifas (Figura 9). A atividade de inibição fúngica foi de 38% para ambos os isolados (Figura 9). *Rhizoctonia solani* ao interagir com *Streptomyces microflavus* (isolado nº 5), *S. somaliensis* (isolado G), *S. fulvissimus* (SOLTANI *et al.*, 2022) e *Streptomyces* sp. CQB-EA2 e CD-24 (DIAZ-DIAZ *et al.*, 2022) apresentou distorções na parte apical de suas hifas. Também, Caviedes *et al.* (2021) relataram que *Streptomyces* sp. M2A2 inibiu o crescimento micelial de *R. solani* em 52%.

No teste do antagonismo por meio de COVs, os isolados de *Streptomyces* 4L e 6O também inibiram o crescimento de *C. lindemuthianum* (Figura 11). No entanto, para os fungos *S. sclerotinia* e *R. solani*, não houve antagonismo mediante a produção de COVs (Figura 11). Cordovez *et al.* (2015) relataram que a produção de COVs das cepas de *Streptomyces* sp. W47 e W214 suprimiram o crescimento do *R. solani*, em

um 57 e 41%, respectivamente. Boukaew *et al.* (2021) mostraram também que compostos orgânicos voláteis de *Streptomyces salmonis* PSRDC-09 inibiram *C. gloeosporioides* PSU-03. Diante desses resultados, como perspectivas de próximos trabalhos estão a análise e identificação desses compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e sua aplicabilidade no controle biológico nas culturas importantes no Brasil.

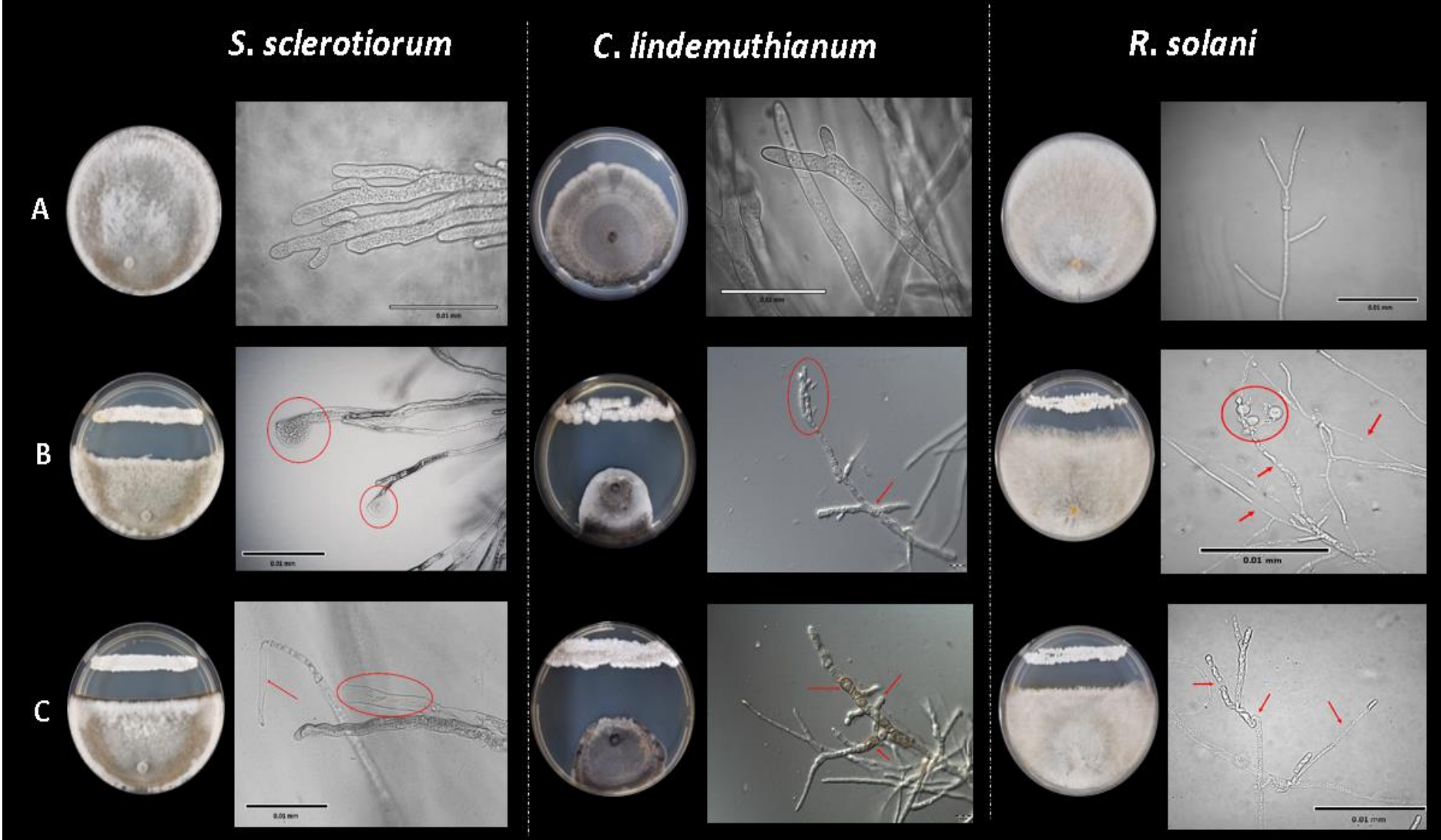


Figura 9. Cultura pareada entre *Streptomyces* sp. 4L e 6O e os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*. As micrografias mostram a morfologia dos micélios fúngicos. Testemunha (A), isolado 4L (B) e isolado 6O (C).

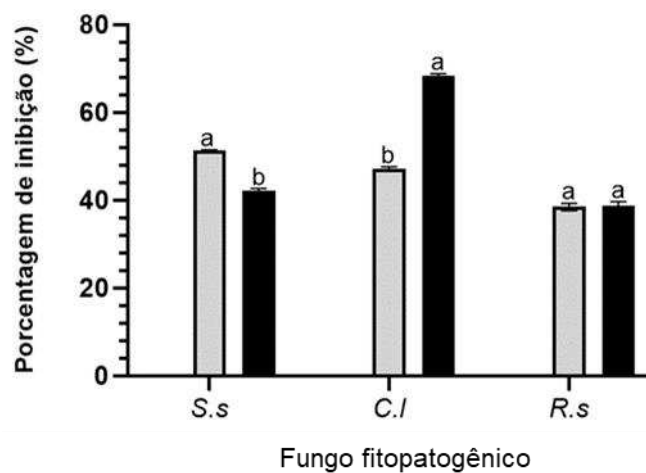


Figura 10. Inibição dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (S.s), *Colletotrichum lindemuthianum* (C.l) e *Rhizoctonia solani* (R.s) por *Streptomyces* sp. 4L (barra cor cinza) e 6O (barra cor preta). Letras iguais nas colunas indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 11. Efeitos de COVs dos isolados de *Streptomyces* spp. no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*. Foram avaliados cinco dias após a inoculação (*Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*) e nove dias (*Colletotrichum lindemuthianum*). A) controle; B) isolado 4L; e C) isolado 6O.

3.3. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro*

3.3.1. Produção de sideróforos, solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA e amônia

Os isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O, avaliados neste trabalho, possuem a capacidade de produzir sideróforos. Nos testes *in vitro* foi demonstrada a presença de sideróforos pela formação de halo de cor laranja ao redor da colônia (Figura 12 A). Os resultados mostraram que o isolado 6O teve maior nível de produção de sideróforos (2,969) que o isolado 4L (1,850) (Figura 12 C), indicando que este isolado deve produzir maior quantidade de sideróforo para sua nutrição e sobrevivência em ambiente onde o teor de ferro é baixo e pouco disponível para os microrganismos e plantas. O isolado 4L formou um halo de diâmetro de 37,61 mm, menor que o identificado para 6O (Figura 12 A). EBRAHIMI-ZARANDI *et al.* (2021) observaram a formação de um halo laranja de diâmetro de 68,12 mm ao redor das colônias dos isolados de *Streptomyces* spp. R7 e F8, que foram classificados como fortes produtores de sideróforos. Por outro lado, Meena *et al.* (2022) observaram que nove isolados de *Streptomyces rameus* GgS têm a capacidade de produzir sideróforos, mas o diâmetro dos halos foi menor, sendo de 11-12 mm. Com isso, pode ser observado que várias cepas do gênero de *Streptomyces* tem habilidade de produzir sideróforos.

O ferro é um dos nutrientes mais abundantes nos solos agrícolas, principalmente na forma de Fe^{+3} (NONGBET *et al.*, 2022), além disso é considerado, elemento essencial para as plantas e também para os microrganismos. Apesar de sua abundância nos solos, o ferro é pouco disponível para os microrganismos (SOARES, 2022). Nos solos a maior parte do ferro se encontra na forma do silicato de Fe e Mg, hidróxidos e óxidos de Fe, sendo formas não assimiláveis pela planta (SINGH *et al.*, 2019). Porém para mitigar e superar a limitação de Fe, os microrganismos produzem os sideróforos, que são agentes quelantes de ferro. Esses compostos são produzidos por microrganismos e plantas que crescem principalmente sob condições de baixo teor de ferro (TERRA *et al.*, 2021).

Bactérias, como as do gênero *Streptomyces* têm a capacidade de produzir sideróforos, usando o ferro para conjugação com antibióticos ou como alvos para restringir o desenvolvimento dos fungos patogênicos por meio do esgotamento do Fe^{+3} no ambiente do solo (HIDER e KONG, 2010). Diante disso, a produção de sideróforo pelos isolados 4L e 6O deve ser aspecto chave para o controle dos

fitopatógenos, ao limitar a disponibilidade desse nutriente para absorção e nutrição do fungo. Pode se inferir que os sideróforos microbianos secretados pelo isolado 6O em condições de deficiência de Fe, permitem o sequestro do Fe ao redor da rizosfera, gerando atividade antagônica ao fungo fitopatogênico pela competição de nutriente (SEBASTIAN *et al.*, 2021).

Outra característica importante que se busca em microrganismos é a capacidade de solubilização de fósforo. Os resultados reforçam que o gênero *Streptomyces* é capaz de solubilizar fosfato. Os isolados 4L e 6O apresentaram halos transparentes ao redor da colônia (Figura 12 B) quando foram cultivados em meio NBRIP que contem $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfato tricálcico). Os halos observados foram maiores no isolado 4L. O mecanismo da solubilização do fosfato triplo de cálcio realizada por esses isolados é a liberação dos ácidos orgânicos, que desestabilizam quimicamente os fosfatos tricálcicos, e as reações ácido-base permitem essa solubilização em fosfatos di e monobásico, que são forma iônicas que podem ser assimiladas por microrganismos e plantas (do NASCIMENTO *et al.*, 2018). Os valores de índice de solubilização para o isolado 4L foi de 3,703 sendo 10% maior que o observado para o isolado 6O, cujo valor foi 2,878 (Figura 12 C), mostrando que o isolado 4L tem maior potencial de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, possivelmente liberando maior quantidade de ácidos orgânicos. Em um estudo sobre caracterização de actinobactérias solubilizadoras de fosfato, Faried *et al.* (2018) encontraram que *Streptomyces* sp. A4 apresentou maior índice de solubilização (4,50), e a cepa A7 foi de 1,57. Levando em consideração os resultados de Faried *et al.* (2018), pode-se inferir que os isolados 4L e 6O estão dentro da faixa do índice de solubilização de fosfato geralmente identificado para este gênero.

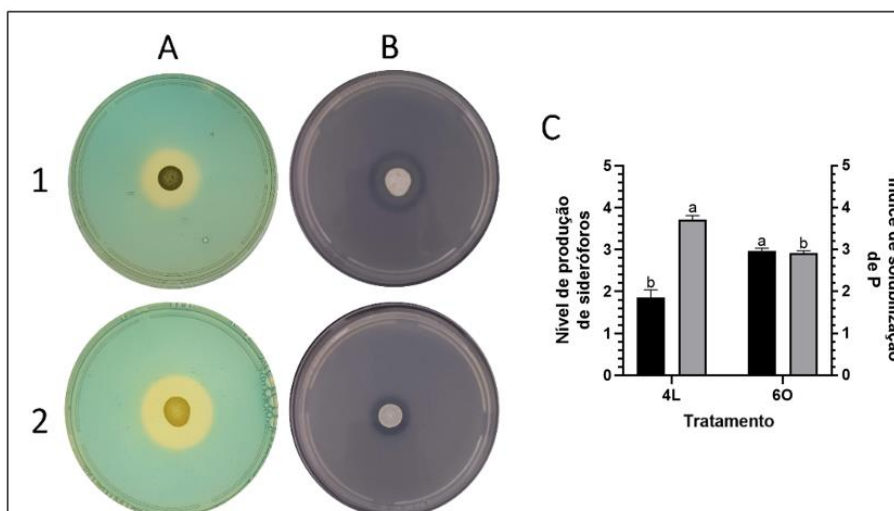


Figura 12. Avaliação da produção de sideróforos (A) e solubilização de fosfato inorgânico (B) pelos isolados de *Streptomyces* sp. 4L (1) e 6O (2). Nível de produção de sideróforos (barra preta) e índice de solubilização de fosfato (barra cinza) (C). Letras iguais nas colunas indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os isolados 4L e 6O se mostraram ainda positivos para o teste de produção de AIA (Figura 13 C). Resultados obtidos com *Streptomyces atroolivaceus* demonstraram que o AIA desencadeia diferenciação celular, alongamento de hifas e esporulação (MATSUKAWA *et al.*, 2007). Esse fitohormônio influencia na divisão, aumento e diferenciação celular da planta, desencadeia a germinação de sementes, controla os processos de crescimento vegetativo, aumenta o desenvolvimento do xilema e das raízes, assim como também afetam a fotossíntese, a formação de pigmentos, a biossíntese de vários metabólitos e a resistência a condições estressantes (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011).

Na presente pesquisa, foi avaliada também a fixação biológica de nitrogênio dos isolados de *Streptomyces* spp. (Figura 13 A), onde 4L e 6O, cresceram em meio semissólido Nfb, como uma fina película branca colocada alguns milímetros abaixo da superfície do meio de cultivo (Figura 13 A). Ngalimat *et al.* (2021) usaram o meio sólido Nfb para avaliar a fixação de nitrogênio por *Streptomyces* sp. TBS5, e observaram halo cor azul (2,4 cm) ao redor da colônia. Com poucas pesquisas sobre a fixação biológica de N por *Streptomyces*, pode ser inferido que esse gênero tem a habilidade de fixar nitrogênio, mas outras pesquisas são necessárias para compreender a rota

metabólica de fixação de N por *Streptomyces* e sua colaboração na absorção de nitrogênio pelas plantas. Além disso, os isolados 4L e 6O também produzem amônia (Figura 13 B), produto primário da fixação biológica de nitrogênio.

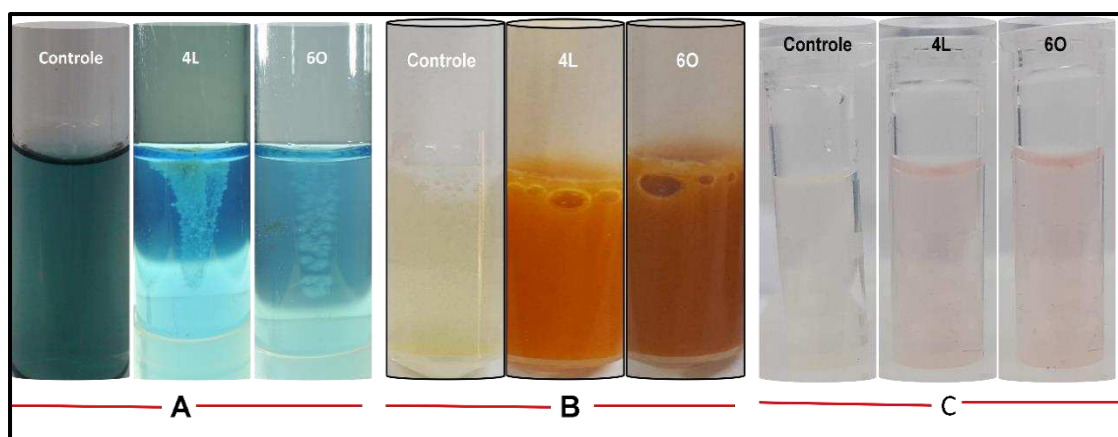


Figura 13. Determinação da fixação biológica de nitrogênio, produção de amônia e de ácido 3-indol-acético (AIA) pelos isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O. A) fixação biológica de nitrogênio. Nos tubos de ensaio onde foram cultivados os isolados, a cor do meio NfB mudou de verde (controle) para azul, indicando um aumento no pH pelo processo de fixação de nitrogênio, além do crescimento das bactérias. B) produção de amônia. Nos tubos de ensaio com os isolados, houve a mudança de coloração amarela (controle) para amarelo acastanhado (4L) e marrom (6O) pela reação com o reagente Nessler e a mudança da cor indica a produção de amônia. C) produção de AIA. A mudança da coloração de branco (controle) para rosa nos tubos com os isolados mostra a produção de AIA.

3.4. Detecção de megaplasmídeos em *Streptomyces* spp. por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Streptomyces spp. contém plasmídeos lineares com tamanho entre 12 e 1700 kb (LIU *et al.*, 2021) que carregam *clusters* de genes biossintéticos para a produção de metabólitos secundários. Como os isolados 4L e 6O produzem compostos com atividade antifúngica e esses compostos estão possivelmente relacionados a *clusters* de genes biossintéticos, que podem estar presentes em plasmídeos, foi realizada a detecção de plasmídeos gigantes nos isolados 4L e 6O empregando PFGE. A detecção de plasmídeos é importante para estudos posteriores visando a compreensão da regulação dos genes envolvidos na biossíntese e a manipulação

genética com o objetivo de aumentar a produção. Neste estudo, a análise em PFGE revelou a presença de plasmídeo nos isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O com tamanho aproximado de 97 Kb (Figura 14). Em estudos genéticos realizados anteriormente com outros isolados do gênero *Streptomyces*, os autores também reportaram a presença de um megaplasmídeo linear (KINASHI *et al.*, 1987; 2011). Cornell *et al.* (2018) demonstraram a presença de megaplasmídeos lineares nas cepas de *Streptomyces* spp. Os plasmídeos encontrados apresentaram tamanhos entre 71 e 200 kb, e carregavam genes potencialmente envolvidos na adaptação ao ambiente extremo, como baixa temperatura (- 37 °C), resistência a antibióticos, metais pesados e salinidade. Gomes-Escribano *et al.* (2021) também identificaram a presença de plasmídeos com tamanho de 158 kb em *S. venezuelae* NRRL B-65442. Além disso, foi reportado em *S. rochei* 7434AN4 a presença de três plasmídeos de 206 kb, 100 kb e 17 kb (KINASHI *et al.*, 1994) e em *S. clavuligerus* ATCC 27064, um plasmídeo de 1800 kb (MEDEMA *et al.*, 2010).

Inicialmente, os isolados 4L e 6O foram cultivados durante 72 horas, de acordo com CORNELL *et al.* (2018), mas não foi possível a detecção de plasmídeos empregando a condição de crescimento descrita. O tempo de cultivo foi então reduzido para 24 horas, como descrito por NOVAKOVA *et al.* (2013), e foi possível detectar a presença de plasmídeo nos dois isolados, indicando que a idade e a quantidade de células utilizadas influenciam na detecção destes, talvez pela lise mais eficiente das células. Estudos futuros serão necessários para a caracterização desses plasmídeos identificados.

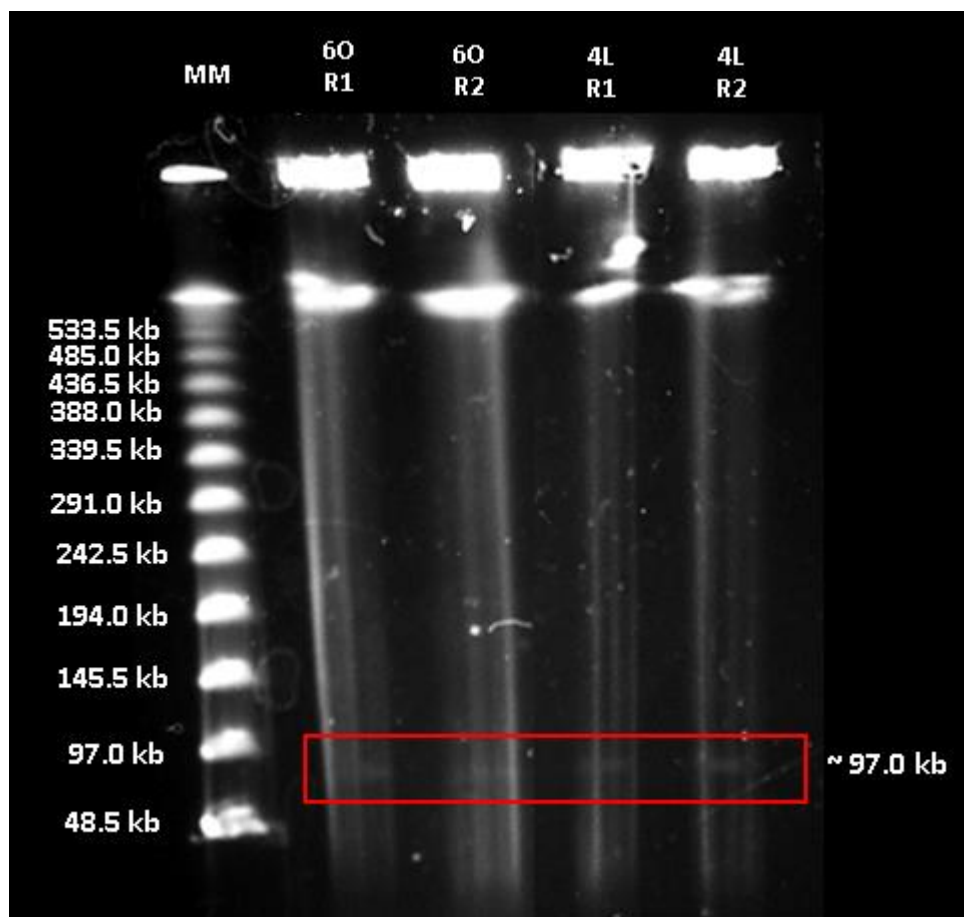


Figura 14. Detecção de plasmídeos em isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O utilizando PFGE. MM = Pulse Marker™ 50-1000 kb de lambda DNA. R1 e R2 = número de repetições. Dentro do retângulo vermelho, são mostradas as bandas de plasmídeo, com um tamanho aproximado de 97 kb.

3.5. Avaliação do controle das doenças por *Streptomyces* spp. por meio de testes *in vivo*

No presente trabalho, os dois isolados estudados mostraram forte atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo branco em plantas do feijão, cujo controle é um desafio para os agricultores. Experimentos em casa de vegetação mostraram que os isolados 4L e 6O têm o potencial para serem usados como agentes de controle biológico altamente eficazes, pela redução de 90% dos sintomas do mofo branco causado por *S. sclerotiorum*, em plantas do feijão da variedade Pérola, em relação ao controle positivo (Figura 15 A). Segundo a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), o fungo atingiu toda a planta não tratada em cinco

dias, no entanto, as plantas tratadas com as bactérias não apresentaram os sintomas da doença (Figura 15 A). Para a maior eficiência do controle do mofo branco, Gebily *et al.* (2021) e Ghanem *et al.* (2022), aplicaram mistura de caldo de cultura (contendo extrato livre de células, micélios e esporos) de três cepas de *Streptomyces* spp. (*S. griseus* MT210913 “DG5”, *S. rochei* MN700192 “DG4” e *S. sampsonii* MN700191 “DG1”), na parte aérea das plantas do feijão 30 dias pós-semeadura, obtendo redução da doença de 92% frente ao uso do fungicida Corporal Max (74,67%), ambos os autores trabalharam com a mesma metodologia, mas em diferentes épocas do ano.

Os experimentos feitos em casa de vegetação mostraram a capacidade dos isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O para controlar a antracnose em feijoeiro. Segundo a escala diagramática feita com o Programa Quant V.1.0, o isolado 4L teve uma porcentagem de severidade de doença de 2,49% e para 6O foi de 2,63% frente ao controle positivo que foi de 41,12%. Entre os tratamentos e o controle positivo houve diferença de 38,49% na severidade (Figura 15 B). Entre os tratamentos não houve diferença significativa estatisticamente. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Gholami *et al.* (2013), em que o isolado *S. acrimycini* reduziu a severidade da antracnose em 40% e os isolados *S. cyaneofuscatus* e *S. flavofuscus* (53,40%) e *S. parvus* (63,40%) também foram eficientes.

Os isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O reduziram a severidade da doença de podridão radicular causada por *R. solani* (Figura 15 C). Segundo a escala de notas, as plantas tratadas com os isolados 4L e 6O tiveram lesão de tipo 1, frente ao controle positivo (lesão tipo 2), que apresentou lesões alongadas e deprimidas, com coloração marrom no hipocótilo e no sistema radicular. Os sintomas que foram observados aos dez dias após a inoculação com o fungo. Segundo os resultados de Diaz-Diaz *et al.* (2022), a máxima redução da doença de *R. solani* foi obtida quando foram combinadas duas cepas de *Streptomyces* spp. (CBQ-EA-2 + CBQ-B-8) em plantas de feijão. Por outro lado, Korayem *et al.* (2022) avaliou a atividade biológica de *S. parvulus* 10d contra *R. solani*, em feijão verde com solo esterilizado e não esterilizado, obtendo resultados do controle maiores que 88%, frente ao tratamento com o produto químico Rhizolex®.

Streptomyces spp. são conhecidos por seu potencial de efeito inibitório sobre o crescimento dos fitopatógenos (*S. sclerotinia*, *C. lindemuthianum*, *R. solani*, entre outros), pela produção de compostos antifúngicos, metabólitos secundários e compostos orgânicos voláteis, pela secreção de enzimas extracelulares como

quitinase, β -1,3-glucanase, celulase, xilanase e pectinase (BOUKHATEM *et al.*, 2022). Neste sentido, *Streptomyces* spp. se tornam uma alternativa viável para a descoberta de compostos antifúngicos para controle de doenças de plantas, por causa da ocorrência e desenvolvimento de resistência a fungicidas em patógenos de plantas.

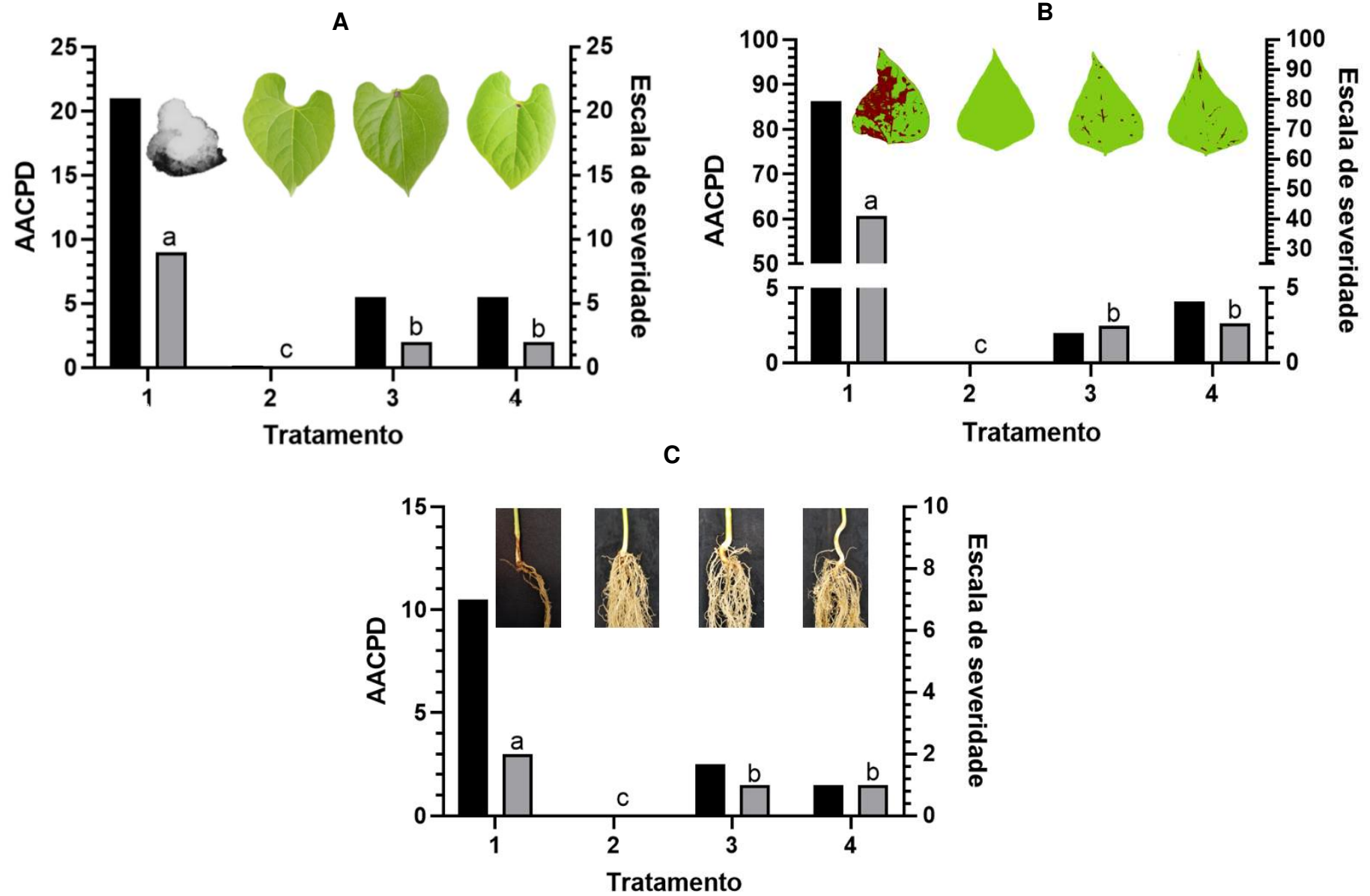


Figura 15. Controle de fungos fitopatogênicos pelos isolados 4L e 6O de *Streptomyces* sp. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e escala de nota de severidade da doença do feijão da variedade Pérola inoculado com os fungos patogênicos: *Sclerotinia sclerotiorum* (A), *Colletotrichum lindemuthianum* (B) e *Rhizoctonia solani* (C). 1) Controle positivo, com inoculação do patógeno; 2) Controle negativo sem a inoculação do patógeno; 3) Tratamento com o isolado *Streptomyces* sp. 4L; 4) Tratamento com o isolado *Streptomyces* sp. 6O. Barras de cor preta representa a AACPD e de cor cinza a escala de severidade. Letras iguais nas colunas indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6. Avaliação da promoção de crescimento em plantas de feijão

Diferentes espécies de *Streptomyces* estabelecem relação benéfica com a planta. Foi avaliada *in vitro* a capacidade dos isolados 4L e 6O de produzirem compostos que promovem o crescimento da planta, como, sideróforos, AIA e amônia; a capacidade de solubilização de fósforo inorgânico e de fixação biológica de N. Em todas as análises os resultados foram positivos. As plantas do feijão que foram tratadas com o isolado 6O tiveram maior crescimento (141,46 cm), que as plantas tratadas com o isolado 4L (135,32 cm), frente ao controle (113,03 cm) (Figura 16). Os resultados de comprimento e biomassa da parte radicular e aérea da planta demonstraram que os isolados 4L e 6O melhoraram todos os parâmetros biométricos da planta. A produção do fitohormônio AIA favorece o alongamento das raízes, melhorando a absorção de nutrientes e água pela planta (EL-TARABILY, 2008). As plantas do feijão tratadas com o isolado 6O tiveram maior comprimento e peso seco da biomassa radicular, 40,67 cm e 1,01 g, do que as plantas tratadas com o isolado 4L, 34,37 cm e 0,88 g, respectivamente (Figura 16 B). Segundo esses dados, é provável que o isolado 6O produza maior quantidade desse fitohormônio do que o isolado 4L. Estudos realizados em plantas de soja apresentaram o mesmo resultado positivo utilizando *Streptomyces* sp. CLV45, pelo fato de produzir maior quantidade de AIA, de ácido giberélico e de ácido abscísico (HORSTMANN *et al.*, 2020). Além do AIA, pode ser deduzido que o fosfato disponível solubilizado por *Streptomyces* sp. e a produção de sideróforos também afetaram o crescimento da planta, uma vez que o isolado 4L solubilizou fosfato inorgânico significativamente melhor do que o isolado

6O (*in vitro*). Esses resultados demonstram que os dois isolados apresentam características diferentes e que deverão ser investigadas futuramente.

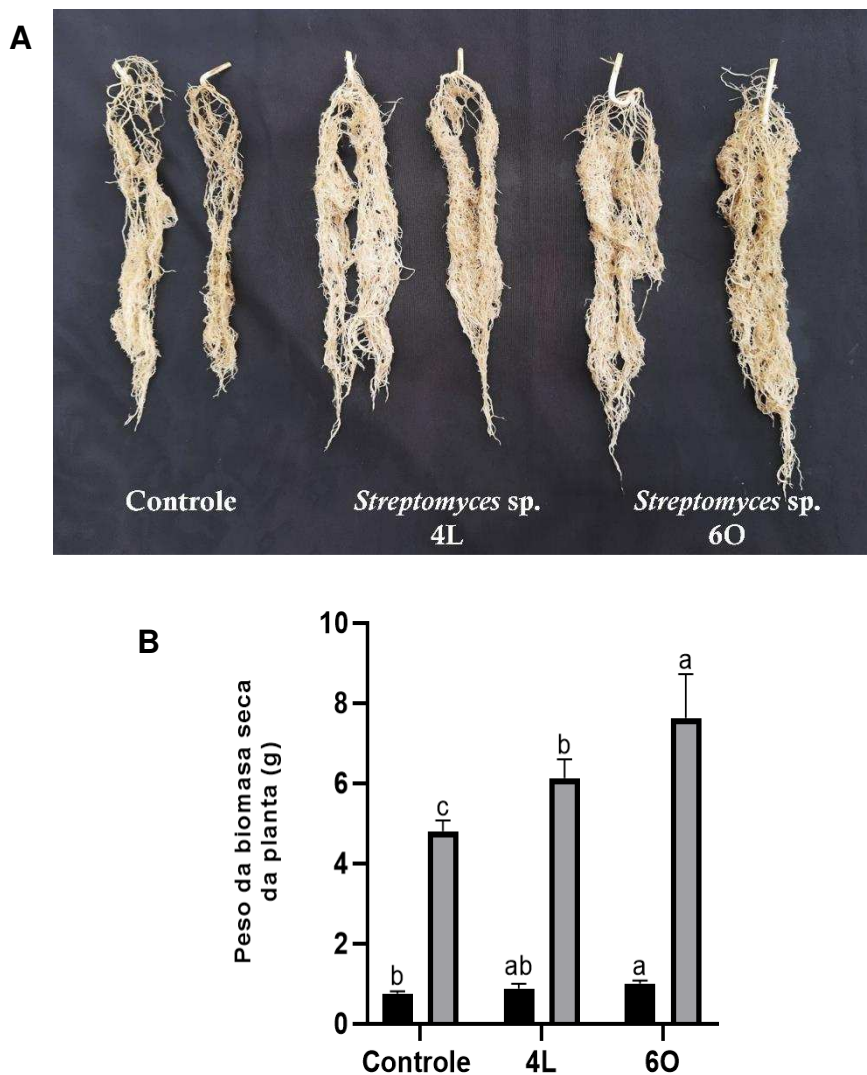


Figura 16. Promoção de crescimento vegetal pelos isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O. As sementes do feijão foram tratadas com os isolados 4L e 6O, exceto as sementes utilizadas como controle. A) Comprimento da raiz do feijão e B) peso da biomassa seca da raiz (barra preto) e parte aérea (barra cinza). Letras iguais nas colunas indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

Em relação aos isolados de *Streptomyces* sp. 4L e 6O, pode ser concluído que:

- Quando cultivados em meio ISP2 apresentam arranjos característicos deste gênero, como cadeias de esporos das hifas aéreas em forma de espirais para o isolado 4L e cadeia de esporos com ganchos abertos para o isolado 6O. O número de esporos foi maior do que 10 por cadeia em ambos os isolados.
- O crescimento e a esporulação dependem do teor de nutrientes, da fonte de carbono, do valor de pH e da concentração de NaCl.
- Podem utilizar fontes de carbono como amido, manitol, galactose e inositol para seu crescimento. Além disso, o isolado 4L tolera baixas concentrações de sais (1% de NaCl) e o isolado 6O é capaz de suportar até 6% de NaCl.
- Podem ser cultivados em meio de cultura com valores de pH entre 5 e 8.
- Produzem as enzimas extracelulares celulase, xilanase, pectinase, quitinase e β -1,3-glucanase.
- Inibem o crescimento de *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e *R. solani* e provocam a deformação da parede celular das hifas destes fungos.
- Produzem compostos que podem contribuir para o desenvolvimento das plantas, como AIA e sideróforos, além de serem capazes de solubilizar fosfato.
- Provocam o aumento do comprimento e da biomassa da raiz e da parte aérea das plantas do feijão e por causa disso, apresentam potencial para utilização como biofertilizantes.
- São capazes de provocar a redução dos sintomas de doenças causadas por *S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e *R. solani*, possivelmente devido a indução de resistência sistêmica.
- Possuem pelo menos um plasmídeo linear com tamanho próximo a 97 kb.

5. REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.; GROGAN, R. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, p. 899-904, 1979.
- ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M.; OTHMAN, S. I. Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, v. 8, p. 470, 2020.
- ALAM, K.; MAZUMDER, A.; SIKDAR, S.; ZHAO, Y. M.; HAO, J.; SONG, C.; WANG, Y.; SARKAR, R.; ISLAM, S.; ZHANG, Y.; LI, A. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v.13, 2022.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 971, 2017.
- AMADI, O. C.; AWODIRAN, I. P.; MONEKE, A. N.; NWAGU, T. N.; EGONG, J. E.; CHUKWU, G. C. Concurrent production of cellulase, xylanase, pectinase and immobilization by combined cross-linked enzyme aggregate strategy-advancing tri-enzyme biocatalysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, 101019, 2022.
- ANDAM, C.P.; DOROGHAZI, J. R.; CAMPBELL, A. N.; KELLY, P. J.; CHOUDOIR, M. J.; BUCKLEY, D. H. A. Latitudinal diversity gradient in terrestrial bacteria of the genus *Streptomyces*. **American Society for Microbiology Journals**, v. 7, n. 2, p. 10, 1128/mbio. 02200-15, 2016.
- ARAÚJO, E. Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Saa E Magn) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes. 1988. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 1988.
- ARFAOUI, A.; HADRAMI, A. E.; DAAYF, F. Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 122, p. 121–128, 2018.
- BANO, N.; MUSARRAT, J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. **Current Microbiology**, v. 46, p. 0324-0328, 2003.
- BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, H. P.; CLEMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 1 - 43, 2016.
- BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 1– 43, 2015.
- BERGEY, D. H.; HOLT, J.G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1994.

BERLEMONT, R.; MARTINY, A. C. Phylogenetic Distribution of Potential Cellulases in Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1545–1554, 2013.

BHARATHIRAJA, S.; SURIYA, J.; KRISHNAN, M.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. **Advances in Food and Nutrition Research, Academic press**, p. 125 – 148, 2017.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 208-215, 2005.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer research*, v. 42, p. 241 - 250, 1995.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BONNIN, E.; PELLOUX, J. Pectin Degrading Enzymes. In: Kontogiorgos, V. (eds) **Pectin: Technological and Physiological Properties**, p.37 – 60, 2020.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoramento de plantas (5th edition). UFV, Viçosa, 2009.

BOUKAEW, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTSAN, P.; YOSSAN, S. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Streptomyces salmonis* PSRDC-09 against anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* PSU-03 in postharvest chili fruit. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131(3), p. 1452-1463, 2021.

BOUKAEW, S.; PETLAMUL, W.; SUYOTHA, W.; PRASERTSAN, P. Simultaneous fermentative chitinase and β -1,3 glucanase production from *Streptomyces philanthi* RM-1-1-38 and their antifungal activity against rice sheath blight disease. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 271-284, 2016.

BOUKHATEM, Z. F.; MERABET, C.; TSAKI, H. Plant Growth Promoting Actinobacteria, the Most Promising Candidates as Bioinoculants. **Frontiers in Agronomy**, v. 4, 849911, 2022.

BOUMEHIRA, A. Z.; KIRBY, B.; TRINDADE, M.; HACÈNE, H.; PARK, E. Y.; EL ENSHASY, H. A. *Streptomyces* sp. ADR1, Strain Producing β - and γ -*Rubromycin* Antibiotics, Isolated from Algerian Sahara Desert. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 8, n. 10, p. 473, 2022.

CAPPUCCINO, J. C.; SHERMAN, N. In: Microbiology. A Laboratory manual. Boston [Massachusetts]. **Pearson Education**, p. 125-179, 2014.

CAVIEDES, E. Z.; SILVA, A. P.; MOGOLLÓN, A. M. O. Biocontrol of rice sheath blight with microorganisms obtained in rice cultivated soils. **BRAGANTIA**, v. 80, e0921, 2021.

CELAYA-HERRERA, S.; CASADOS-VÁZQUEZ, L. E.; VALDEZ-VAZQUEZ, I. *et al.* A Cellulolytic *Streptomyces* Sp. Isolated from a Highly Oligotrophic Niche Shows Potential for Hydrolyzing Agricultural Wastes. **BioEnergy Research**, v. 14, p. 333–343, 2021.

CHATER, K.F.; BIRÓ, S.; LEE, K.J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 171–198, 2010.

CIMERMANCIC, P.; MEDEMA, M.H.; CLAESEN, J.; KURITA, K.; WIELAND, L. C.; MAVROMMATIS, K.; PATI, A.; GODFREY, P. A.; KOEHRSEN, M.; CLARDY, J.; BIRREN, B. W.; TAKANO, E.; SALI, A.; LININGTON, R. G.; FISCHBACH, M. A. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. **Cell Press**, v. 17, p. 412 – 421, 2014.

COLSON, S.; VAN, W. G.; CRAIG, M.; NOENS, E.; NOTHAFT, H.; MOMMAAS, M.; TITGEMEYER, F.; JORIS, B.; RIGALI, S. The chitobiose-binding protein, DasA, acts as a link between chitin utilization and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor*. **Microbiology**, v. 154, p. 373–382, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento [National Supply Company]. Brazilian crop monitoring: grains crop 2018/19. Fonte: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. 2022.

CORDOVEZ, V.; CARRION, V. J.; ETALO, D. W.; MUMM, R.; ZHU, H.; VAN WEZEL, G. P.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 1081, 2015.

CORNELL, C. R.; MARASINI, D.; FAKHR, M. K. Molecular Characterization of Plasmids Harbored by Actinomycetes Isolated from the Great Salt Plains of Oklahoma Using PFGE and Next Generation Whole Genome Sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2282, 2018.

DAVE, A.; INGLE, S. Potential of *Streptomyces* and its Secondary Metabolites for Biocontrol of Fungal Plant Pathogens. In: Sayyed, R., Singh, A., Ilyas, N. (eds) Antifungal Metabolites of Rhizobacteria for Sustainable Agriculture. **Fungal Biology, Springer Cham**, p. 3 – 22, 2022.

de SIMEIS, D.; SERRA, S. Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds - An Overview on Antibiotics Production. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, n. 5, p. 483, 2021.

DEVI, S.; SHARMA, M.; MANHAS, R.K. Investigating the plant growth promoting and biocontrol potentiality of endophytic *Streptomyces* SP. SP5 against early blight in *Solanum lycopersicum* seedlings. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1 – 16, 2022.

DIAZ-DIAZ, M.; BERNAL-CABRERA, A.; TRAPERO, A.; MEDINA-MARRERO, R.; SIFONTES-RODRÍGUEZ, S.; CUPULL-SANTANA, R.; AGUSTÍ-BRISACH, C. Characterization of actinobacterial strains as potential biocontrol agents against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, the main soil-borne pathogens of *Phaseolus vulgaris* in Cuba. **Plants**, v. 11, n. 5, p. 645, 2022.

do NASCIMENTO, C. A. C.; PAGLIARI, P. H.; FARIA, L. D.A.; VITTI, G. C. Phosphorus Mobility and Behavior in Soils Treated with Calcium, Ammonium, and Magnesium Phosphates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 82, p. 622-631, 2018.

EBRAHIMI-ZARANDI, M.; BONJAR, G.H.S.; RISEH, R.S.; EL-SHETEHY, M.; SAADOUN, I.; BARKA, E.A. Exploring Two *Streptomyces* Species to Control *Rhizoctonia solani* in Tomato. **Agronomy**, v. 11, 1384, 2021.

EI-TARABILY, K. A. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. **Plant Soil**, v. 308, p. 161–174, 2008.

EMBRAPA. Xilanasas microbianas e suas aplicações industriais. Documento 38. Brasília. **AGROENERGÍA**. 2021.

FAOSTAT. Crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. 01 set. 2020.

FARIED, AL-SHAIMAA M.; MOHAMED, H. M.; EL-DSOUKY, M. M.; HAMDIA, M. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Actinomycetes from Rhizosphere Soil. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, v. 49, p. 125-137, 2018.

FONTANA, A.; GERVASIO, P. M.; SANTANA DOS SANTOS, J.; KANGUSS, D. G.; QUEIROZ DOS SANTOS, O. Phosphorus adsorption capacity in sandy textured soils with built fertility. **Revista Agrogeoambiental**, v. 13, p. 606-614, 2021.

GEBILY, D.A.S.; GHANEM, G.A.M.; RAGAB, M. M.; ALI, A. M.; SOLIMAN, N. E. D. K.; ABD EL-MOITY, T. H. Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, 33, 2021.

GHANEM, G. A. M.; GEBILY, D. A. S.; RAGAB, M. *et al.* Efficacy of antifungal substances against three *Streptomyces* spp. against different phytopathogenic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, 112, 2022.

GHOLAMI, M.; KHAKVAR, R.; ALIASGARZAD, N. Application of endophytic bacteria to control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, n. 15, p. 1831–1838, 2013.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; HOLMES, N. A.; SCHLIMPERT, S.; BIBB, M. J.; CHANDRA, G.; WILKINSON, B.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces venezuelae* NRRL B-65442: genome sequence of a model strain used to study morphological differentiation in filamentous actinobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 9-10, 2021.

GOOD, N.E.; WINGET, D. G.; WINTER, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M. M. Hydrogen ion buffers for biological research. **American Chemical Society**, v. 5, p. 467-477, 1966.

GOULART, A. C. P. Setting a rating scale for assess *Rhizoctonia solani* lesions on cotton, soybean and common bean seedlings. **Bioscience Journal**, v. 34, p. 1632-1639, 2018.

HAMID, R.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; JAVED, S. Purification and characterization of thermostable chitinase from a novel *S. maltophilia* strain. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 9, p. 7 -12, 2013.

HARIR, M.; BENDIF, H.; BELLAHCENE, M.; FORTAS, Z.; POGNI, R. *Streptomyces* secondary metabolites. **Basic Biology and Applications of Actinobacteria**, v. 6, p. 99–122, 2018.

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. Chapter 21: Actinobacteria. Beneficial Microbes in Agro-Ecology. **Academic Press**, cap. 21, p. 443-4766, 2020.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 637- 657, 2010.

HORSTMANN, J. L.; DIAS, M. P.; ORTOLAN, F.; MEDINA-SILVA, R.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. *Streptomyces* sp. CLV45 from *Fabaceae* rhizosphere benefits growth of soybean plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1861–1871, 2020.

HOSSEINI ABARI, A.; AMINI ROURANI, H.; GHASEMI, S. M.; KIM, H.; KIM, Y. G. Investigation of antioxidant and anticancer activities of unsaturated oligo-galacturonic acids produced by pectinase of *Streptomyces hydrogenans* YAM1. **Scientific Reports**, v. 11, 8491, 2021.

HOUFANI, A. A.; VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN.; BENALLAOUA, S. Efficient screening of potential cellulases and hemicellulases produced by *Bosea* sp. FBZP-16 using the combination of enzyme assays and genome analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 1 -14, 2017.

JARDIM, A.C.M.; DE OLIVEIRA, J.E.; ALVES, L.D. *et al.* Diversity and antimicrobial potential of the culturable rhizobacteria from medicinal plant *Baccharis trimera* Less. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1409–1424, 2022.

JAVAD, H.; NAGHMEH, P. The Cellular Structure of Actinobacteria. In: Wink, J., Mohammadipanah, F., Hamedi, J. (eds) *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. p. 5 – 28, 2017.

JONES, S. E.; ELLIOT, M. A. *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. **Trends in Microbiology**, v. 25, n.7, p. 522-531, 2017.

KANG, S.G., LEE, K.J. Kinetic analysis of morphological differentiation and protease production in *Streptomyces albidoflavus* SMF301. **Microbiology (Reading)**, v. 143, p. 2709–2714, 1997.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; *et al.* A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503–507, 2008.

KEIJSER, B. J.; NOENS, E. E.; KRAAL, B.; KOERTEN, H. K.; VAN WEZEL, G. P. The *Streptomyces coelicolor* ssgB gene is required for early stages of sporulation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, p. 59–67, 2003.

KINASHI, H. Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 19–25, 2011.

KINASHI, H.; MORI, E.; HATANI, A.; NIMI, O. Isolation and characterization of linear plasmids from lankacidin-producing *Streptomyces* species. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 47, n. 12, p. 1447-1455, 1994.

KINASHI, H.; SHIMAJI, M.; SAKAI, A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* encoding antibiotic biosynthesis genes. **Nature**, v. 328, p. 454-456, 1987.

KORAYEM, A. S.; ABDELHAFEZ, A. A.; ZAKI, M. M.; SALEH, E. A. Biological control of green bean damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces parvulus* strain 10d. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 87–94, 2022.

KUMAR, A., SINGH, J. Biofilms forming microbes: diversity and potential application in plant–microbe interaction and plant growth. **Plant microbiomes for sustainable agriculture**, p. 173-197, 2020.

KUMAR, S.; HAP. I.; PRAKASH, J.; SING, S. K.; MISHRA, S.; RAJ. R. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-12, 2018.

KUNOVA, A.; BONALDI, M.; SARACCHI, M.; PIZZATTI, C.; CHEN, X.; CORTESI, P. Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 1 – 11, 2016.

KUSAYKIN, M. I.; BELIK, A. A.; KOVALCHUK, S. N.; DMITRENOK, P. S.; RASSKAZOV, V. A.; ISAKOV, V. V.; ZVYAGINTSEVA, T. N. A new recombinant endo-1,3- β -D-glucanase from the marine bacterium *Formosa algae* KMM 3553: enzyme characteristics and transglycosylation products analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1 – 12, 2017.

LAMARI, L.; BERNIER, C. C. Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 7, p. 139-145, 1993.

LECHEVALIER, H.; LECHEVALIER, M. Classification des actinomycètes aerobies basée sur leur morphologie et leur composer chimique. **Annales de l'Institut Pasteur**, p. 662–673, 1965.

LIU, X.; DOU, G.; MA, Y. Potential of medicinal plant endophytes to control and promote plant growth. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, p. 165–173, 2016.

LIU, Z.; ZHAO, Y.; HUANG, C.; LUO, Y. Recent Advances in Silent Gene Cluster Activation in *Streptomyces*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 632230, 2021.

MAHADEVAN, B.; CRAWFORD, D. L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 489-493, 1997.

MANHAS, R. S.; CHANDER, D.; CHAUBEY, A. Identification and taxonomy of *Streptomyces justiciae* strain RA-WS2: a novel setomimycin producing actinobacterium. **3 Biotech**, v. 13, p. 47, 2023.

MANVISAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S. K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 169, p. 262-278, 2014.

MATSUKAWA, E.; NAKAGAWA, Y.; IIMURA, Y.; HAYAKAWA, M. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. **Actinomycetol**, v. 21, p. 32-39, 2007.

McDOUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5113-5120, 2003.

MEDEMA, M. H.; TREFZER, A.; KOVALCHUK, A.; VAN DEN BERG, M.; MÜLLER, U.; HEIJNE, W.; WU, L.; ALAM, M. T.; RONNING, C. M.; NIERMAN, W. C.; BOVENBERG, R. A.; BREITLING, R.; TAKANO, E. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, p. 212–224, 2010.

MEENA, L. I.; RAJESWARI, E.; AHILADEVI, P.; Kamalakannan, A.; Kalaiselvi, T. Antifungal potential of *Streptomyces rameus* GgS 48 against mungbean root rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler]. **Journal of Biosciences**, v. 47,10, 2022.

MÉNDEZ, C.; BRAÑA, A.F.; MANZANAL, M.B.; HARDISSON, C. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. **Canadian journal of microbiology**, v. 5, p. 446-450, 1985.

MIHAJLOVSKI, K.; BUNTIĆ, A.; MILIĆ, M. *et al.* From Agricultural Waste to Biofuel: Enzymatic Potential of a Bacterial Isolate *Streptomyces fulvissimus* CKS7 for Bioethanol Production. **Waste Biomass**, v. 12, p. 165–174, 2021.

MINGMA, R.; DUANGMAL, K.; THAMCHAIPENET, A. *et al.* *Streptomyces oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from stems of rice plant. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 368–372, 2015.

MITRA, D.; MONDAL, R.; KHOSHROU, B.; ANSUMAN, S.; RADHA, T. K.; BHASWATIMAYEE, M.; NAVENDRA, U. Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. **Pedosphere**, v. 32, p. 149-170, 2022.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

NETZKER, T.; SHEPHERDSON, E. M. F.; ZAMBRI, M. P.; ELLIOT, M. A. Bacterial Volatile Compounds: Functions in Communication, Cooperation, and Competition. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, p. 409-430, 2020.

NGALIMAT, M. S.; MOHD, H. E.; ZULPERI, D.; ISMAIL S. I.; ISMAIL, M. R.; MOHD, Z. N.; SAIDI, N. B.; YUSOF, M.T. Characterization of *Streptomyces* spp. from Rice Fields as a Potential Biocontrol Agent against *Burkholderia glumae* and Rice Plant Growth Promoter. **Agronomy**, v. 11, n. 9, 1850, 2021.

NONGBET, A.; MISHRA, A. K.; MOHANTA, Y. K.; MAHANTA, S.; RAY, M. K.; KHAN, M.; BAEK, K. H.; CHAKRABARTTY, I. Nanofertilizers: A Smart and Sustainable Attribute to Modern Agriculture. **Plants**, v. 11, 2587, 2022.

NOVAKOVA, R.; KNIRSCHOVA, R.; FARKASOVSKY, M.; FECKOVA, L.; REHAKOVA, A.; MINGYAR, E.; JAN, K. The gene cluster *aur1* for the angucycline antibiotic auricin is located on a large linear plasmid pSA3239 in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. **FEMS Microbiology Letters**, v. 342, p. 130-137, 2013.

OMAR, S. Pathological studies on root rot diseases of faba bean (*Vicia faba*). **Faba Bean Information Service, Newsletter**, v.14, p. 34-37, 1996.

ORTIZ MOGOLLON, A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* por *trichoderma* spp. e actinobactérias edáficas. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. 2022. Teses (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa. 2022. Versão impressa e eletrônica.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Screening and Molecular Identification of Pectinase Producing Microbes from Coffee Pulp. **BioMed Research International**, v. 3, 2961767, 2018.

PADDER, B. A.; SHARMA, P. N.; AWALE, H. E.; KELLY, J. D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **European Journal of Plant Pathology**, v. 99, p. 317-330, 2017.

POPA, A.; ISRAEL-ROMING, F.; CORNEA, C.; ZUGRAVU, M. Microbial xylanase: A review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335 – 342, 2016.

PRIYA, B. S.; STALIN, T.; SELVAM, K. Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygrosopicus*) in the production of eco-friendly alternative energy from waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 14320-14325, 2012.

PROSSER, B. L. T.; PALLERONI, N. J. Nutritional characterization of some selected actinomycetes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28(4), p. 516-522, 1978.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S.S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A, K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, p. 1-20, 2018.

RETAMAL-MORALES, G.; MEHNERT, M.; SCHWABE, R.; TISCHLER, D.; SCHLÖMANN, M.; LEVICÁN, G. J. Genomic characterization of the arsenic-tolerant Actinobacterium, *Rhodococcus erythropolis* S43. In **Solid State Phenomena**, v. 262, p. 660-663, 2017.

RIGALI, S.; TITGEMEYER, F.; BARENDT, S.; MULDER, S.; THOMAE, A. W.; HOPWOOD, D. A.; VAN WEZEL, G. P. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. **European Molecular Biology Organization**, v. 9, n. 7, p. 670–675, 2008.

ROMERO-RODRÍGUEZ, A.; MALDONADO-CARMONA, N.B.; RUIZ-VILLAFÁN, B.; NIRANJAN, K.; ROCHA, D.; SANCHEZ, S. Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 761–781. 2018.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 231, 126374, 2020.

SCHOLLER, E.G.; GÜRTLER, H.; PEDERSEN, R.; MOLIN, S.; WILKINS, K. Volatile metabolites from actinomycetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2615-2621, 2002.

SCHWARTZ, H. F. Anthracnose. pages 16-17 in: Compendium of Bean Diseases. **The American Phytopathological Society**, p. 73, 1991.

SEBASTIAN, A. M.; UMESH, M.; PRIYANKA, K. Isolation of Plant Growth-Promoting *Bacillus cereus* from Soil and Its Use as a Microbial Inoculant. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 46, p. 151–161, 2021.

SEGARAN, G.; SUNDAR, R. D. V.; SETTU, S.; SHANKAR, S.; SATHIAVELU, M. A review on endophytic actinomycetes and their applications. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 152-158, 2017.

SEO, J., OHNISHI Y, HIRATA A, HORINOUCI S. ATP-binding cassette transport system involved in regulation of morphological differentiation in response to glucose in *Streptomyces griseus*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 91–103, 2002.

SHARMA, P. N.; SHARMA, O. P.; PADDER, B. A.; KAPIL, R. Yield Loss Assessment in Common Bean Due to Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) Under Sub-Temperate Conditions of North-Western Himalayas. **Indian Phytopathology**, v. 61, p. 323–330, 2008.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*.: II. Species descriptions from first study. **International Journal of Bacteriology**, v. 18, n. 2, p. 69–189, 1968.

SHRESTHA, S.; RAHMAN, M. S.; QIN, W. Screening and Molecular Identification of Novel Pectinolytic Bacteria from Forest Soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 9069–9087, 2021.

SINGH, M.; SARKAR, B.; BOLAN, N. S.; OK, Y. S.; CHURCHMAN, G. J. Decomposition of soil organic matter as affected by clay types, pedogenic oxides and plant residue addition rates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 374, p. 11-19, 2019.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, p. 2199–2223, 2010.

SOARES, E.V. Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 3985 – 4004, 2022.

SOLTANI, N. M.; SAMANDARI, N. N.; AGHIGHI, S.; SHAHIDI, B. A. H.; MURTAZOVA, K. M. S.; NAKHAEV, M. R.; ZARGAR, M. Investigating the potential of *Streptomyces* spp. in the suppression of *Rhizoctonia solani* (AG1-IA) which causes rice sheath disease in northern Iran. **Agronomy**, v. 12(10), 2292, 2022.

SPAEPEN, STIJN.; VANDERLEYDEN, JOS. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v.3, n. 4, a001438, 2011.

TANG, Y. W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indole acetic acid. II. The physiology of the enzyme. **American Journal of Botany**, p. 570-578, 1948.

TERRA, L.; RATCLIFFE, N.; CASTRO, H. C.; VICENTE, A.C.P.; DYSON, P. Biotechnological Potential of *Streptomyces* Siderophores as New Antibiotics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28(7), p. 1407-1421, 2021.

TOLÊDO-SOUZA, E. D.; COSTA, J. L. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, p. 57-63, 2003.

TREJO-ESTRADA, S. R.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D, L. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 81-90, 1998.

TU, J. C. Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Phytopathology**, v. 121, p. 97–102, 1987.

TU, J. C. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, p. 73 – 76, 1997.

VALE, F.X.; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLI, M. L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 577-589, 2001.

VAN BERGEIJK, D.; ELSAYED, S.; DU, C.; NUÑEZ, S. I.; ROSEBOOM, A.; ZHANG, L.; VAN WEZEL, G. The ubiquitous catechol moiety elicits siderophore and angucycline production in *Streptomyces*. **Communications Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 14, 2022.

VENETTE, J. *Sclerotinia* spore formation, transport and infection. In: Proceedings of the *Sclerotina* Workshop. 21 January 1998. **Fargo, North Dakota, USA**. P. 4 – 7, 1998.

WILLIAMS, S.; VICKERS, J. Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. **Biology of actinomycetes**, v. 88, p. 265 –270, 1988.

WU, QIULAN.; XIN, DOU.; WANG, QI.; ZHENG BING, GUAN.; YUJIE, CAI.; XIANGRU, LIAO. Isolation of β -1,3 Glucanase Producing Microorganisms from *Poria cocos* Cultivation Soil via Molecular Biology. **Molecules**, v. 23, 1555, 2018.

XU, C.; WANG, L.; CUI, Q.; HUANG, Y.; LIU, Z. Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1109 - 1115, 2006.

YANG, M. Y.; WEI, Z.; ZHAOYANG, L. V.; LIMING, S.; KECHENG, Z.; BEIBEI, G. Evaluation of the Inhibitory Effects of Wuyiencin, a Secondary Metabolite of *Streptomyces albulus* CK-15, Against *Sclerotinia sclerotiorum* *in Vitro*. State Key Laboratory of Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, **Chinese Academy of Agricultural Sciences**, v. 106, n. 1, p. 156-164, 2022.

YANG, M.; HUANG, C.; XUE, Y.; LI, S.; LU, L.; WANG, C. Biofumigation with volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1 and pure chemicals to control *Aspergillus ochraceus*. **Association of Applied Biologists**, p. 313-322, 2018.

ZACKY, F. A.; TING, A. S. Y. Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **Biological Control**, v. 66, n.3, p. 204–208, 2013.

ZHANG, R.; ZENG. A.; FANG, P.; QIN Z. Characterization of replication and conjugation of *Streptomyces* circular plasmids pFP1 and pFP11 and their ability to propagate in linear mode with artificially attached telomeres. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3368-3376, 2008.