



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTREPTOMICETOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO E
AGENTES DE BIOCONTROLE DA MELOIDOGINOSE NO
TOMATEIRO

CARLA DA SILVA SOUSA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
ABRIL - 2006

ESTREPTOMICETOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO E
AGENTES DE BIOCONTROLE DA MELOIDOGINOSE NO
TOMATEIRO

CARLA DA SILVA SOUSA

Engenheira Agrônoma
Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2004.

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de
Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade
Federal da Bahia como requisito parcial para
obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias,
área de concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. ANA CRISTINA FERMINO SOARES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

S725 Sousa, Carla da Silva

Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro/Carla Sousa da Silva.- Cruz das Almas, Ba, 2006.

102f.: il., tab., graf

Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias e Ambientais. Universidade Federal da Bahia, 2006.

1. Tomate - crescimento. 2. Tomate – controle biológico. 3. Tomate – actinomicetos 4. Tomate – produção de inóculo. I. Universidade Federal da Bahia, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais II. Título.

CDD 20.ed. 635.642

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares
Escola de Agronomia – UFBA
(Orientador)

Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque
Departamento de Biologia - UEFS

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Comissão de Execução e Planejamento da Lavoura Cacaueira

Homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em
.....
Conferindo o grau de Mestre em Ciências Agrárias em
.....

OFEREÇO

Ao meu querido pai Edmilson (*in memorian*), pelo amor, carinho, dedicação, pois tenho certeza de que onde estiver, sente-se orgulhoso por mais esta conquista.

A minha querida mãe Eliana, por seu amor, exemplo de força, fé, dedicação e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

As minhas irmãs Cássia e Evelin pela alegria de tê-las, por todo amor, carinho e pela convivência amiga.

DEDICO

As minhas amadas avó Nina e madrinha Cléia e aos demais familiares padrasto, tios, tias, primos e primas pela presença em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus que com seu infinito amor deu-me a vida, a inteligência, a força, a saúde e a coragem para vencer todas as dificuldades e obstáculos que apareceram ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais Eliana e Edmilson (*in memoriam*), pelo constante e incondicional amor, dedicação, apoio, proteção, carinho e por primaram pela minha educação, vocês são para mim exemplo de vida que sempre seguirei.

À minha irmã Cássia pelo companheirismo, amor, apoio e carinho constante em todos os momentos da minha vida.

A minha irmãzinha Evelin por preencher a minha vida de graça e ternura sempre.

A minha amada avó Nina e a madrinha Cléia pela presença, carinho apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu padrasto, tios, tias, primos e primas, enfim toda a minha família, para mim alicerce e exemplo de união e amizade, por todo amor, carinho e incentivo.

Aos meus avôs Euclides e Caetano, avó Aurelina, tia Arlinda e primos Jorge Euclides e César, que fizeram parte da minha história e onde quer que estejam os lembrarei com muito carinho e amor sempre.

Aos meus irmãos Marlon, Nailson e Alex Leal pelo amor e afeto de sempre.

As minhas grandes amigas Luciene e Darcilúcia pelo carinho, apoio e incentivo constante.

A minha orientadora, professora Dr^a Ana Cristina Fermino Soares, pelos valiosos ensinamentos, paciência, amizade, exemplo de honestidade e pela competente orientação neste e em todos os trabalhos desde a iniciação científica.

Aos Drs. Jane Oliveira Perez e João Luiz Coimbra pelo incentivo, amizade e ensinamentos.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia Marizete, Marília, Maiara, Diego, Gisele, Leonardo, Gabriela, Tâmara e Augusto.

Aos colegas do curso de Mestrado em Ciências Agrárias, Marli, Lousane, Rossana, Tatiane Velasco, Rosane Cardoso, Eduardo, Dijaneide, Alexandre, Ruberval, Moema Angélica, Daniela Hansen e Tânia Barros.

Ao Coordenador do Mestrado em Ciências Agrárias, professor Dr^o Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, pelo incentivo constante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos, apoio que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos professores José Carlos Ribeiro de Carvalho e Maria de Fátima da Silva Pinto Peixoto pela amizade, incentivo e apoio constante.

Aos funcionários do Mestrado em Ciências Agrárias da Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, especialmente a Sidinha pela atenção e gentileza de sempre.

Ao Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo, Laboratório de bioquímica e Fitopatologia, pelo sequenciamento do 16S rDNA dos actinomicetos.

Ao Dr. Kazunori Hatano, do Departamento de Biotecnologia do National Institute of Technology and Evaluation (NITE), no Japão, pela identificação dos isolados de estreptomicetos, com base nas seqüências de 16S rDNA.

A todos os professores da Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram na minha formação profissional e que serão sempre lembrados na minha caminhada pela área da ciência.

À Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, pelos desafios e realizações proporcionados.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho os meus mais sinceros agradecimentos.

*“No início faça o imprescindível,
depois, o possível
e, de repente estará fazendo o impossível”.*

São Francisco de Assis.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1	
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ESTREPTOMICETOS DO SOLO COM POTENCIAL PARA BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO.....	14
Capítulo 2	
PRODUÇÃO DE MUDAS DE TOMATEIRO EM SUBSTRATO ORGÂNICO INCUBADO COM ESTREPTOMICETOS.....	40
Capítulo 3	
ESTREPTOMICETOS NO CONTROLE DA MELOIDOGINOSE EM MUDAS DE TOMATEIRO.....	67
Capítulo 4	
PRODUÇÃO DE INÓCULO DE ESTREPTOMICETOS EM ARROZ AUTOCLAVADO.....	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

ESTREPTOMICETOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO E AGENTES DE BIOCONTROLE DA MELOIDOGINOSE NO TOMATEIRO

Autor: Carla da Silva Sousa

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO: Os actinomicetos são procariotas, Gram positivos, que apresentam características importantes para o controle biológico e promoção de crescimento de plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de seis isolados de estreptomicetos do solo, no biocontrole da meloidoginose e na promoção de crescimento do tomateiro. Foi feita a caracterização morfológica e bioquímica dos estreptomicetos. Todos os isolados produziram as enzimas amilase, catalase e lípase, produziram o ácido indolacético e colonizaram o sistema radicular das plântulas de tomateiro produzidas *in vitro*. Os isolados AC-147, AC-95 e AC-29, foram os maiores produtores de sideróforos. Apenas o AC-92 não apresentou atividade celulolítica e quitinolítica, o AC-26 não demonstrou atividade xilanolítica e o AC-92 cresceu em todos os níveis de salinidade e pH avaliados. Avaliou-se o efeito da inoculação e incubação por 15, 30, 45 e 60 dias do substrato com os estreptomicetos no crescimento do tomateiro. A inoculação e incubação do substrato promoveram o aumento na altura, na produção de matéria seca da parte aérea e raízes, no diâmetro do caule e no teor de nutrientes da parte aérea das mudas, sendo 43 dias considerado o melhor período de incubação. Na avaliação *in vitro* do efeito dos metabólitos secundários produzidos pelos estreptomicetos, no controle da meloidoginose do tomateiro, observou-se 98,2% de mortalidade e 98,8% de inibição da eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, causados pelos isolados AC-92 e AC-95, respectivamente, sendo estes considerados os mais eficientes no controle *in vitro* do nematóide. No substrato inoculado e incubado com o isolado AC-92, ocorreu uma redução de 68% no número de galhas.g⁻¹ de raiz e de 76,8% no número de massa de ovos.g⁻¹ de raiz. Na avaliação da produção de inóculo dos estreptomicetos em arroz, observou-se a produção de 0,08 x 10⁹ a 1,42 x 10⁹ esporos.g⁻¹ de arroz, entre os diferentes isolados. O arroz esterilizado demonstrou ser um substrato viável para a produção massal de inóculo desses microrganismos.

Palavras chave: actinomicetos, biocontrole, promoção de crescimento, inóculo.

STREPTOMYCETES AS AGENTS OF PLANT GROWTH PROMOTION AND BIOCONTROL OF *Meloidogyne incognita* ON TOMATO

Author: Carla da Silva Sousa

Advisor: Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT: Actinomycetes are Gram positive prokaryotes, with important characteristics for biological control and plant growth promotion. This work had the objective of evaluating the potential of six soil isolates of *Streptomyces* sp. to control *Meloidogyne incognita* and promote growth promotion of tomato plants. The streptomycete isolates were morphologically and biochemical by characterized. All isolates produced the enzymes amylase, catalase and lipase, as well as indol acetic acid and colonized tomato roots *in vitro*. Isolates AC-147, AC-95, and AC-29 produced the highest amounts of siderophores. Only AC-92 did not show celulolytic and chitinolytic activity, isolate AC-26 did not show xilanolytic activity, and AC-92 grew all levels of pH and salinity tested. The effect of the inoculation and incubation of the substrate for 15, 30, 45, and 60 days with streptomycetes was evaluated for growth promotion of tomato seedlings. The inoculation and incubation of substrate promoted significant increases in plant height, stem diameter, dry weight root and shoot, and nutrient levels. Forty three days was considered to be the best incubation period. *In vitro* tests on the effect of streptomycete secondary metabolites to control *M. incognita* showed 98.2% mortality of second stage juveniles (J2) and 98.8% egg hatching inhibition. Isolates AC-92 and AC-95 were considered to be the most efficient ones in the control of this plant parasitic nematode. The substrate inoculated and incubated with strain AC-92, promoted a reduction of 68% in the number of galls per gram of roots and of 76.8% in the number of egg mass per gram of roots. A number of spores ranging from 0.08×10^9 to 1.42×10^9 per gram of rice grains was obtained for the different streptomycete isolates. Sterile rice grains were shown to be a suitable substrate for mass production of streptomycete inoculum.

Key- words: actinomycetes, biocontrol, plant growth promotion, inoculum.

INTRODUÇÃO

ACTINOMICETOS

Os actinomicetos são encontrados em muitos habitats. No solo são numericamente dominantes que outras populações bacterianas, porém são mais numerosos que as populações fúngicas. O gênero mais abundante das colônias desenvolvidas em meio de cultura sólido é o *Streptomyces* (70-90%), seguido de *Nocardia* (5-30%) e *Micromonospora* (1-15%) (Gava & Neves, 2002).

Streptomyces são bactérias do solo, Gram positivas, aeróbias estritas, cujas colônias são pequenas pulverulentas ou velutinas, com micélio aéreo de diferentes tonalidades e produtores de pigmentos solúveis (Araújo, 1998). O ciclo de vida é complexo, iniciando-se com a germinação do esporo, dando origem a um micélio formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas de nutrientes como polissacarídeos (amido, pectina, quitina, celulose), proteínas (queratina, elastina), lipídeos e compostos aromáticos, pela ação de enzimas extracelulares. A partir deste micélio vegetativo (hifas primárias), desenvolve-se o micélio aéreo (hifas aéreas) no centro da colônia. As hifas podem apresentar-se multinucleadas ou em compartimentos mononucleados, que darão origem a cadeias de esporos. Nesta fase, ativam-se os metabolismos secundários, em que são produzidos, principalmente, antibióticos e pigmentos (Araújo, 1998; Padilha, 1998).

A ocorrência de actinomicetos nos diferentes ecossistemas decorre da sua diversidade metabólica e da evolução de mecanismos específicos de dispersão. Esta diversidade metabólica mostra a grande variabilidade destes microorganismos em colonizar ambientes salinos, ácidos, com elevada temperatura, indicando a grande capacidade de se adaptarem a ambientes extremos (Araújo, 1998).

Uma característica marcante dos actinomicetos é a produção de enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas comumente encontradas nos solos como caseína, amido, quitina, húmus, celulose, lignocelulose, além da

síntese e excreção de milhares de metabólitos secundários como antibióticos e o terpenóide geosmin (Moreira & Siqueira, 2002).

Os actinomicetos representantes do gênero *Frankia*, fixam o nitrogênio atmosférico, em simbiose com espécies de angiosperma (Rojas et al., 1992). No entanto, a importância destes microrganismos está relacionada com a produção de antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos (Gava & Neves, 2002).

Entre os fatores que podem interferir na produção de antibióticos pelos actinomicetos, destacam-se os nutricionais e físico-químicos. Características do meio como pH, temperatura de crescimento e suprimento de nutrientes podem interferir tanto na quantidade quanto nas características do antibiótico produzido. A produção de metabólitos secundários está mais relacionada à disponibilidade de carboidratos do que à de compostos nitrogenados e a produção de antibióticos tem sido relacionada com o início da produção do micélio aéreo e esporos (Gava, 1998).

BIOCONTROLE DE DOENÇAS

A preocupação da sociedade com a contaminação do ambiente por pesticidas se expressa através de segmentos do mercado ávidos por produtos agrícolas diferenciados, produzidos sem uso de pesticidas. Esses produtos químicos têm efeitos negativos sobre o solo, o clima a vegetação, as águas, os animais e o homem, e provocam a seleção de mutantes resistentes resultantes de forte pressão seletiva. Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar. Nesse contexto, o controle biológico vem sendo estudado como uma alternativa viável para o controle de doenças de plantas, considerada uma alternativa vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo e à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (Bettioli, 2001; Franceschini, 2001).

Dentre as várias definições para controle biológico a mais aceita pela maioria dos pesquisadores é descrita por Baker & Cook (1974) como a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes de doença por um patógeno ou parasita, promovida por um ou mais organismos que não o homem, favorecidos naturalmente ou pela manipulação do seu habitat ou ambiente, hospedeiros ou

antagonistas ou pela manipulação em massa de um ou mais antagonistas (Bettiol & Ghini, 1995).

Os microrganismos que atuam como agentes de biocontrole apresentam relações antagônicas aos patógenos por meio de mecanismos diretos e indiretos (Lima, 1998). A competição por nutrientes, espaço e oxigênio são mecanismos diretos de controle, destacando-se o papel das leveduras, caracterizadas como excelentes organismos competidores por nutrientes (Bettiol, 1991). O sucesso na competição por nutrientes poderá ser garantido por características como maior velocidade de crescimento e maior capacidade e eficiência de utilização dos substratos disponíveis, o que significa uma maior adaptação às condições predominantes (Gava, 1998). Outra característica importante da competição no controle de patógenos é a competitividade, ou seja, a capacidade dos organismos introduzidos permanecerem e proliferarem no ambiente de controle. Contudo, vários fatores bióticos e abióticos influenciam a capacidade de colonização e sobrevivência de um microorganismo na superfície ou no interior dos vegetais (Oliveira et al., 2003).

O principal fator que influencia a capacidade das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) de agirem como agentes eficientes de biocontrole, por mecanismos de competição, é a capacidade de metabolizar compostos específicos produzidos pelas plantas (como os exsudatos radiculares), transformando-os em compostos inibitórios aos patógenos (Compant et al., 2005).

A competição por ferro, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos em solos em que o Fe disponível encontra-se em baixas concentrações (Leong, 1986). Os sideróforos produzidos por agentes de biocontrole seqüestram o Fe do ambiente, tornando-o indisponível aos fitopatógenos e/ou microorganismos deletérios, ocasionando, dessa forma, uma inibição no seu crescimento (Weller, 1988).

Algumas RPCP produzem enzimas que atuam na lise de células fúngicas, como quitinases, β -1,3 glucanases, proteases e lipases (Oliveira et al., 2003). Fungos, principalmente os Oomicetos, possuem quitina como o principal componente estrutural da parede celular e a degradação do micélio têm sido associados à quitinase e laminarinase produzidas pelos agentes de biocontrole (Fridlender et al., 1993).

As RPCP também são capazes de controlar patógenos radiculares por mecanismos de antagonismo e por indução de resistência sistêmica (ISR). A indução de resistência pode ser definida como um processo de defesa ativa da planta, em que esta utiliza múltiplos mecanismos induzidos sistematicamente por agentes bióticos e abióticos, e que se apresenta eficiente contra uma variedade de patógenos de plantas (Luz, 1996; Romeiro, 1999)

Diferentes mecanismos estão envolvidos na supressão de doenças radiculares, como por exemplo, a antibiose devido à produção de compostos bactericidas, fungicidas ou micostáticos e nematicidas. Evidências de que rizobactérias produzem antibióticos têm sido acumuladas e constituem um importante fator na supressão de patógenos (Kerr, 1980). Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros organismos (Fravel, 1998).

Os actinomicetos, principalmente os pertencentes do gênero *Streptomyces* são mundialmente conhecidos pela produção de antibióticos (Padilha, 1998), agindo no controle de diversas doenças de plantas (Singh & Mehrotra, 1980; Crawford et al., 1993; El-Abyd et al., 1993; Silva, 1998). Esses microrganismos têm grande importância industrial, pela variada produção de metabólitos secundários, respondendo a 70% dos antibióticos conhecidos. A produção de antibióticos está diretamente relacionada com o ciclo celular, que sofre influência de fatores, como variações nutricionais e fatores de regulação (substâncias de baixo peso molecular, que desempenham um papel direto na diferenciação) (Padilha, 1998). Além dos antibióticos de uso clínico, veterinário e agroquímico, outros metabólitos secundários, enzimas, imunomoduladores, inibidores de enzimas, são produzidos também por *Streptomyces* (Araújo, 1998)

O uso destes microrganismos no controle biológico de patógenos data desde 1914 (Moura, 1996). Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico e promoção de crescimento (Thirup et al., 2001; Melo, 1998; Moura et al., 1998). Alguns metabólitos secundários produzidos por actinomicetos têm sido comercializados como fungicidas, a maioria destes sendo produzidos por espécies de *Streptomyces* (Melo, 1998).

A utilização de actinomicetos como organismos de controle microbiano é reforçada pelo fato destes serem habitantes dos mais diversos tipos de solos (Gava,

1998), sendo capazes de colonizar a rizosfera e formar estruturas de resistência, apresentando assim características desejáveis para o controle biológico de doenças de plantas (Moura, 1996).

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

A constante exsudação de compostos das células radiculares e dos microrganismos, como aglutininas, lecitinas, flavonóides e polissacarídeos são responsáveis pelo reconhecimento microrganismo-planta (Aguillar et al., 1988; Kijne et al., 1988) e o efeito rizosférico que culmina na colonização radicular por microrganismos (Chet et al., 1990; Kortemaa et al., 1994).

A colonização de raízes é um pré-requisito para a manutenção e sobrevivência de rizobactérias, bem como para o eficiente controle de patógenos do solo (Melo, 1988), gerando efeitos diretos e indiretos no aumento de crescimento de plantas (Alvarez et al., 1995). Os efeitos diretos ocorrem pela produção de substâncias promotoras de crescimento como giberelinas, auxinas e citocininas, que causam efeitos benéficos no crescimento de plantas como o desenvolvimento da parte aérea, aumento do crescimento de raízes e número de pêlos radiculares absorventes (Cattelan, 1999; Luz, 1996; Azcon & Barea 1975). Os efeitos indiretos ocorrem através do controle de patógenos (Delgadillo et al., 2001), indução de resistência sistêmica (Romeiro, 1999), mineralização de nutrientes (Silveira 2001), destoxificação do solo (Ferro et al., 1994), produção de antibióticos (Fravel, 1998), produção de enzimas (Glick et al., 1995), produção de quitinase (Gomes et al., 2000), produção de sideróforos (Weller, 1988), produção de ácido cianídrico (HCN) (Luz, 1996), solubilização de fosfato (Melo, 1998) e fixação biológica de nitrogênio (Grimes & Mount, 1984).

Muitas RPCP atuam por diversos destes mecanismos, com diferentes modos de ação durante o ciclo do vegetal, e o impacto destes microrganismos no crescimento da planta, depende das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Oliveira et al., 2003).

A promoção do crescimento vegetal por RPCP ocorre tanto pela transferência de moléculas sintetizadas pela bactéria para a planta, quanto pelo incremento na absorção ou aumento da disponibilidade de certos elementos nutricionais (Oliveira et al., 2003).

A produção de substâncias reguladoras de crescimento ativas, como fitohormônios, faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais, podendo alterar o crescimento e desenvolvimento vegetal (Bashan & Holguim, 1997). Entre os efeitos de estímulo ao crescimento vegetal, ocorrem estímulos ao desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (Patten & Glick, 1996)

Grupos de microorganismos especializados do solo são capazes de solubilizar minerais contendo P^+ , Ca^{++} , K^+ , Mg^{++} e outros elementos essenciais às plantas, tornando-os disponíveis para o crescimento vegetal (Siqueira & Moreira, 2002). Dentre os principais mecanismos envolvidos na solubilização de fosfatos por microorganismos estão: a produção de CO_2 e ácidos orgânicos, redução de compostos de Fe^{+3} para compostos de Fe^{+2} e produção de H_2S sob baixas concentrações de O_2 (Mulder et al., 1969).

Os mecanismos de ação responsáveis pela promoção de crescimento em plantas, também podem estar ligados à inibição de patógenos, beneficiando o crescimento vegetal de forma indireta. Sideróforos produzidos por bactérias são compostos que atuam como promotores de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, seqüestrando a maioria do Fe^{+3} disponível e desta forma facilitando o crescimento vegetal. A produção de antibióticos e enzimas como quitinases, β -1,3 glucanases, lipases e proteases também são mecanismos eficientes utilizados pelas bactérias no controle de fitopatógenos, favorecendo o crescimento vegetal (Zago et al., 2000; Oliveira et al., 2003).

Os principais grupos de microrganismos promotores de crescimento de plantas pertencem aos gêneros *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp e *Streptomyces* spp (Singh & Mehrotra, 1980; Pizzanato & Freitas, 1996). Dentre os agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas, os actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentam um papel importante na rizosfera de plantas, por influenciarem o seu crescimento, colonizando as raízes e agindo contra fungos e bactérias fitopatogênicas, devido à produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (Compant et al., 2005; Raupach & Kloepper, 1998). Os estreptomicetos são também conhecidos pela sua importância nos processos de compostagem, devido à capacidade de produção de enzimas capazes de degradar moléculas

complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilanose e lignina (Crawford, 1988).

PRODUÇÃO DE INÓCULO

A introdução massal de antagonistas é a forma mais praticada e estudada de controle biológico, isso porque muitos pesquisadores definem controle biológico como o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo. Comercialmente essa é a definição utilizada, estando disponíveis no mercado, os seguintes produtos comerciais e seus respectivos agentes: Epic (*Bacillus subtilis*), Conquer (*Pseudomonas fluorescens*), Trichodex (*Trichoderma harzianum*), Soil Gard (*Gliocladium virens*), dentre outros (Bettioli, 2001; Flavel, 1998).

Em trabalhos de controle biológico e promoção de crescimento de plantas com actinomicetos, as colônias crescidas em meios de cultura sintéticos, normalmente são resuspendidas em água estéril ou soluções tampão, sendo a suspensão de esporos utilizada como inoculo (Getha et al., 2005; Cao et al., 2005). Contudo, é um método inviável, por ser caro e trabalhoso, além de não permitir a obtenção de grandes quantidades de inoculo, para utilização em trabalhos de casa de vegetação e/ou campo. É necessário desenvolver uma metodologia menos trabalhosa, mais acessível e de baixo custo, em substituição ao uso de meios de cultura sintéticos para a produção massal de inoculo desses microorganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S de & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p. 351-367, 1998.

ALVEREZ, M. A. de B.; GAGNÉ, S.; ANTOUN, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. Oxford, n.1, v.61, p. 194-199.1995.

AGUILLAR, J. M. M. et al. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* towards flavonoids inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, St. Paul., v. 1345, p.2741- 2746.1988.

AZCÓN, R.; BAREA, J.M. Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinilandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. **Plant and Soil**. v 43, p. 609-619, 1975.

BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.

BAKER. K. F.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco. American Phytopathological Society. 1974.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Juaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. p. 1-6. 1991 (Documentos 15).

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico . In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM. L (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 717-727, 1995.

BETTIOL, W. Métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S.J. & BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, p. 123-139, 2001.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA, 1999. 36 p.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p.147-152, 2005.

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

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future perspectives. **Applied and environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951-4959, 2005.

CRAWFORD, D. L.; et al.. Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. Oxford, v. 59, n. 11, p. 3899–3905. 1993.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW M, WILLIAMS, S.T., MORDARSKI, M. (eds): **Actinomycetes in biotechnology**, v.1:s.n., p. 433-459. 1988.

DELGADILLO, R. J. et al. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnologia. **Avace y Perspectiva**, v. 20 p.395-399. 2001.

EL- ABYAD, M. S.; EL-SAYED, M. A.; EL-SHANSHOURY, A. R. Towards the biological control of fungal and bacteria disease of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.149, p. 185-195. 1993.

FERRO, A. M.; SIMS, R. C.; BUGBEE, Hycrest crested wheatgrass accelerated the degradation of pentachlorophenol in soil, **Journal of Environmental Quality**, v. 23, p. 272-279. 1994.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biological Biochemistry**, Oxford, v.25, n. 9, p. 1211-1221. 1993.

FRANCESCHINI, M. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, n. 23, p. 32-37. 2001

FRAVEL D. R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**. v. 26, p. 75-91. 1998.

GAVA, C. A. T. **Seleção de estreptomicetos para controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora***. 1998, 114f, Dissertação de (Mestrado em Ciência do Solo). Seropédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; WONG, W.H.; SEKI, T.; WARD, A.; GOODFELLOW, M. Evaluation of *Streptomyces* sp. strasin g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.24-32, 2005.

GLICK, R. B.; KARATUROU, C. D. M.; NEWELL, P. C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonas. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p. 533-536. 1995.

GOMES et al. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Applied Microbiology**, p. 146-150, n. 30. 2000.

GOODFELLOW, M.; WILLIAM, S.T. & MORDARSKI, M. **Actinomycetes in biotechnology**. London, 1988, 501p.

GRIMES, H. D.; MOUNT, M. S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.16, p. 27-30. 1984.

KERR, A. A biological control of crown gall through production of agrocin 84. **Plant Disease**. St. Paul, v.25, p. 25-30. 1980.

KIJINE, J. et al. Lectin-enhanced accumulation of manganese limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**. v.170, p. 2994-3000. 1988.

KORTEMMA, H.; RITA, H.; HAAHTELA, K.; SMOLANDER, A. Root-colonization ability of antagonistic *streptomyces griseoviridis*- **Plant and Soil**, Wageningen, v. 163, p. 77-83. 1994.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209, 1986.

LIMA, L.H.C.; DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle por micoparasitismo. In: MELO, I. S de & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, v.2, p. 263-304. 1998.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-49. 1996.

MATOVANELLO, C. M.; MELO, I. S. de. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.20, n.2, p. 123-126, 1994.

MELO, I. S. de, Rizobactérias Promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S de & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p. 87-110, 1998.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 2002. 626p.

MOURA, A. B. **Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro**. 1996, 64 f., Tese de (Doutorado em Fitopatologia),Viçosa. Universidade Federal de Viçosa,1996.

MOURA, A. B. et al. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.33, n.12, p. 2065-2072. 1998.

MULDER, E.G.; LIE, T.A.; WOLDENDORP, J.W. Biology and soil fertility. In: Unesco (Roma, Itália) **Soil biology, reviews of research**. Belgium, p. 163-208. 1969.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p.327-343. 1998.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, 9.207-220, 1996.

PIZZINATTO, M. A.; FREITAS, S. S. Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre a sanidade e a germinação de sementes e o desenvolvimento de algodoeiro. **Summa phytopathologica**, Jaboticabal, v.22, n.1, p. 9-14. 1996.

RAUPACH, G.S. & KLOEPPER, J.W. Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Biological Control**, v.88, n.11, p1158-1164.

ROMEIRO, R. da S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 1999. 45 p. (Cadernos didáticos, 56).

ROJAS, N. S.; PERRY, D. A.; FRIEDMAN, J. Influence of actinomycetes on *Frankia* infection, nitrogenase activity and seedling growth of red alder. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n.10, p. 1043-1049. 1992.

SINGH, by P. I.; MEHROTRA, R. S. Biological control of *Rhizoctonia bataticola* on gram by coating seed with *Bacillus* and *Streptomyces* spp. and their influence on plant growth. **Plant and Soil**, v.56, p.475-483. 1980.

SILVA, H. S. A. **Seleção de actinomicetos antagônicos para o controle biológico da galha bacteriana da roseira incitada por *Agrobacterium tumefaciens***. 1998,44f. Dissertação de (Mestrado em Fitopatologia), Viçosa. Universidade federal de Viçosa, 1998.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001, p. 71-100.

STEPHENS, P. M.; CROWLEY, J.J.; OCONNELL, C. Selection of pseudomonad strains inhibiting *Pythium ultimum* on sugarbeet seeds in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, p.1283-1288, 1993.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; WINDING, A. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR 54 and the fungicide imazolil. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1147 – 1153, mar, 2001.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p. 379-407. 1998.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. ***Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32 p.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ESTREPTOMICETOS DO SOLO COM POTENCIAL PARA BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO¹

¹ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Brazilian Journal of Microbiology

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ESTREPTOMICETOS DO SOLO COM POTENCIAL PARA BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

RESUMO

A seleção de agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas, geralmente englobam testes *in vitro*, para determinação da atividade antagônica a patógenos, capacidade de colonização radicular, produção de sideróforos, enzimas extracelulares e substâncias reguladoras do crescimento de plantas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar seis isolados de estreptomicetos: *Streptomyces* sp. (AC-26); *Streptomyces thermotolerans* (AC-29); *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92); *Streptomyces* sp.N0035 (AC-95); *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) e *Streptomyces* sp. (AC-147). Estes isolados foram testados quanto à produção de enzimas extracelulares, ácido indolacético e sideróforos, capacidade de solubilização de fosfatos, colonização radicular e de crescimento em diferentes níveis de pH e salinidade. Para detectar a produção das enzimas extracelulares, os isolados foram cultivados em meio de cultura contendo os substratos dessas enzimas, como única fonte de carbono. Para determinar a capacidade de colonizar o sistema radicular, sementes de tomate foram cultivadas em meio ágar-água 0,6% e inoculadas com os isolados de estreptomicetos. O crescimento em diferentes níveis de salinidade e pH foram avaliados em meio de cultura sólido AGS, com os níveis de NaCl 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3% e níveis de pH ajustados em 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0. Todos os isolados produziram as enzimas amilase, catalase e lípase, assim como o ácido indolacético. Todos os isolados apresentam atividade celulolítica e quitinolítica, com exceção do AC-92. Somente o AC-26 não demonstrou atividade xilanolítica. Os isolados AC-147, AC-95 e AC-29, foram os maiores produtores de sideróforos. Os isolados AC-26 e AC-29 não demonstraram a capacidade *in vitro* de solubilizar fosfatos. Todos os isolados colonizaram o sistema radicular das plântulas de tomateiro e AC-92 apresentou crescimento satisfatório em todos os índices de salinidade e pH avaliados. Os estreptomicetos testados neste estudo foram considerados potenciais agentes de biocontrole de doenças e promoção de crescimento de plantas.

Palavras chave: actinomicetos, ácido indolacético, enzimas, sideróforos.

MORPHOLOGIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SOIL STREPTOMYCETES WITH POTENTIAL FOR BIOCONTROL AND PLANT GROWTH PROMOTION

ABSTRACT

The selection of biocontrol and plant growth promotion bacteria, often include *in vitro* tests to determine the antagonistic activity against plant pathogens, root colonization, production of siderophores, extracellular enzymes and hormones. This work had the objective of characterizing six isolates of streptomycetes: *Streptomyces* sp. (AC-26); *Streptomyces thermotolerans* (AC-29); *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92); *Streptomyces* sp.N0035 (AC-95); *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) and *Streptomyces* sp. (AC-147). These isolates were tested for the production of extracellular enzymes, indol acetic acid, capacity for phosphate solubilization, root colonization and growth under different pH and salinity levels. For detection of enzyme activity, the isolates were grown in culture media with the enzyme substrates as sole carbon source. The root colonization assay was performed on tomato seedlings grown on 0.6% water-agar medium. Growth under different pH and salinity levels was evaluated in AGS medium with 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, and 3% NaCl, and pH levels adjusted to 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, and 7.0. All isolates produced the enzymes amylase, catalase, and lipase, as well as indol acetic acid. With the exception of AC-92, all isolates presented cellulolytic and chitinolytic activity. Only AC-26 did not show xylanolytic activity. The isolates AC-147, AC-95, and AC-29, were the highest producers of siderophores. The isolates AC-26 and AC-29 did not show capacity for phosphate solubilization. All isolates colonized tomato roots *in vitro*, and AC-92 grew under all pH and salinity levels tested. The streptomycetes tested as potential of biocontrol and plant growth promotion agents.

Key-words: actinomycetes, indol acetic acid, enzymes, siderophores.

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias do solo, Gram-positivas, aeróbias estritas, com ciclo de vida complexo, alternando a formação de esporos e micélio (Padilha, 1998). Dentre os agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas, os actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentam um papel importante na rizosfera de plantas, por influenciarem o seu crescimento, colonizando as raízes e agindo contra fitopatógenos, devido à produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (Coombs & Franco, 2003; Gava, 1998). Estes microrganismos são também conhecidos pela sua atuação nos processos de compostagem, devido à capacidade de produção de enzimas capazes de degradar moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilanose e lignina (Crawford, 1988).

Os sistemas de produção agrícola têm se tornado cada vez mais intensivos e dependentes dos agroquímicos, o que tem gerado problemas com o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos produtos utilizados e impactos ambientais negativos devido ao amplo espectro de ação destes produtos, atingindo organismos não-alvo e causando riscos à saúde humana e animal (Compant et al., 2005). Neste sentido, a utilização de microrganismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo apontada como uma alternativa viável para sistemas de produção agrícola ecologicamente e economicamente sustentáveis (Compant et al., 2005; Raupach & Kloepper, 1998).

Dentre as avaliações realizadas *in vitro* para a seleção de agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas, características como atividade antagonista ao patógeno (antibiose), capacidade de colonização do sistema radicular, produção de sideróforos, enzimas líticas e substâncias reguladoras de crescimento de plantas, entre outros são de fundamental importância (Cattelan, 1999). Contudo, os potenciais agentes de biocontrole e/ou promoção de crescimento necessitam ter competência rizosférica, ou seja, ter a capacidade de colonizar o sistema radicular e sobreviver no solo ou rizosfera, na presença da microbiota nativa (Compant et al., 2005). Estes autores indicam que a falta de competência rizosférica, determinada por fatores bióticos e abióticos que afetam a interação microrganismos-

planta, como sendo um dos principais fatores responsáveis pelo insucesso dos trabalhos de campo com os agentes de controle biológico.

A salinidade e o pH do solo são fatores abióticos que podem interferir na capacidade competitiva dos agentes selecionados, sendo, portanto, a tolerância a estes fatores, indicados como critérios para a seleção de microrganismos, visando à adaptação destes em solos ácidos ou salinos, considerando que estes microrganismos, ao colonizarem o sistema radicular, podem ter um efeito de proteção da planta nesses ambientes de estresse (Drozdowicz, 1987).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo, caracterizar seis isolados de estreptomicetos morfologicamente e com relação à produção de enzimas extracelulares, ácido indolacético e sideróforos, solubilização de fosfatos, além de avaliar a capacidade de crescimento em diferentes níveis de pH e salinidade e a colonização radicular *in vitro* de plântulas de tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação das espécies dos estreptomicetos

O sequenciamento do 16S rDNA dos actinomicetos foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo e a identificação dos isolados com base nas seqüências do 16S rDNA, foi realizada no Departamento de Biotecnologia do National Institute of Technology and Evaluation (NITE), no Japão.

Caracterização morfológica dos estreptomicetos

Os isolados de estreptomicetos estudados foram provenientes da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Escola de Agronomia da UFBA, e previamente selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento (Lima, 2002). Os isolados de estreptomicetos foram repicados na forma de estria em meio de cultura sólido YEM, com três estrias por placa. Foram adicionadas próximo às estrias em cada placa, três lamínulas estéreis inclinadas. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara de crescimento do tipo B.O.D., por oito dias, a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas com auxílio de uma pinça estéril e colocadas em lâminas

microscópicas contendo 1 gota da solução de lactofenol com azul de metila. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico, para observação do formato e tamanho das cadeias de esporos, presença de micélio aéreo. Foi observada também, a coloração das colônias e produção de pigmentos no meio de cultura pelos estreptomicetos.

Caracterização bioquímica dos estreptomicetos

Produção de quitinase

A atividade quitinolítica foi determinada conforme a metodologia descrita por Renwick et al., (1991), onde os isolados de estreptomicetos foram multiplicados em meio de sais minerais ágar (Tuite, 1969), suplementado com quitina coloidal, como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Após esse período, a atividade quitinolítica dos isolados foi avaliada pela formação de um halo hialino em torno das colônias crescidas.

Produção de celulase e xilanase

As atividades celulolítica e xilanolítica foram avaliadas conforme Lewis (1988), usando meio de sais minerais ágar (Tuite, 1969), suplementado com celulose ou xilana, como única fonte de carbono. Os isolados de estreptomicetos foram incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D., $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Após esse período, foram adicionados 10 mL da solução de vermelho congo a 0,5% em cada placa, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, foi drenado o excesso da solução vermelho congo e foram adicionados 10 mL da solução de NaCl (1 M) em cada placa, seguido de incubação por 30 minutos. Após ter removido o excesso da solução, verificou-se a formação do halo de coloração alaranjada em torno das colônias crescidas, indicando a atividade celulolítica e xilanolítica dos isolados.

Produção de lipase

A produção de lipase pelos isolados, foi avaliada no meio Sierra (1957), usando Tween 80 como fonte de carbono. Os isolados de estreptomicetos foram incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. A produção da

enzima foi detectada pela formação de um halo branco difuso, constituído de minúsculos precipitados de oleato de cálcio, ao redor das colônias crescidas dos microorganismos.

Produção de amilase

A produção de amilases foi determinada conforme descrito por Coon et al., (1957). Os isolados de estreptomicetos foram multiplicados no meio de cultura ágar amido, constituído de 0,2% de amido solúvel. Posteriormente, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 10 mL da solução de lugol nas placas. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio em torno da colônia, devido à hidrólise do amido.

Produção de catalase

Para determinar a produção da enzima catalase, os isolados de estreptomicetos, foram multiplicados em meio de cultura NYDA (Mariano et al., 2000) e as placas incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Após esse período foram adicionadas algumas gotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. A reação positiva foi evidenciada pela formação de bolhas imediatamente após a adição do peróxido de hidrogênio (Mariano et al., 2000).

Produção de sideróforos

Foi utilizada a metodologia proposta por Schwyn & Neilands (1987). Os isolados de estreptomicetos foram cultivados em meio de cultura líquido triptocaseína de soja, diluído (1/10) e os tubos de ensaio incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. A suspensão de células foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, sendo transferido 1mL do sobrenadante para tubos de ensaio esterilizados e, em seguida, adicionou-se 1mL da solução indicadora de cromoazurol S (CAS). A conversão da cor azul da solução CAS no sobrenadante para amarelo, no período de 15 minutos, indica que os isolados são produtores de sideróforos.

Produção de ácido indolacético

Para a determinação da produção de ácido indolacético, foi utilizada a metodologia de Bric et al., (1991). Os isolados de estreptomicetos foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja, diluído 1/10, acrescido com 5 mM de L-triptofano. Posteriormente, as culturas foram cobertas com uma membrana de nitrocelulose e as placas incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por dez dias. Após a incubação, as membranas foram removidas e saturadas com solução de Salkowski (Gordon & Weber, 1951). Os isolados que formaram halo avermelhado na membrana, no período de 30 minutos, foram considerados produtores de ácido indolacético.

Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfatos foi determinada segundo o método proposto por Katznelson & Bose (1959). Os isolados de estreptomicetos foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja, diluído 1/10 e acrescido de CaHPO_4 , e as placas incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^\circ\text{C}$, por dez dias. Após esse período, a solubilização de fosfatos foi detectada pela formação de halo claro em torno das colônias crescidas dos isolados de estreptomicetos.

Crescimento em meio de cultura AGS (arginina-glicerol-ágar) com diferentes níveis de NaCl.

Para avaliar o crescimento dos isolados de estreptomicetos, no meio de cultura AGS sólido (Poter et al., 1960), com diferentes níveis de NaCl, foi montado um bioensaio em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com seis isolados de estreptomicetos e cinco níveis de NaCl, com quatro repetições. Os isolados foram repicados nas placas de Petri, contendo meio de cultura AGS com os seguintes níveis de NaCl (1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; e 3,0%). Como testemunha, os isolados foram cultivados em meio AGS, com adição de 0,5% de NaCl (meio de cultura comum). Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias, sendo observado o crescimento dos isolados de estreptomicetos.

Crescimento em meio de cultura AGS (arginina-glicerol-ágar) com diferentes níveis de pH

Para avaliar o crescimento dos isolados de estreptomicetos, no meio de cultura AGS (Potter et al., 1960), com diferentes níveis de pH, foi montado um bioensaio em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com seis isolados de estreptomicetos e cinco níveis de pH, com quatro repetições. Os isolados foram repicados em placas de Petri, contendo meio de cultura AGS com os diferentes níveis de pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0), ajustados com as soluções de HCl a 1,0 N e NaOH a 0,5 mol, e acrescido de solução tampão de fosfato. Como testemunha, os isolados foram cultivados em meio AGS, com pH ajustado em 7,9 – 8,2 (padrão para o crescimento). Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias, sendo observado o crescimento dos isolados de estreptomicetos.

Colonização *in vitro* das mudas de tomateiro pelos isolados de estreptomicetos

Para avaliar a capacidade *in vitro* dos isolados de estreptomicetos em colonizar o sistema radicular das mudas de tomateiro, foi montado um bioensaio em delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis isolados de estreptomicetos e cinco repetições. Inicialmente, as sementes de tomateiro cv. Santa Clara foram desinfestadas pela imersão nas soluções de álcool 70% (3 minutos) e hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), seguida de seis lavagens consecutivas em água destilada. Após desinfestadas, as sementes foram secas em papel de filtro estéril e transferidas, com auxílio de uma pinça estéril, para tubos de ensaio (três sementes/tubo), contendo meio ágar-água com 0,6% de ágar. Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento sem luz, a temperatura de 30°C , até a emissão da radícula (período de 3 a 4 dias). Após a emissão da radícula, com auxílio de uma alça de platina, fez-se a raspagem dos estreptomicetos cultivados por oito dias em placa de Petri com meio AGS e os esporos foram colocados próximo à radícula. Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura e luminosidade ambiente, sendo observados diariamente para avaliação visual da colonização radicular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação das espécies de estreptomicetos

Com base no sequenciamento do 16S rDNA, os isolados de estreptomicetos foram identificados como *Streptomyces thermotolerans* (AC-29), *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92), *Streptomyces purpuraceans* (AC-103), *Streptomyces* N0035 (AC-95) e *Streptomyces* sp. (AC-26) e (AC-147).

Caracterização morfológica dos estreptomicetos

Em geral, as colônias de esporaactinomicetos apresentam consistência cartilaginosa, aderindo firmemente ao meio sólido através do micélio vegetativo, e podem ser reconhecidas utilizando-se um microscópio estereoscópio. Em particular, o grupo *Streptomyces* apresenta colônias pulverulentas ou velutinas, com micélio aéreo de diferentes tonalidades (Araújo, 1998). As colônias também podem produzir pigmentos solúveis de cores diversas. Contudo, estas características fenotípicas dependem da composição do meio de cultura (Cross, 1989). A Tabela 1 apresenta as características fenotípicas dos estreptomicetos estudados. Os isolados de estreptomicetos apresentavam diferentes tonalidades de coloração do micélio aéreo (Figura 1).

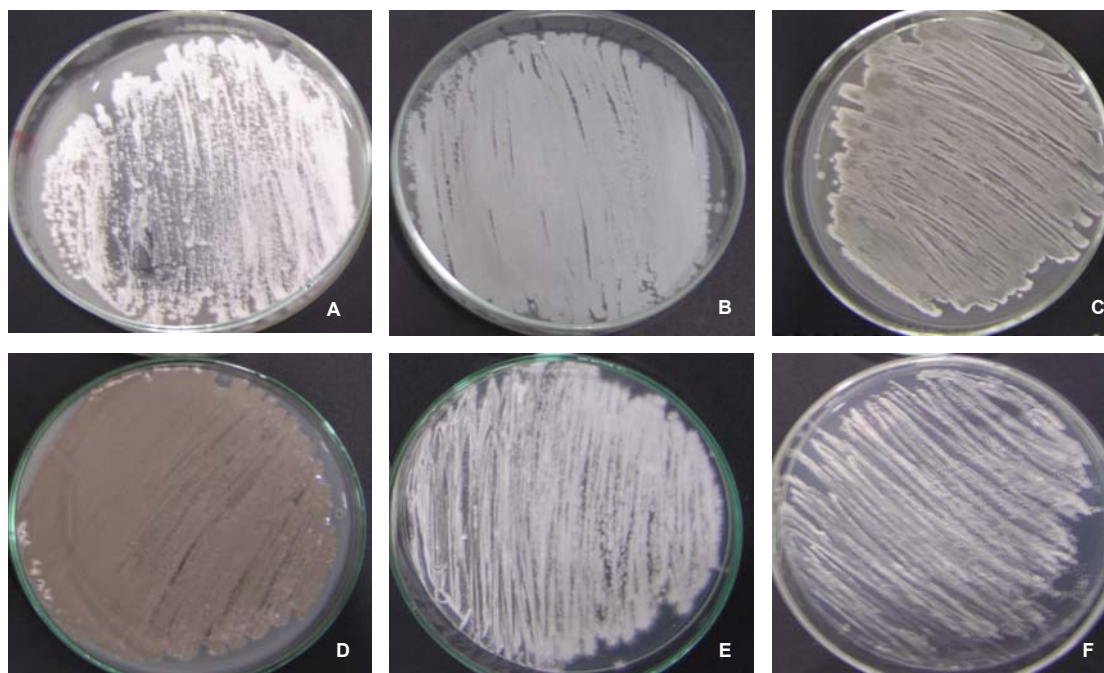


Figura 1. *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) - A; *Streptomyces thermotolerans* (AC-29) - B; *Streptomyces* sp. (AC-147) - C; *Streptomyces* N0035 (AC-95) - D, *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92) - E, *Streptomyces* sp. (AC-26) - F, após 8 dias de cultivo em meio de cultura AGS. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Tabela 1. Caracterização morfológica dos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Cadeia de esporos		Micélio aéreo	Cor da colônia	Produção de pigmentos
	Formato	Comp.			
<i>Streptomyces</i> sp (AC-26)	Flexuosa	Longa	Presente	Branca	Ausente
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	Flexuosa	Longa	Presente	Azul	Marrom
<i>S. griseus</i> subsp <i>griseus</i> (AC-92)	Flexuosa	Longa	Presente	Bege	Ausente
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	Flexuosa	Longa	Presente	Cinza escuro	Ausente
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	Flexuosa	Longa	Presente	Branca	Marrom
<i>Streptomyces</i> sp (AC-147)	Flexuosa	Longa	Presente	Cinza claro	Ausente

Os isolados, com exceção do *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92) apresentaram atividade quitinolítica (Tabela 2). A produção de quitinase pelos isolados de estreptomicetos pode ser um mecanismo utilizado no biocontrole, principalmente de fungos fitopatogênicos, considerando que a parede celular desses microorganismos é composta basicamente por polissacarídeos como a quitina e glucana (Gooday, 1990; Gooday et al., 1992).

Com exceção do *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92), os isolados de estreptomicetos apresentaram atividade celulolítica (Tabela 2). A celulose é o polissacarídeo mais abundante na biomassa vegetal (20 a 50%), formado por cadeias de unidades de glicose, ligando-se ao C-4 da unidade seguinte por uma ligação de glicosídeo ou ligação β 1-4, sendo degradado por uma série de microorganismos por meio da ação de várias enzimas, como a celulase (Murashima, et al, 2002; Lynd, et al, 2002). Os microorganismos celulolíticos, ao atacarem a celulose, clivam sua molécula de alto peso molecular, desdobrando-a com celobiose (um dissacarídeo, com glicose ligada à glicose) e glicose livre, pela ação da celulase (β 1,4 glucosidase). Microorganismos aeróbios oxidam a glicose via CTA, enquanto os anaeróbios fermentadores produzem, a partir da glicose, acetato, propionato, butirato, H₂ e CO₂, como principais produtos (Moreira & Siqueira, 2002). Estes microrganismos têm um papel importante na decomposição da matéria orgânica e conseqüente promoção de crescimento de plantas por meio da mineralização de nutrientes. Também podem agir como agentes de biocontrole de microrganismos que possuem celulose (17-25%) na composição da parede celular como, alguns gêneros de fungos fitopatogênicos, como *Phytophthora* e *Pythium* (Lima, 1998)

Tabela 2. Produção de enzimas extracelulares pelos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Enzimas extracelulares					
	Quitinase	Celulase	Xilanase	Amilase	Catalase	Lipase
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-26)	+	+	-	+	+	+
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	+	+	+	+	+	+
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> (AC-92)	-	-	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	+	+	+	+	+	+
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	+	+	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-147)	+	+	+	+	+	+

Apenas o isolado *Streptomyces* sp. (AC-26), não apresentou atividade xilanolítica (Tabela 2). A xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste de uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (Biely, 1993). A produção de xilanase pelos isolados de estreptomicetos, indica que estes microorganismos atuam nos processos de decomposição de compostos orgânicos, liberando nutrientes e outros compostos que favorecem a melhoria do estado nutricional e o crescimento das plantas.

Todos os isolados demonstraram ser produtores das enzimas lípase, amilase e catalase (Tabela 2), que também apresentam papel importante na promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas. Os lipídeos produzidos pelas plantas e animais são ésteres complexos de ácidos graxos e álcoois, sendo que pouco se conhece da sua degradação, mas sabe-se que a cutina, lipídio que se assemelha à celulose por sua longa cadeia, pode ser atacada por leveduras e bactérias dentre elas do gênero *Streptomyces* (Moreira & Siqueira, 2002). O amido é uma mistura de dois polímeros de glicose: amilose e amilopectina, sendo o mais importante composto orgânico de reserva das plantas. Poucos microorganismos parecem ser aptos a degradar o amido. Dentre os bons degradadores estão os actinomicetos que produzem ácidos orgânicos, CO₂ e dextrinas durante a decomposição (Moreira & Siqueira, 2002). A Figura 2 ilustra a produção das enzimas extracelulares pelos isolados de estreptomicetos.

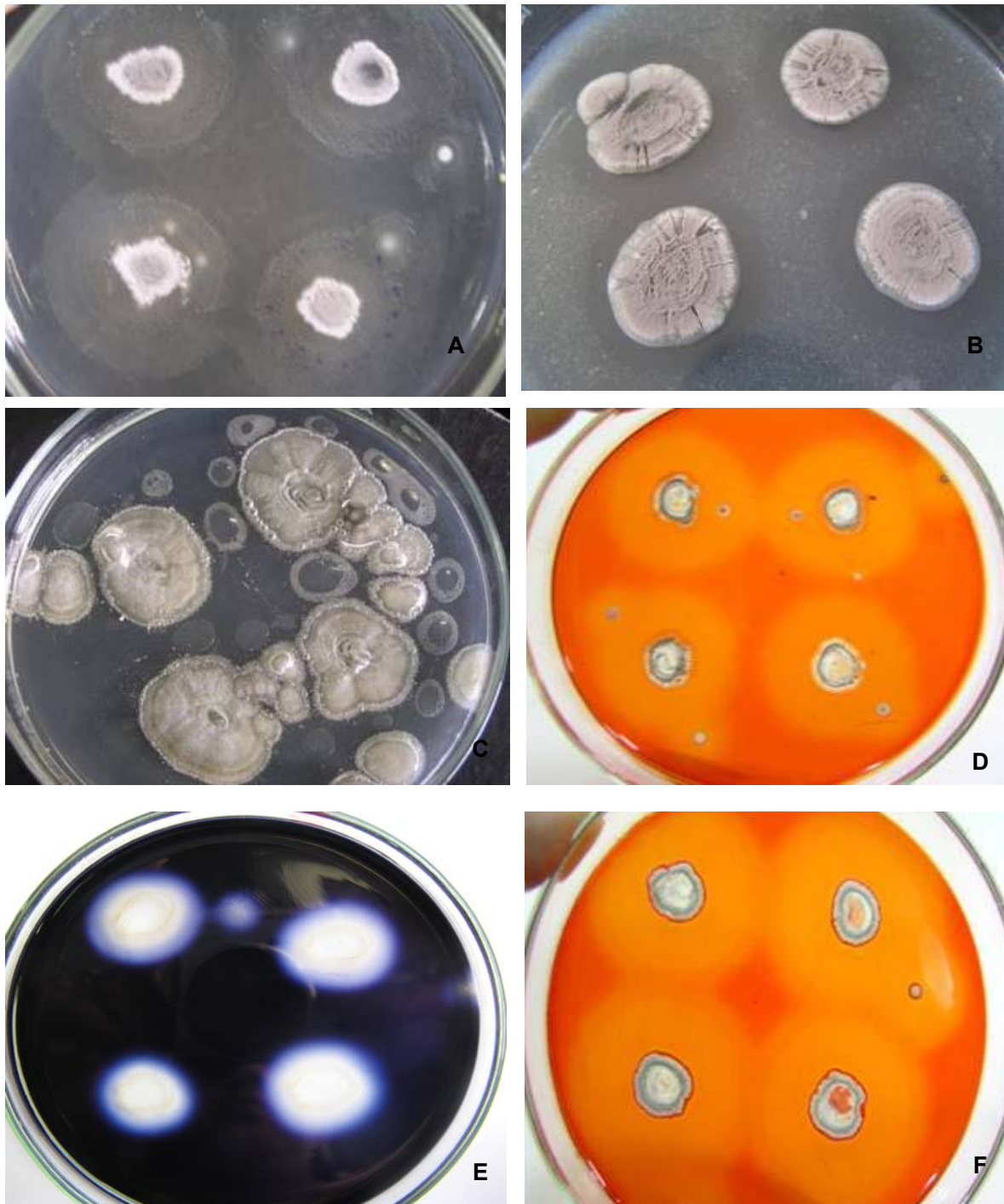


Figura 2. Produção de enzimas extracelulares pelos isolados de estreptomicetos. lipase AC-103 (A); quitinase AC-147 (B); catalase AC-92 (C); celulase AC-26 (D); amilase AC-95 (E) e xilanase AC-29 (F). Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Ocorreu variabilidade entre os isolados, quanto à capacidade de produzir sideróforos (Tabela 3 e Figura 2), sendo os maiores produtores os isolados *Streptomyces* sp (AC-147); *Streptomyces* N0095 (AC-95) e *Streptomyces thermotolerans* (AC-29). A produção de sideróforos confere aos microrganismos maior competitividade no solo, uma vez que os sideróforos atuam como moléculas seqüestradoras de ferro, secretadas por microorganismos em resposta a baixa disponibilidade de Fe^{+3} (Scher & Baker, 1982; Oliveira et al., 2003). Estes compostos atuam do lado externo da membrana celular, capturando moléculas de ferro em solução e ligando-as especificadamente a receptores do complexo localizado na membrana, por onde são absorvidos, tornando assim o ferro disponível para o crescimento dos vegetais (Neilands & Leong, 1986). Estes compostos atuam como promotores de crescimento de plantas devido à capacidade de inibir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, devido à retenção do Fe^{+3} , tornando-o indisponível para os patógenos (Wei et al., 1996).

Os vegetais dificilmente sofrem limitações de crescimento por deficiência de ferro nestas condições, por possuírem na membrana moléculas receptoras do complexo ferro-sideróforo bacteriano (Bar-Ness et al., 1992). Este mecanismo de controle é eficaz somente quando a disponibilidade de Fe^{+3} é muito baixa, sendo esta disponibilidade relacionada ao pH do solo, de modo que em menores valores de pH, ocorre maior disponibilidade de Fe^{+3} (Oliveira et al., 2003).

Tabela 3. Produção de sideróforos, ácido indolacético, capacidade de solubilização de fosfatos e colonização radicular *in vitro* de mudas de tomateiro pelos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Sideróforos*	Ácido indolacético	Solubilização de fosfato	Colonização radicular **
<i>Streptomyces</i> sp (AC-26)	+	+	-	+
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	+++	+	-	+
<i>S. griseus</i> subsp griseus (AC-92)	+	+	+	+
<i>S. N0035</i> (AC-95)	+++	+	+	+
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	++	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp (AC-147)	+++	+	+	+

* Produção de sideróforos com base na intensidade da cor do meio de cultura: (+++) produção intensa (amarelo); (++) produção moderada (alaranjado); (+) produção fraca (vermelho) e (-) sem produção (roxo)

** Presença de colonização radicular (+); Ausência de colonização radicular (-)

A produção de reguladores de crescimento ativos como fitohormônios faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais, causando modificações na morfologia das raízes, influenciando na absorção de nutrientes e água e, conseqüentemente, favorecendo o crescimento vegetal (Bashan & Holguim, 1997). Todos os isolados de estreptomicetos avaliados demonstraram ser produtores de ácido indolacético (Tabela 3), detectada através da formação de halo avermelhado nas membranas de nitrocelulose (Figura 3). Tien et al., (1979) observaram um aumento no número de raízes laterais e de pêlos radiculares em milho (*Pennisetum americanum* L.), cultivado em condições axênicas, em resposta à inoculação com *Azospirillum brasiliense*. Estes autores observaram a produção de ácido indolacético (AIA), giberelinas e citocianinas por essa bactéria. Efeitos semelhantes foram observados em tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) inoculado com *A. brasiliense* (Hadas & Okon, 1987) e em soja (*Glycine max* L. Merr.), inoculada com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. (Cattelan, 1993; Catellan, 1995)

Dentre as vias de biossíntese conhecidas do ácido indolacético, estão as vias dependentes de triptofano e as vias independentes deste aminoácido, que ocorrem a partir de seus precursores 3-indolacetamina, ácido 3-indolpirúvico e 3-indolacetoneitrilo (Patten & Glick, 1996). Através da produção de fitohormônios, os microorganismos podem promover um estímulo ao crescimento vegetal, além de aumentar a produção de metabólitos pelas plantas que podem ser utilizados para o seu próprio crescimento (Oliveira et al., 2003). Estes ainda podem exercer a função de detoxicação celular causada por elevados teores de triptofano (Manulis et al., 1998). A capacidade dos microorganismos produzirem auxinas está relacionada a fatores de patogenicidade e de estímulos ao crescimento vegetal (Oliveira et al., 2003). A promoção de crescimento vegetal está associada ao nível populacional da espécie microbiana presente, que irá refletir na quantidade de fitohormônio disponível para a planta, o que irá afetar quanto à promoção ou à inibição do crescimento das raízes, e este nível está sujeito a vários mecanismos de regulação (Patten & Glick, 1996).

Os isolados de estreptomicetos, com exceção dos isolados *Streptomyces* sp (AC-26) e *Streptomyces thermotolerans* (AC-29), apresentaram a capacidade *in vitro* de solubilização de fosfatos (Tabela 3), visualizada através da formação de halo opaco em torno das colônias crescidas (Figura 3). Jing & Sato (1994) estudaram

bactérias rizosféricas de trigo (*Triticum aestivum* L.) com 26 a 68 dias de crescimento e observaram que havia correlação linear positiva entre o crescimento das plantas e o número das bactérias solubiladoras de P ($r=0.73$), destacando as *Pseudomonas fluorescentes* ($r=0.68$) e as bactérias celulolíticas ($r=0.72$).

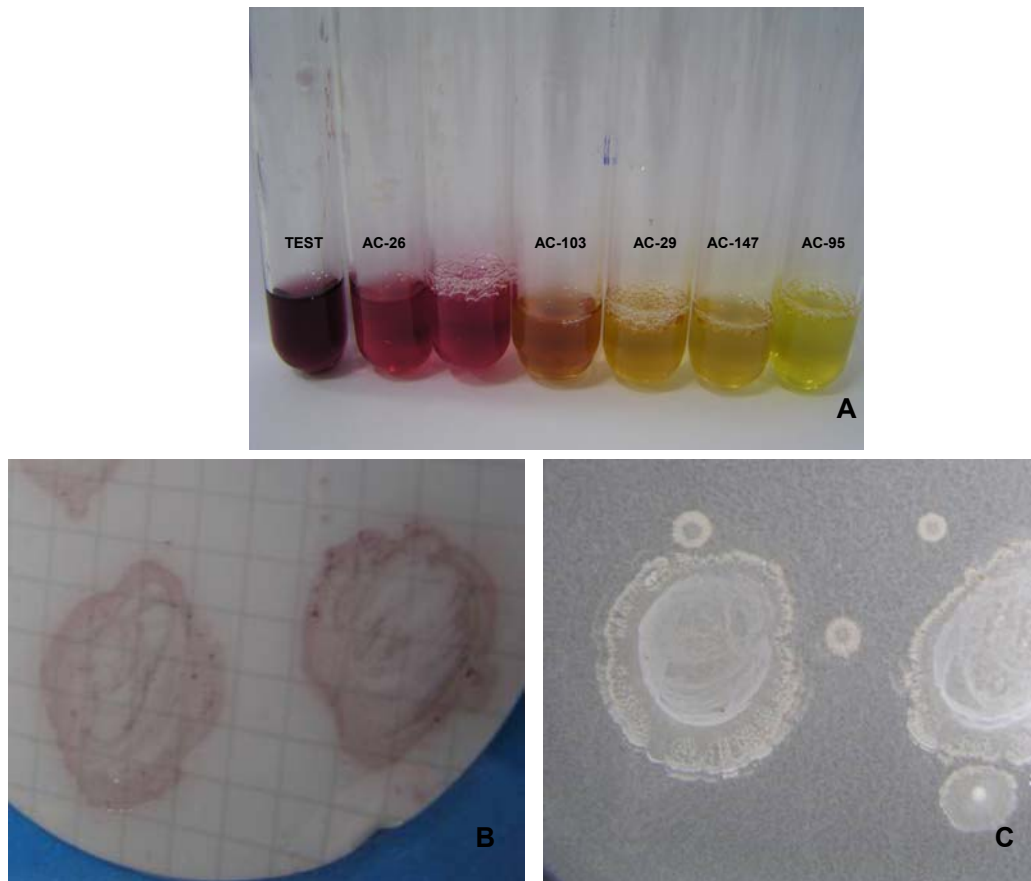


Figura 3. Produção de sideróforos (A); ácido indolacético AC-92 (B) e solubilização de fosfatos AC-103 (C) pelos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

A solubilização biológica é uma alternativa para a maior eficiência na utilização de fosfatos naturais. O principal mecanismo de ação na solubilização de P mineral é através dos ácidos orgânicos sintetizados por microorganismos, o que também promove a acidificação da célula microbiana e o ambiente ao seu redor. Entre estes ácidos, o ácido glucônico aparece como o agente mais freqüente de solubilização. Outros ácidos envolvidos na solubilização de fosfatos são os ácidos 2-cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, e acético (Rodriguez & Fraga, 1999). Além dos ácidos orgânicos, a liberação de prótons H^+ para a superfície celular

externa das ATPases, a produção de substâncias quelantes ou a produção de ácidos orgânicos (sulfídrico, nítrico e carbônico), podem construir mecanismos alternativos na solubilização de fosfatos orgânicos (Oliveira et al., 2003). A solubilização do P-orgânico, também chamada de mineralização, ocorre a partir de restos vegetais e animais contendo elevados teores de compostos fosfatados (Oliveira et al., 2003). As principais moléculas fornecedoras de P através da mineralização são os ácidos nucléicos, fosfolípidos e açúcares fosfatados, facilmente degradados, e o ácido fítico, polifosfatos e fosfatados que são mineralizados mais lentamente. Esta mineralização é promovida por enzimas chamadas fosfatases, ou fosfohidrolases, classificadas em ácidas ou alcalinas de acordo com o pH ótimo de atividade. Estas enzimas podem ser secretadas fora da membrana plasmática, ou permanecerem retidas na membrana como proteínas solúveis (Rodríguez & Fraga, 1999).

Todos os isolados de estreptomicetos colonizaram *in vitro* o sistema radicular das plântulas de tomateiro. A constante exsudação de compostos das células radiculares e dos microorganismos, como aglutininas, lecitinas, flavonóides e polissacarídeos são responsáveis pelo reconhecimento microorganismo-planta (Aguillar et al., 1988; Kijine et al., 1988) e o efeito rizosférico que culmina na colonização radicular por microorganismos (Chet et al., 1990; Kortemaa et al., 1994). Contudo, o efeito rizosférico não é específico, ou seja, não ocorre o favorecimento de determinada espécie microbiana pelos compostos exsudados das raízes (Moreira & Siqueira, 2002).

Tabela 4. Crescimento dos isolados de estreptomicetos em meio de cultura AGS com diferentes faixas de pH. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	-----pH-----				
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-26)	-	-	+	+	++
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	++	+++	+++	+++	+++
<i>S. griseus</i> subsp. <i>Griseus</i> (AC-92)	++	+++	+++	+++	+++
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	+	++	+++	+++	+++
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	+	+	++	+++	+++
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-147)	+	+	+	++	++

(+++) Muito crescimento; (++) Crescimento médio; (+) Pouco crescimento; (-) Sem crescimento.

De um modo geral, observou-se melhor crescimento dos isolados de estreptomicetos em níveis de pH superiores a 6,5, sendo considerado ótimo o pH 7,0 (Tabela 4). Gava (1998) relatou que a maioria de actinomicetos isolados de solo rizosférico e não-rizosférico, crescem na faixa de pH de 6,5 a 8,0.

Somente os isolados *Streptomyces thermotolerans* (AC-29) e *Streptomyces griseus* subsp. *Griseus* (AC-92) apresentaram boa multiplicação, caracterizada pelo abundante crescimento micelial no meio de cultura com pH entre 5,0 e 5,5 (Figura 4), sendo estes considerados ácido tolerantes (Moreira e Siqueira, 2002). Pesquisas realizadas por Coelho & Drozdowicz, (1998), em solos ácidos (pH 4,9) no cerrado brasileiro, mostraram uma população microbiana bastante numerosa e rica em actinomicetos. Os resultados deste trabalho sugerem adaptabilidade destes microorganismos a essas condições ambientais, o que lhes pode conferir boa capacidade de competição e sobrevivência em solos ácidos.

Tabela 5. Crescimento dos isolados de estreptomicetos em meio de cultura AGS com diferentes níveis de salinidade. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Níveis de salinidade (% NaCl no meio de cultura)				
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-26)	++	++	++	+	+
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	++	++	++	+	+
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> (AC-92)	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	++	++	+	+	+
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	++	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-147)	+	+	+	+	+

(+++) Muito crescimento; (++) Crescimento médio; (+) Pouco crescimento; (-) Sem crescimento.

O crescimento dos isolados no meio de cultura AGS, com diferentes níveis de NaCl (variando de 1 a 3 %), sugere tolerância a salinidade e adaptabilidade destes isolados a condições adversas. Somente o isolado *Streptomyces griseus* subsp. *Griseus* (AC-92) apresentou crescimento satisfatório em todos os níveis de salinidade avaliados (Tabela 5), indicando que este possui maior tolerância à salinidade, o que deve favorecer a adaptação desse microorganismo em ambientes adversos, conferindo-lhe maior capacidade competitiva e, possivelmente, ação de proteção da planta a estas condições ambientais, caso este isolado apresente

competência rizosférica. O isolado *Streptomyces griseus* subsp. *Griseus* (AC-92) apresenta a capacidade de colonização radicular, quando inoculado em plântulas de tomateiro propagadas *in vitro* (Tabela 3). Estudos futuros deverão avaliar a sobrevivência e capacidade competitiva deste isolado, em relação à microbiota nativa do(s) substratos.

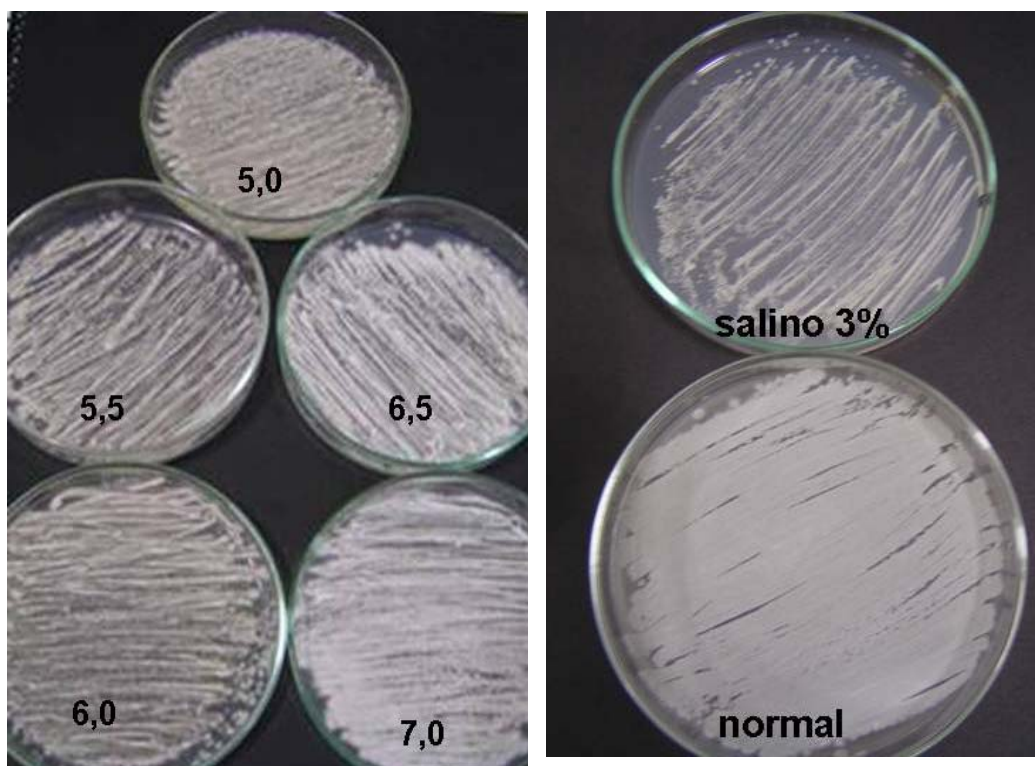


Figura 4. Crescimento do isolado *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92) após 8 dias de cultivo em meio AGS com diferentes níveis de pH e crescimento do isolado *Streptomyces thermotolerans* (AC-29) após 8 dias de cultivo em meio AGS normal e com 3% de NaCl.

A ocorrência de actinomicetos nos diferentes ecossistemas decorre da sua diversidade metabólica e da evolução de mecanismos específicos de dispersão e adaptabilidade às diferentes condições ambientais. Esta diversidade metabólica permite que estes microorganismos sobrevivam em ambientes salinos, ácidos, com elevada temperatura, indicando a grande capacidade de se adaptarem a ambientes extremos (Araújo, 1998). Esses microorganismos apresentam elevada capacidade competitiva na presença da microflora nativa, permitindo o seu estabelecimento nos

ambientes onde são introduzidos (Habe & Uesughi, 2000), podendo favorecer o estabelecimento de espécies vegetais em condições ambientais adversas.

CONCLUSÕES

1. Todos os isolados são produtores das enzimas extracelulares amilase, catalase e lipase, além do ácido indolacético e colonizadores do sistema radicular de plântulas de tomateiro;
2. Somente o isolado AC-26 não apresentou atividade xilanolítica e o isolado AC-92 não produz quitinase e celulase;
3. Os isolados AC-29, AC-95 e AC-147 são os mais produtores de sideróforos e somente os isolados AC-26 e AC-29 não são solubilizadores de fosfatos;
4. O isolado AC-92 apresentou crescimento satisfatório em todos os níveis de pH e salinidade avaliados. Os isolados AC-103 e AC-147 demonstraram baixa tolerância níveis de pH abaixo de 6,0 e níveis de salinidade acima de 1%;
5. Todos os isolados apresentaram cadeia de esporos longa e flexuosa, presença de micélio aéreo com diferentes tonalidades de acordo com o isolado. Os isolados AC-29 e AC-103 produziram pigmentos de coloração marrom no meio de cultura YEM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILLAR, J. M. M. et al. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* towards flavonoids inducers of the symbiotcs nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, St. Paul., v. 1345, p.2741- 2746.1988.

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S de; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p. 351-367.1998.

BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; SHANZER, A.; LIBMAN, J. Iron uptake by plants from microbial siderophores. A sudy with 7-nitrobenz-2 Oxa-1,3-diazole-des-ferrioxamine

as fluorescent ferroxiamine B analog. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 99, p.1329-1335, 1992.

BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In **Hemicellulose and hemicellulases** COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, A. (Eds.). p. 29-51, 1993.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in so assay for indolacético acid production by bacteria immobility on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 57, p. 535-538, 1991.

CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa-Soja, 36p. 1999.

CATTELAN, A.J. Aumento no desenvolvimento de plantas de soja através da inoculação com bactérias promotoras de crescimento. In. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 24., 1993. Goiânia. Cerrados: fronteira agrícola no século XXI – resumos. Goiânia: SBCS, p.341-342, 1993.

CATTELAN, A.J. Aumento no número de pêlos radiculares em plântulas de soja inoculadas com bactérias promotoras do crescimento. In: Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo, 3.; Reunião de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, 6., 1994, Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, p. 393-397, 1995.

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

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. G. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Reviwes Ecologic Biology Soil**. France, v. 15, p. 459-473. 1998.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future perspectives. **Applied and environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951-4959, 2005.

COOMBS, J.T.; FRANCO, M.M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.9, p.5603-5608, 2003.

COON, H.J.; JENNISON, M.W. & WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: **Manual of Microbiological Methods** (ed. Society of American Bacteriologists). New York. McGraw-Hall. p.239-262.1957.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: (Goodfellow M, Williams, S.T., Mordarski, M. eds) **Actinomycetes in Biotechnology**, Academic Press, London. p. 443-459.1988.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes – Some guidelines. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9^a ed. Baltimore: Willians & Wilkins, v.4, p. 2340-2343. 1989.

DROZDOWICZ, A. G. Microbiologia do solo. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Tratado de microbiologia**. São Paulo. Manole, v. 2, p.17-28. 1987.

GAVA, C. A. T. **Seleção de estreptomicetos para controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora***. 1998, 114f, Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Seropédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

GOODAY, G. The ecology of chitin degradation. **Microbiology Ecologic**. v. 10, p. 387-431. 1990.

GOODAY, G.H., ZHU, W. Y., DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus. **FEMS: Microbiology. Let.** 100: 387-392. 1992.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 26, p. 192-195, 1951.

HABE, M. H.; UESUGHI. C. H. Método in vitro para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.4, p. 657-660, 2000.

HADAS, R. OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasiliense* inoculation of root morphology and respiration in tomato seedlings. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.5, p.241-247.1987.

JIANG, H-Y; SATO, K. Interrelationships between bacterial populations on the root surface of wheat and growth of plant. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.40, p.683-689, 1994.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, p. 79-85, 1959.

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

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

LEWIS, K.J. Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler. PhD Thesis. Sheffield. University of Sheffield. 1988.

LIMA, L.H.C.; DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle por micoparasitismo. In: MELO, I. S de & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, v.2, p. 263-304. 1998

LIMA, J.L. **Seleção de actinomicetos para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias. Cruz das Almas, Universidade Federal da Bahia, 2002. 63 p.

LYND, L. R.; P. J. WEIMER, W. H. VAN ZYL Y I. S. PRETORIUS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biologic Reviews**. v. 66, p. 506-577, 2002.

MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: O autor. 2000. p.115-119.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDI, M.T.; LINDOW, S. E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophilae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.11, n.7, p.634-642, 1998.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 2002. 626p.

MURASHIMA, K.; A. KOSUGI Y R. H. DOI. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 5088-5095, 2002.

NEILANDS, J.B.; LEONG, S.A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Reviews in Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p. 187-208, 1986.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p.327-343.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, 9.207-220, 1996.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**. v.8, p.174-178, 1960.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R. COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potencial biocontrol agents o *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, London, v.40, p. 524-532, 1991.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.

SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p. 1567-1573, 1982.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analitycal Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorgasnisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Laeuwenhoek*, v. 23, p. 15-22, 1957.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBEEL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum*

americanum L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis. Burgess Publishing Company. 1969.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, St Paul, v. 86, n.2, p. 221-224. 1996.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE MUDAS DE TOMATEIRO EM SUBSTRATO ORGÂNICO INCUBADO COM ESTREPTOMICETOS¹

¹ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Plant and Soil

PRODUÇÃO DE MUDAS DE TOMATEIRO EM SUBSTRATO ORGÂNICO INCUBADO COM ESTREPTOMICETOS

RESUMO

A cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) é suscetível a várias doenças e exigente em termos de nutrição. A busca por alternativas tecnológicas de produção, menos agressivas ao meio ambiente e sustentáveis, tem intensificado os estudos com actinomicetos em programas de controle biológico e promoção de crescimento de plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a inoculação e incubação do substrato orgânico de produção de mudas, com diferentes isolados de estreptomicetos no crescimento de mudas de tomateiro. No primeiro ensaio, avaliou-se a inoculação de quatro isolados de actinomicetos mais o controle não inoculado, sem incubação e com 20 dias de incubação, em esquema fatorial (5 x 2) e delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições. A inoculação e incubação do substrato com os estreptomicetos aumentou a altura das plantas, a produção de matéria seca da parte aérea e raízes, o diâmetro do caule e o acúmulo de nutrientes na parte aérea das mudas de tomateiro. Contudo, a inoculação sem o período de incubação, não demonstrou efeito no crescimento das mudas. No segundo ensaio, avaliou-se a inoculação dos dois melhores estreptomicetos na promoção do crescimento das plantas de tomateiro produzidas em substrato orgânico incubado por cinco períodos diferentes (0, 15, 30, 45 e 60 dias), em esquema fatorial 2 x 5 e delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. Foram avaliadas as seguintes características: altura da planta, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea e da raiz. Quarenta e três dias foi o melhor período para incubação, provavelmente, por ser o tempo necessário para que os estreptomicetos possam colonizar e atuar na decomposição do substrato orgânico, disponibilizando nutrientes para as raízes e permitindo o crescimento vegetal.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, promoção de crescimento de plantas, *Streptomyces* sp.

TOMATO SEEDLINGS GROWN IN ORGANIC POTTING MIX INCUBATED WITH STREPTOMYCETES

ABSTRACT

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is susceptible to several diseases and demands several agricultural chemical inputs. The search for alternative production technologies which cause less environmental impacts and more sustainability, has intensified and include studies on actinomycetes. This work had the objective of evaluating the effect of inoculation and incubation of a potting soil with streptomycetes in growth promotion of tomato seedlings. The first experiment was conducted with four streptomycete isolates, with and without incubation for 20 days. The experimental design was entirely randomized with 15 replicates, in a factorial scheme (5 x 2). The inoculation and incubation of the potting mix promoted a significant increase in plant height, stem diameter, root and shoot dry weight, and plant nutrient levels. However, without incubation there was no significant plant growth promotion. In the second experiment, the inoculation with the two best isolates, in five different incubation periods (0, 15, 30, 45, and 60 days) was evaluated for growth of tomato seedlings in the same potting growth mix, using an entirely randomized experimental design with 8 replicates and a factorial scheme 2 x 5. The following parameters were evaluated: plant height, stem diameter and root and shoot dry weight. Forty three days was considered to be the best incubation period, indicating that this may be the time necessary for the streptomycete isolates to colonize and act in the decomposition of the organic matter, improving nutrient uptake by the roots, and promoting plant growth.

Key-words: *Lycopersicon esculentum*, plant growth promotion, *Streptomyces* sp.

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos, principalmente os pertencentes ao gênero *Streptomyces*, compõem um importante grupo de bactérias do solo, pertencentes à classe Actinobacteria, família *Streptomycetaceae*, sendo conhecidos pela ampla capacidade de produção de metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas extracelulares (Inbar et al., 2005). Estes microrganismos, de ocorrência abundante em solos, atuam na degradação de moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilana e lignina, desempenhando um papel importante nos processos de compostagem (Crawford, 1988; Lynd et al., 2002; Murashima et al., 2002; Petrosyan et al., 2003; Ding et al., 2004). Além da atuação na decomposição da matéria orgânica, estes microrganismos apresentam grande potencial como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Hoster et al., 2005; Thirup et al., 2001; El-Tarabily et al., 2000; Schottel et al., 2001) e/ou de promoção de crescimento de plantas (Nassar et al., 2003, Cattelan e Hartel, 2000), devido à capacidade de produção de antibióticos, sideróforos, enzimas com ação antimicrobiana, substâncias promotoras de crescimento de plantas e competição com fitopatógenos por substrato (Cattelan e Hartel, 2000; Crawford et al., 1993).

As plantas se beneficiam dos actinomicetos, com maior crescimento da parte aérea e das raízes, devido à produção substâncias reguladoras do crescimento vegetal, colonização dos actinomicetos na rizosfera, reduzindo a microflora deletéria pela produção de compostos inibitórios (El-Abyad et al., 1993), aumento da absorção de nutrientes (Saracchi et al., 1992), degradação da matéria orgânica (Inbar et al., 2005), colonização endofítica e produção de metabólitos secundários (Saracchi et al., 1992).

As actinomicetos são freqüentemente isolados de compostos orgânicos e materiais em decomposição. A utilização de compostos orgânicos na composição de substratos de produção de mudas e/ou a utilização de produtos de compostagem de resíduos industriais, urbanos ou agrícolas na agricultura, permite a introdução deste grupo de bactérias na rizosfera, aumentando a microbiota ativa e a matéria orgânica disponível (Inbar et al., 2005).

A decomposição de resíduos do beneficiamento da madeira (pó de serra) e da celulose (casca de pinus) por microrganismos celulolíticos promoveu o maior crescimento do tomateiro, sendo este resultado atribuído a mineralização dos nutrientes, a decomposição de compostos fenólicos, alteração do pH do composto e a outros mecanismos que devem ser mais investigados (Kostov et al., 1991).

A produção de hortaliças de boa qualidade depende, dentre outros fatores, da qualidade do substrato utilizado na fase de produção de mudas, sendo seu crescimento dependente das características químicas, físicas e biológicas do substrato (Bellé & Kampf, 1993; Carneiro, 1995). Substratos orgânicos são comumente utilizados para a produção de mudas de hortaliças, frutíferas e essências florestais, sendo composto basicamente por material vegetal. A celulose e a xilana são os principais polímeros encontrados na lignocelulose, sendo a celulose um dos componentes mais abundantes na biomassa vegetal, formado por cadeias de unidades de glicose, ligando-se ao C-4 da unidade seguinte por uma ligação de glicosídeo ou ligação β -1,4 (Moreira & Siqueira, 2002). A xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste de uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (Biely, 1993). A decomposição de componentes orgânicos nos substratos de produção de mudas hortícolas e frutíferas proporciona a mineralização dos nutrientes e maior absorção destes pelas raízes, favorecendo o crescimento das plantas e o melhor aproveitamento dos substratos (Dick & McCoy, 1993).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação e do melhor período de incubação do substrato com isolados de estreptomicetos sobre o crescimento de mudas de tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do inóculo de estreptomicetos

Os isolados de estreptomicetos estudados foram: *S. thermotolerans* (AC-29), *S. griseus* subsp. *Griseus* (AC-92), *S. purpuraceans* (AC-103) e *Streptomyces* sp. (AC-26), provenientes da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Escola de Agronomia da UFBA, e previamente selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento (Lima, 2002). Os isolados foram

multiplicados em meio de cultura AGS sólido (Poter, 1960), constituído de: 1 g de L-arginina; 12,5 mL de glicerol; 1 g de K_2HPO_4 ; 1 g de NaCl; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 mL de solução de micronutrientes; 20 g de agar em 1 litro de água destilada, com pH ajustado para 7,2. A solução de micronutrientes continha a seguinte composição: 1 g de $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$; 0,1 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,1 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ em 100 mL de água destilada. As culturas foram incubadas por um período de 10 dias, em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura 28 ± 2 °C. Para o preparo do inóculo, foram adicionados 15 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri contendo as culturas dos estreptomicetos, após 10 dias de cultivo, e com o auxílio de alça de platina, foi feita a raspagem das colônias. A concentração dessa suspensão foi ajustada para densidade ótica $A_{560} = 0,4$, em espectrofotômetro UV.

Efeito da inoculação do substrato orgânico com estreptomicetos no crescimento das mudas de tomateiro

Para avaliar o efeito da inoculação e incubação do substrato com diferentes isolados de estreptomicetos, foi instalado um experimento em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 15 repetições, em esquema fatorial 5 x 2, com quatro isolados de estreptomicetos mais testemunha, com 20 dias de incubação e sem incubação do substrato, antes da semeadura do tomateiro. A inoculação foi realizada com a adição de 20 mL da suspensão contendo os propágulos dos estreptomicetos para cada 400 cm³ de substrato. A testemunha foi constituída de substrato não inoculado, somente irrigado com água destilada. Após a inoculação, foi feita a homogeneização do substrato, com o auxílio de uma espátula de madeira, e em seguida, este foi incubado em sacos de polietileno com capacidade para 20 L, a 28 ± 2 °C, por 20 dias antes do plantio e outra parte do substrato foi inoculada com os estreptomicetos, no dia da semeadura do tomateiro, seguindo a mesma metodologia de inoculação. A semeadura foi realizada no mesmo dia para todos os tratamentos, colocando-se três sementes de tomateiro cv 'Santa Clara' em cada saco de muda, sendo realizado o desbaste, uma semana após a germinação, deixando-se uma planta por saco. As mudas foram coletadas 30 dias após a semeadura, avaliando-se a altura das plantas e diâmetro do caule à altura dos cotilédones. Separou-se a parte aérea das raízes das plantas coletadas, sendo estas lavadas em água corrente e em seguida colocadas para secar em estufa com

ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Após a secagem em estufa, determinou-se o peso da matéria seca, em seguida, foi realizada a moagem e digestão nitroperclórica da parte aérea das plantas e a determinação dos seguintes nutrientes: P⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, e Mn⁺⁺ (Embrapa, 1999). O N⁺ foi determinado após digestão sulfúrica, pelo método de Kjeldahl (Embrapa, 1999). Para determinar o volume radicular, as raízes após lavadas em água corrente, foram imersas em proveta graduada contendo 100 mL de água destilada. Após esse processo, o excedente de água que ultrapassou o limite da proveta, foi retirado com auxílio de uma pipeta graduada, sendo esse considerado o volume das raízes. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo realizada a análise de variância e em seguida, a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Efeito de diferentes períodos de incubação do substrato orgânico com os estreptomicetos no crescimento das mudas de tomateiro

Para determinar o melhor período de incubação dos substratos, foram selecionados os dois melhores isolados, *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) e *Streptomyces* sp. (AC-26), do primeiro experimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (dois isolados de estreptomicetos e cinco períodos de incubação), com oito repetições. O substrato foi inoculado, conforme metodologia descrita anteriormente e incubado em sacos de polietileno com capacidade para 20 L, por períodos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias antes do plantio, à temperatura ambiente de 28±2°C. Após a incubação, foi realizada a semeadura com sementes de tomateiro cv Santa Clara, conforme primeiro experimento. As plantas foram coletadas 30 dias após o plantio, sendo avaliada altura das plantas e diâmetro do caule à altura dos cotilédones. Separou-se a parte aérea das raízes das plantas coletadas, sendo estas lavadas em água corrente e em seguida colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Após secagem em estufa, determinou-se o peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, em balança analítica. Os dados foram analisados estatisticamente, sendo realizada a análise de regressão, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

Produção de enzimas extracelulares, sideróforos, ácido indolacético e capacidade de solubilização de fosfatos pelos estreptomicetos

A produção de amilases pelos estreptomicetos foi determinada no meio ágar amido, constituído de 0,2% de amido solúvel como descrito por Coon et al., (1957) e a produção de catalase conforme Mariano et al., 2000. A produção de quitinase foi determinada de acordo com o método de Renwick et al., (1991), utilizando quitina coloidal como substrato. A atividade celulolítica e xilanolítica foi avaliada conforme Lewis (1988), usando meio de sais minerais-ágar (Tuite, 1969), contendo celulose e xilana como fontes de carbono, respectivamente. A produção de lípases foi avaliada no meio Sierra (1957), usando Tween 80 como substrato. A produção de sideróforos foi determinada conforme Schwyn & Neilands (1987) e ácido indolacético seguindo a metodologia de Bric et al., (1991). A capacidade de solubilização de fosfatos pelos estreptomicetos, foi determinada segundo o método proposto por Katznelson & Bose (1959).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da inoculação do substrato orgânico com os estreptomicetos no crescimento das mudas de tomateiro

Todos os isolados promoveram incrementos significativos na altura das mudas produzidas nos substratos inoculados e incubados (Figuras 1 e 2). Na produção de massa seca da parte aérea, os substratos inoculados e incubados foram superiores aos substratos inoculados e não incubados, exceto para o isolado AC-26, destacando-se o isolado AC-103 entre os substratos incubados. Com relação à massa seca da raiz, apenas o isolado AC-92 se destacou tanto no substrato incubado quanto no substrato não incubado. Os isolados AC-92 e AC-103 se destacaram com relação ao aumento do diâmetro do caule das mudas, quando comparado o substrato incubado com o não incubado. Os isolados AC-26, AC-29 e AC-103, proporcionaram aumentos significativos no volume radicular das plantas quando comparado o substrato incubado com não incubação.

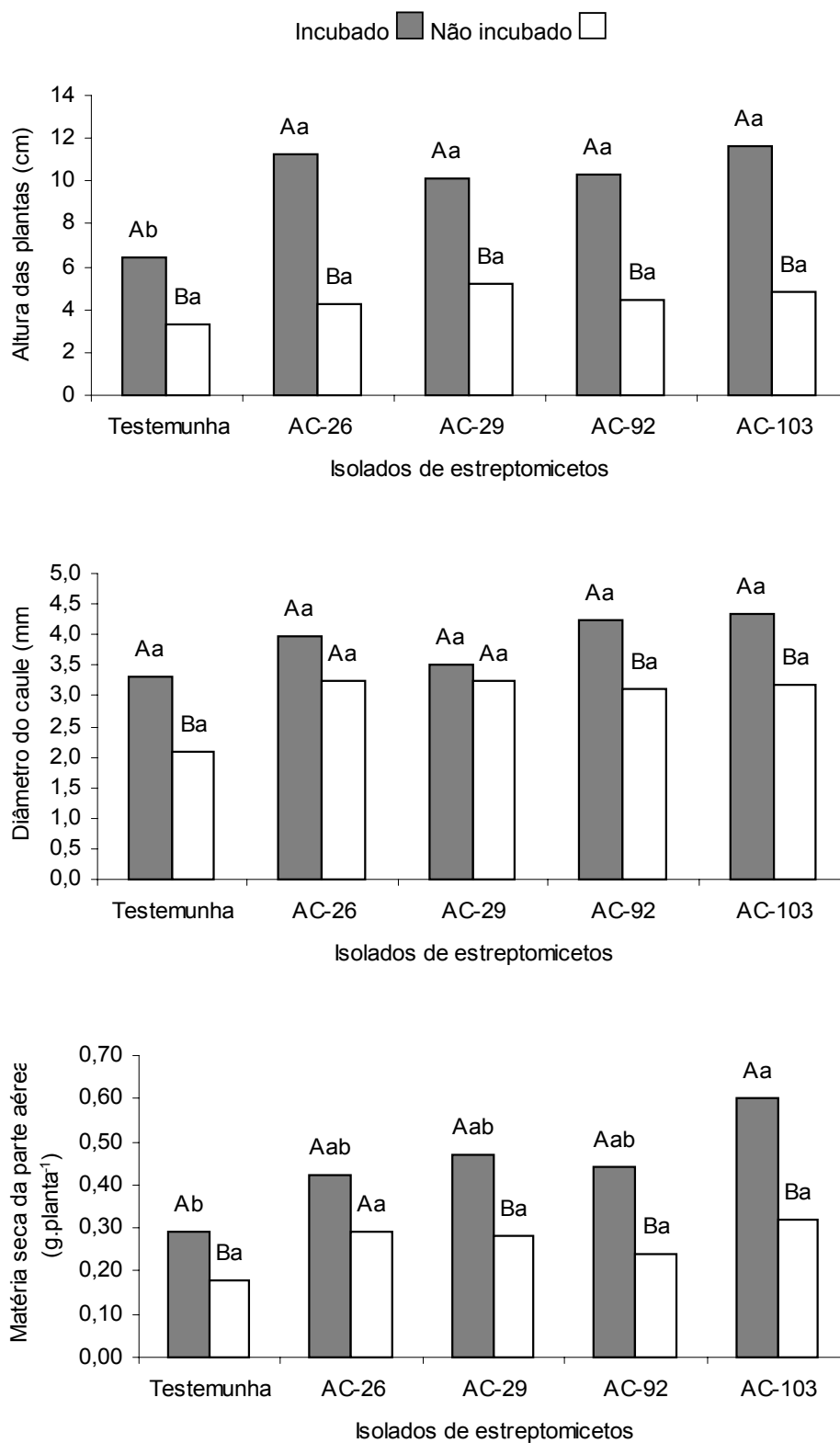


Figura 1. Altura, diâmetro do caule e matéria seca da parte aérea de mudas de tomateiro cv. Santa Clara produzidas em substrato orgânico inoculado com isolados de estreptomicetos seguido de incubação de 20 dias e sem incubação. Letras maiúsculas comparam o efeito do mesmo isolado de estreptomiceto nos substratos quando incubados ou não incubados. Letras minúsculas comparam o efeito dos isolados de estreptomiceto entre os substratos incubados e não incubados. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

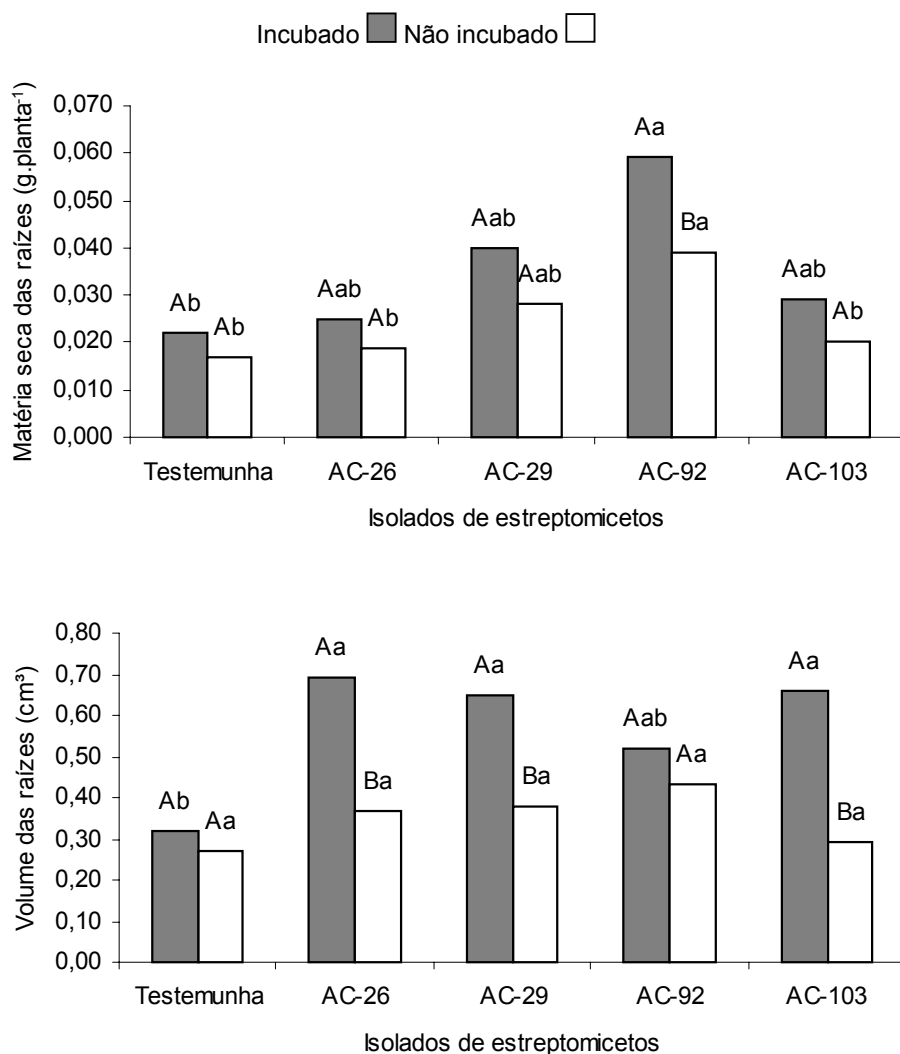


Figura 2. Matéria seca e volume de raízes de mudas de tomateiro cv Santa Clara produzidas em substrato orgânico inoculado com isolados de estreptomicetos seguido de incubação de 20 dias e sem incubação. Letras maiúsculas comparam o efeito do mesmo isolado de estreptomiceto nos substratos quando incubados ou não incubados. Letras minúsculas comparam o efeito dos isolados de estreptomiceto entre os substratos incubados e não incubados. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Nos tratamentos em que houve a inoculação com os estreptomicetos seguida de incubação do substrato por 20 dias, verificou-se incrementos que variaram entre 96,9% a 165,1% para altura das plantas, entre 8,3% a 37,2% para diâmetro do caule, entre 44,8% e 87,5% para matéria seca da parte aérea, entre 31,6% e 51,3% para matéria seca das raízes e entre 71% a 127,6% para o volume das raízes, com relação aos tratamentos que houve a inoculação com os estreptomicetos sem incubação do substrato. Foram observados incrementos de 95,8%, 61,1%, 29,4%, 58,37%, e 18,5 % na altura, diâmetro do caule, massa seca da arte aérea, massa

seca da raiz e volume da raiz das plantas, respectivamente, quando comparada à testemunha incubada com a testemunha não incubada. Sugere-se que a simples incubação do substrato úmido promoveu a atividade da população microbiana nativa, o que favoreceu a mineralização dos nutrientes e, conseqüentemente, a promoção do crescimento das plantas.

Para os tratamentos inoculados, o aumento no crescimento das mudas variou entre 57,3% e 79,9% para altura da planta, entre 44,8% e 106,9% para massa seca da parte aérea, entre 13,6% e 168,2% para massa seca da raiz, entre 62,5% e 115,6% para volume da raiz e entre 6,34% e 31,4% para diâmetro do caule, quando comparado com as plantas do tratamento testemunha incubado. Observa-se incrementos que variaram entre 28,5% a 56,4% para altura das plantas, entre 6,34% a 31,4% para diâmetro do caule, entre 33,3% a 77,8% para matéria seca da parte aérea, entre 64,7% a 129,4% para matéria seca das raízes e entre 37% a 59,3% para volume da raiz, nos tratamentos em que houve a inoculação com o estreptomicetos sem incubação do substrato em comparação com a testemunha sem incubação.

Estes resultados indicam que a incubação do substrato com os isolados de estreptomicetos é necessária para que ocorra o efeito benéfico no crescimento das plantas. Tal período está, possivelmente, associado ao ciclo de vida do estreptomiceto e o período necessário para a produção de enzimas extracelulares e a degradação dos compostos presentes no substrato. O ciclo de crescimento típico de um estreptomiceto envolve a germinação de esporos, formando hifas filamentosas que crescem na superfície do substrato (fonte de nutriente), a hifa forma ramificações que dão origem ao micélio denso (fase vegetativa). Em seguida, ocorre a segunda fase de crescimento aéreo, acompanhada da produção de metabólitos secundários, como os antibióticos. Nesta fase as hifas crescem para fora do micélio, algumas vezes formando estruturas helicoidais e dão origem a cadeia de esporos, que iniciam novamente o ciclo vegetativo (Goriely e Tabor, 2003). As hifas ramificadas penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas de nutrientes pela ação das enzimas extracelulares, como polissacarídeos (amido, pectina, quitina, celulose) e compostos aromáticos (Padilha, 1998).

Considerando que o substrato Plantmax[®] é composto por uma mistura orgânica (vermiculita expandida, turfa processada e enriquecida, casca de pinus processadas e enriquecidas e carvão granulado), a incubação por 20 dias com os

estreptomicetos, antes a semeadura do tomateiro, proporcionou tempo hábil para que esses microrganismos com elevada capacidade de degradação de moléculas complexas e recalcitrantes (Crawford et al., 1993), promovessem a decomposição dessas substâncias orgânicas, acelerando o processo de mineralização desse material vegetal. Como consequência desse processo, houve a disponibilização de nutrientes para serem absorvidos pelas raízes, favorecendo crescimento e a melhoria do estado nutricional das plantas, como pode ser constatado através do acúmulo de nutrientes na parte aérea das mudas de tomateiro (Tabela 1) em comparação com a testemunha (mudas de tomateiro produzidas em substrato sem a inoculação com os estreptomicetos). Segundo James et al., (1991), durante o crescimento de actinomicetos, é comum a liberação de enzimas extracelulares, estando estas envolvidas na biodegradação e reciclagem de compostos carbonados.

O acúmulo de nitrogênio foi maior nas mudas produzidas nos substratos inoculados e incubados com os isolados AC-29, AC-92 e AC-103 (Tabela 1). Observa-se maior absorção de fósforo e cálcio pelas mudas produzidas no substrato incubado com os isolados AC-92 e AC-103. As mudas de tomateiro produzidas no substrato incubado apresentaram maiores acúmulos de K^+ e Mg^{++} do que aquelas em substrato não incubado. Estes resultados evidenciam a maior absorção de nutrientes nos substratos incubados com estreptomicetos, podendo estar associado à maior disponibilização de nutrientes devido à decomposição dos componentes orgânicos dos substratos e/ou ao maior desenvolvimento do sistema radicular devido à produção de substâncias reguladoras de crescimento pelos estreptomicetos.

Houve maior acúmulo de Fe^{++} no substrato incubado com os isolados AC-26 e AC-92 e de Cu^{++} pelos isolados AC-29, AC-92 e AC-103 (Tabela 2). O acúmulo de Mn^{++} na parte aérea das mudas não foi favorecido pela inoculação e incubação do substrato com os estreptomicetos, com exceção do tratamento testemunha. O efeito microbiano sobre a absorção de nutrientes pelas plantas pode ser bastante elevado, sendo encontrados aumentos de até 200%. Esse efeito positivo ocorre devido a vários processos, dentre eles, a solubilização de fosfatos por microrganismos, disponibilizando nutrientes em maior quantidade para as plantas (Moreira & Siqueira, 2000). Os principais mecanismos envolvidos na solubilização de fosfatos pelos microrganismos, dentre eles os actinomicetos, são a produção de CO_2 e ácidos orgânicos, redução de compostos de Fe^{+3} para compostos de Fe^{+2} e produção de H_2S sob baixas concentrações de O_2 (Mulder et al., 1969).

Tabela 1. Acúmulo de macronutrientes na parte aérea das plantas produzidas em substrato inoculado com os isolados de estreptomicetos, incubado por 20 dias (I) e não incubado (NI). Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	N		P		K		Ca		Mg	
	----- (mg.planta ⁻¹) -----									
	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI
Testemunha	4,5 bA	1,3 aA	0,9 bA	0,1 bA	13,0 bA	0,8 bB	5,4 bA	0,3 bB	2,6 bA	0,1 bB
AC-26	9,5 abA	6,3 aA	2,0 abA	1,7 aA	32,5 aA	18,9 aB	9,9 abA	6,9 aA	5,4 abA	2,5 aB
AC-29	10,4 abA	4,5 aB	2,2 abA	1,6 aA	38,2 aA	18,0 abB	11,8 aA	7,4 aA	6,4 aA	2,6 aB
AC-92	11,6 abA	2,2 aB	2,1 abA	1,1 abB	34,0 aA	11,8 abB	10,8 abA	5,0 abB	5,6 aA	1,7 aB
AC-103	14,4 aA	2,6 aB	2,7 aA	1,5 aB	44,5 aA	16,3 abB	13,5 aA	6,8 aB	7,5 aA	2,6 aB

Letras maiúsculas comparam o efeito do mesmo isolado de estreptomiceto nos substratos quando incubados ou não incubados. Letras minúsculas comparam o efeito dos isolados de estreptomiceto entre os substratos incubados e não incubados. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Acúmulo de micronutrientes na parte aérea das plantas produzidas em substrato incubado com os isolados de estreptomicetos, incubado por 20 dias (I) e não incubado (NI). Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Fe		Cu		Mn	
	------(µg.planta ¹)-----					
	I	NI	I	NI	I	NI
Testemunha	76,1 bA	8,00 bB	4,3 aA	0,2 aB	14,8 aA	1,6 bB
AC-26	133,5 aA	66,0 abB	5,6 aA	4,9 aA	28,9 aA	51,6 aA
AC-29	87,2 aA	110,7 abA	8,2 aA	3,2 aB	31,3 aA	47,6 aA
AC-92	116,6 aA	9,4 bB	7,6 aA	2,7 aB	32,0 aA	20,4 abA
AC-103	111,0 aA	175,4 aA	9,1 aA	3,9 aB	37,2 aA	46,4 aA

Letras maiúsculas comparam o efeito do mesmo isolado de estreptomiceto nos substratos quando incubados ou não incubados. Letras minúsculas comparam o efeito dos isolados de estreptomiceto entre os substratos incubados e não incubados. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

O crescimento das mudas de tomateiro no substrato com os isolados de estreptomicetos também pode ser atribuído à produção de substâncias reguladoras de crescimento, dentre elas o ácido indolacético, produzido por todos os estreptomicetos avaliados no presente trabalho (Tabela 3). A produção de reguladores de crescimento ativos como fitohormônios faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais e podem ser considerados agentes causais da alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (Bashan & Holguim, 1997). Diversos autores têm observado a promoção de crescimento de plantas, por bactérias promotoras de crescimento, relacionada à produção de giberilinas (Holl et al., 1988), auxinas (Boron et al., 1993) e ácido láctico e succínico (Yoshikawa, 1993).

Dentre os efeitos proporcionados pelo ácido indolacético no crescimento vegetal, evidencia-se o desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (Oliveira et al., 2003). Fato que pode justificar o aumento no volume radicular das mudas cultivadas no substrato inoculado com as estreptomicetos (Figura 2). Além disso, as modificações na morfologia das raízes, promovidas por estes fitohormônios produzidos pelos microorganismos presentes na rizosfera das plantas, proporciona o desenvolvimento do sistema radicular, e conseqüentemente, melhor exploração do solo, tornando as plantas menos suscetíveis ao déficit hídrico e à escassez de nutrientes (Oliveira et al., 2003; Cattelan & Hartel, 2000).

Tabela 3. Produção de enzimas extracelulares, ácido indolacético, sideróforos e capacidade de solubilização de fosfatos pelos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Enzimas extracelulares						Produção Sideróforos	Produção de ácido indolacético	Solubilização de fosfato
	Quitinase	Celulase	Xilanase	Amilase	Catalase	Lipase			
AC-26	+	+	-	+	+	+	+	+	-
AC-29	+	+	+	+	+	+	+++	+	-
AC-92	-	-	+	+	+	+	+	+	+
AC-103	+	+	+	+	+	+	++	+	+

* A produção de sideróforos baseou-se na intensidade da cor do meio, onde: produção intensa (amarelo) +++; produção moderada (alaranjado); produção fraca (vermelho) + e sem produção (roxo)

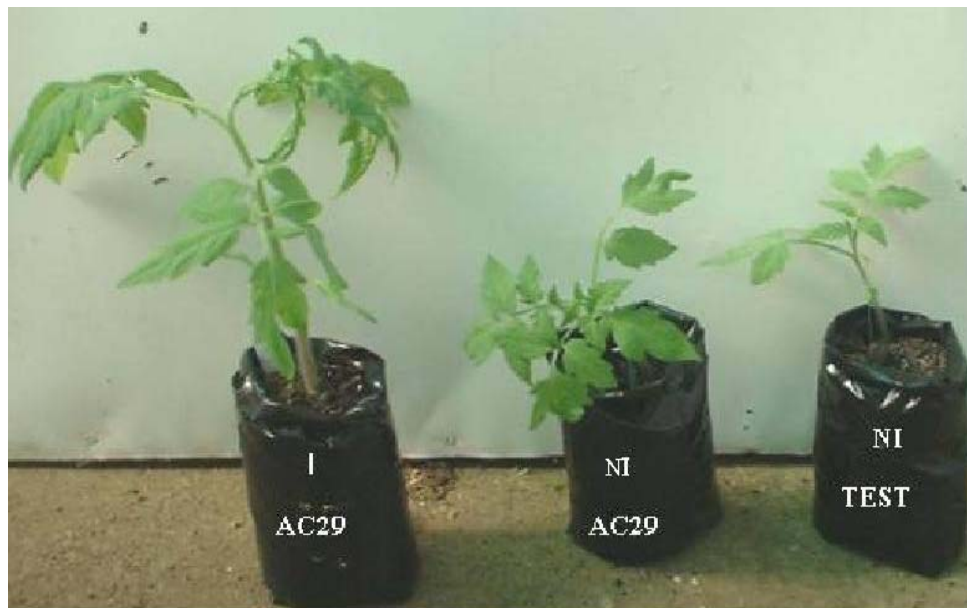


Figura 3. Mudanças de tomateiro cv Santa Clara produzidas em substrato inoculado com *Streptomyces thermotolerans* (AC-29) incubado (I) e não incubado (NI). Cruz das Almas, Bahia, 2006.

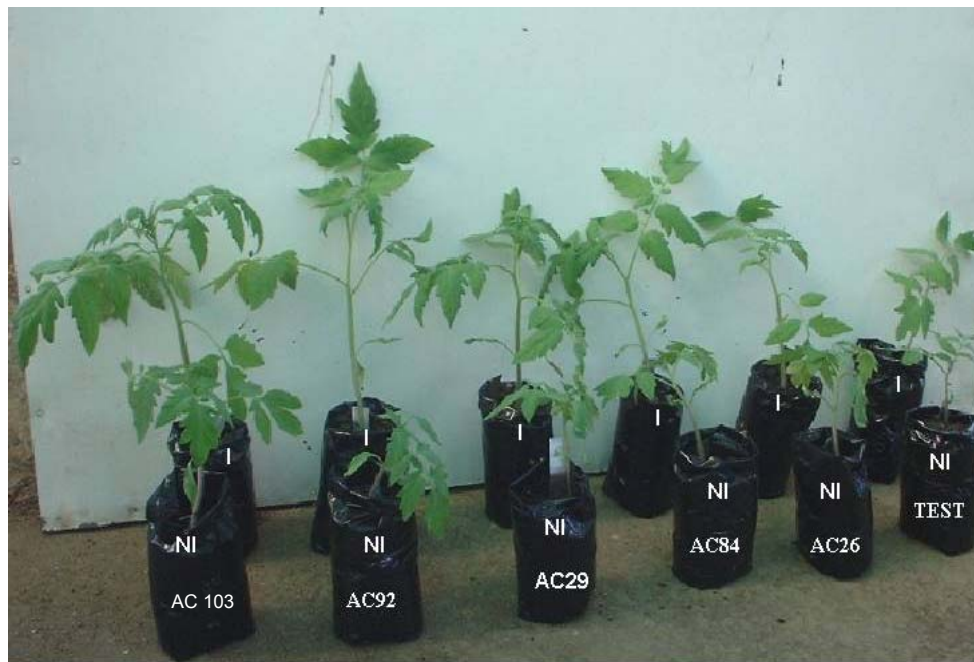


Figura 4. Visão geral das mudas de tomateiro cv Santa Clara produzidas em substrato inoculado com diferentes isolados de estreptomicetos, incubado (I) e não incubado (NI). Cruz das Almas, Bahia, 2006.

A promoção de crescimento vegetal proporcionada pelos microorganismos também pode ocorrer através de mecanismos indiretos, como a supressão de microorganismos deletérios por de mecanismos de competição ou antibiose (Nejad & Johnson, 2000; Chen et al., 1995; Brooks et al., 1994). A competição por Fe, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos, em solos com Fe disponível em baixas concentrações (Leong, 1986). Todos os estreptomicetos avaliados, destacando-se o isolado AC-29, são produtores de sideróforos (Tabela 3). Visando o controle de *Ralstonia solanacearum*, El-Abyad et al., (1993), trataram sementes de tomate com *Streptomyces pulcher*, que apresentava atividade “*in vitro*” contra o patógeno, e observaram também aumento na emergência em até 5%, na profundidade radicular em até 20% e o peso da matéria seca das plantas em até 90%.

Sementes de trigo foram inoculadas com um isolado de *Penicillium radicum*, com capacidade para solubilizar fosfato *in vitro*, houve aumento de 14% na produção de grãos, no experimento de campo, e aumentos na absorção de P (10%) e na produção de grãos (9%), no experimento em casa de vegetação (Whitelaw et al., 1997). A inoculação de duas cultivares de soja Bragg e EMBRAPA 4, com nove bactérias solubilizadoras de fosfato, proporcionou aumentos nas concentrações de N^+ , P^+ , Fe^{++} , Ca^{++} e Cu^{++} , na parte aérea das plantas (Catellan, 1995). Considerando que os isolados de *Streptomyces* sp., AC-103 e AC-92, apresentaram *in vitro* a capacidade de solubilização de fosfatos (Tabela 3), pode-se sugerir que este também tenha sido um dos mecanismos utilizados por esses microorganismos na promoção de crescimento e na melhoria do estado nutricional das mudas de tomateiro.

Baseado nesses fatos pode-se supor que entre os possíveis mecanismos que atuaram na promoção de crescimento das mudas de tomateiro, estão: produção de enzimas líticas pelos isolados de estreptomicetos, atuando na decomposição do substrato e disponibilizando nutrientes para as plantas; a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, proporcionando melhor desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, maior absorção de nutrientes; a capacidade de solubilização de fosfatos e a produção de sideróforos pelos isolados de estreptomiceto, além do antagonismo, uma vez que estes actinomicetos

apresentaram atividade “*in vitro*” contra fitopatógenos dessa cultura como os fungos *Fusarium oxysporium* f. sp. *licopersici*, *Cladosporium fulvum* Cooke e o nematóide *Meloidogyne incognita* (Sousa, et al., 2005a; Sousa, et al., 2005b).

Efeito de diferentes períodos de incubação do substrato orgânico com os estreptomicetos no crescimento das mudas de tomateiro

Uma vez determinada à necessidade de incubação do substrato para a promoção de crescimento das mudas, foi instalado outro experimento para se definir o melhor período de incubação do substrato. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois estreptomicetos e para a interação entre os períodos de incubação e os isolados. Houve efeito de promoção de crescimento com o aumento dos períodos de incubação do substrato com os estreptomicetos. Com exceção do isolado AC-26 para a matéria seca das raízes, em todos os parâmetros avaliados, os dados foram ajustados pelas equações quadráticas que explicam o crescimento das mudas nos substratos submetidos a diferentes períodos de incubação.

A inoculação do substrato, seguida da semeadura (sem incubação), não foi eficiente para a promoção de crescimento das mudas de tomateiro, o que comprova a importância do período de incubação para permitir a ação destes microrganismos, acelerando o processo de decomposição do substrato. De acordo com as equações de regressão (Figura 2), os períodos de incubação que proporcionaram os maiores valores foram 65,7 e 44,9 dias para altura da muda, 46,7 e 41,0 dias para o diâmetro do caule e 94 e 53 dias para matéria seca da parte aérea para os isolados AC-26 e AC-103 respectivamente. Com relação a matéria seca das raízes, foi de 39 dias para o isolado AC-103, o que corresponde a um período médio entre 43 e 56 dias de incubação.

O incremento no crescimento das mudas foi obtido no tratamento com o maior período de incubação do substrato, pode estar associado também à produção de ácidos orgânicos e substâncias reguladoras de crescimento pelos isolados de estreptomicetos. Estes microrganismos podem promover o alongamento de raízes e aumento de pêlos radiculares, efeito este atribuído à produção de substâncias reguladoras de crescimento e aos processos de mineralização e solubilização de nutrientes (Cattelan & Hartel, 2000).

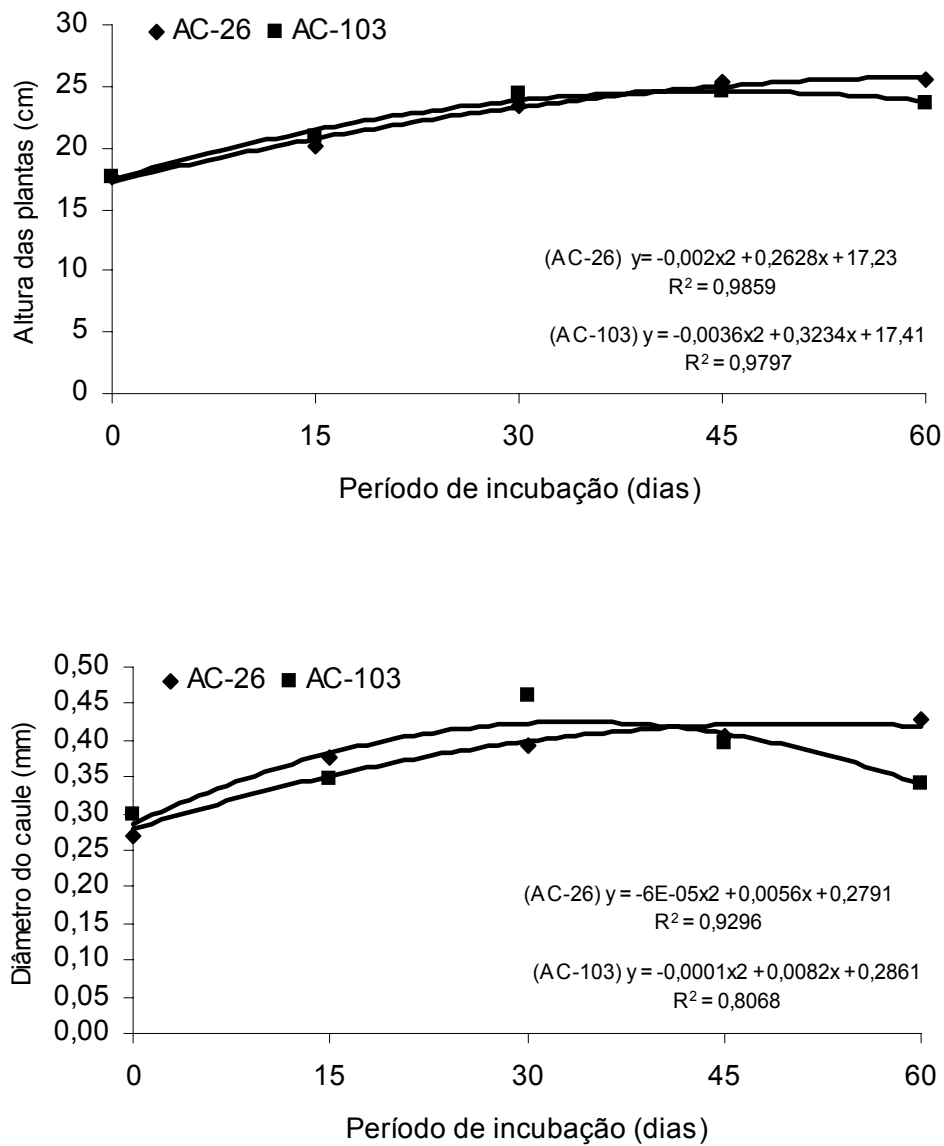


Figura 5. Altura e diâmetro do caule de mudas de tomateiro cv Santa Clara, produzidas em substrato, incubado por diferentes períodos, com dois isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

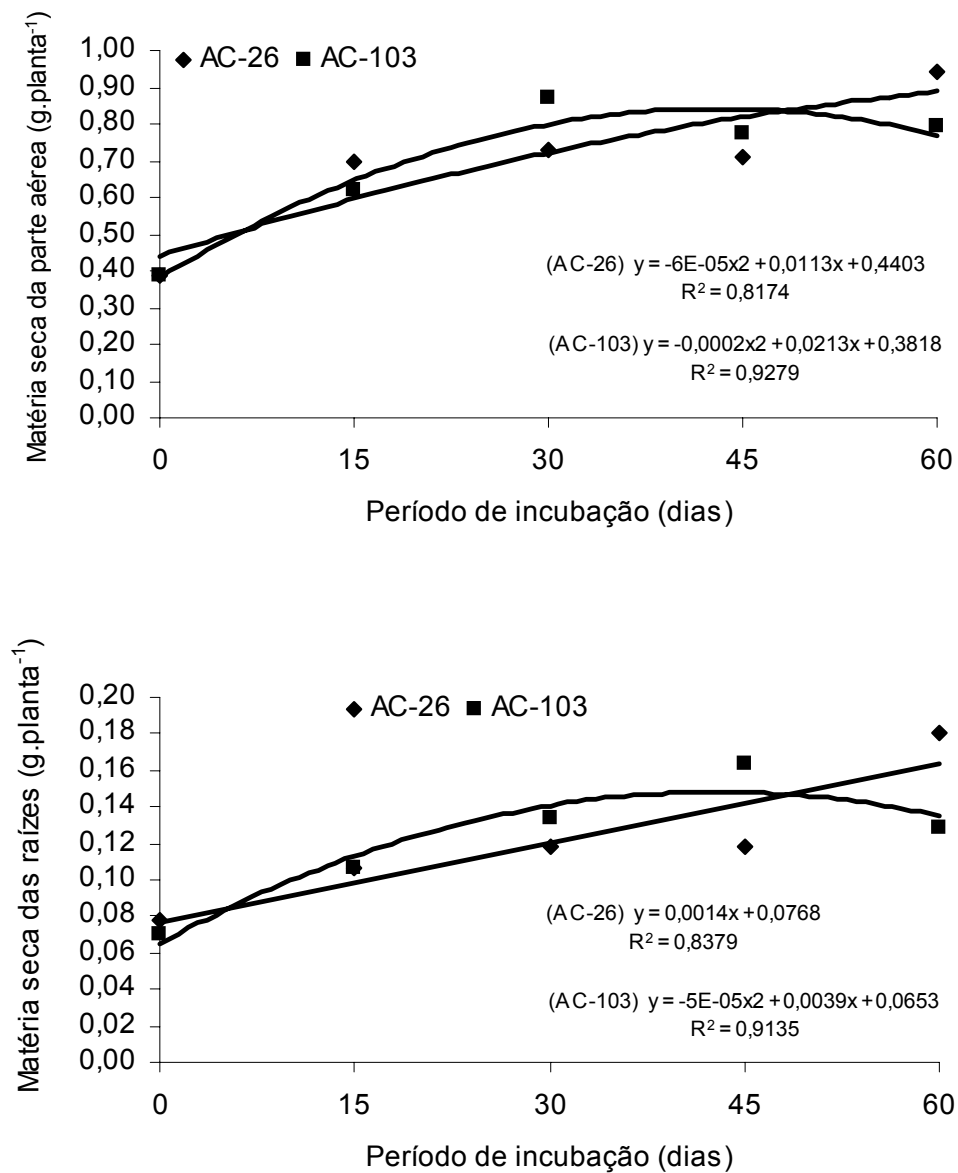


Figura 6. Produção de matéria seca da parte aérea e raízes de mudas de tomateiro cv Santa Clara, produzidas em substrato, incubado por diferentes períodos, com dois isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Observou-se redução na altura, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea e raízes nas mudas cultivadas no substrato incubado por 60 dias, possivelmente devido à limitação por nutrientes e espaço no recipiente de crescimento das mudas (saco de muda com 400 cm³ de substrato).

A inoculação de substratos orgânicos tem efeito benéfico no crescimento de mudas de tomateiro, sendo o período de 43 dias considerado o melhor para incubação do substrato com os estreptomicetos. Sugere-se que, durante esse período de incubação, os estreptomicetos colonizam o substrato e aceleram o processo de mineralização dos nutrientes, disponibilizando-os para as plantas. Quando é feito o plantio da semente e inicia-se o processo de germinação, os nutrientes encontram-se prontamente disponíveis para serem absorvidos pelas raízes, resultando no melhor aproveitamento do substrato para o crescimento vegetal.

CONCLUSÕES

1. A utilização de substratos orgânicos inoculados e incubados com isolados de estreptomicetos aumenta a eficiência de utilização destes pelas plantas;
2. A inoculação do substrato com os estreptomicetos, seguida de semeadura sem o período de incubação, é menos eficiente para a promoção de crescimento de mudas de tomateiro;
3. O melhor período para incubação do substrato com os estreptomicetos é de 43 dias;
4. A promoção de crescimento das mudas de tomateiro pode ser atribuída a capacidade de solubilização de fosfatos, a enzimas que atuam na mineralização dos compostos orgânicos do substrato e/ou a substâncias reguladoras de crescimento produzidas pelos estreptomicetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In **Hemicellulose and hemicellulases** COUGHLAN, M. P. & HAZLEWOOD, A. (eds.). p. 29-51, 1993.

BELLÉ, S.; KAMPF, A.N. Produção de mudas de maracujá amarelo em substratos a base de turfa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.28, n.3, p.385-390, 1993.

BORON, A.M.; KOCHETKOV, V.V. DUBEIKOVSKY, A.N.; MORDUKHOVA, E.A. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: **VI International Congress of Plant Pathology**, Montreal, Canada, **Int. Soc. Path.**, p.276, 1993.

BROOKS, D.S.; GONZALEZ, C.F.; APPEL, D.N.; FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological-control agents for oak wilt. **Biological Control**, San Diego, v.4, n.4, p.373, 1994.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in so assay for indolacético acid production by bacteria immobility on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 57, p. 535-538, 1991.

COON, H.J.; JENNISON, M.W. & WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: **Manual of Microbiological Methods** (ed. Society of American Bacteriologists). New York. McGraw-Hall. 1957, p.239-262.

CARNEIRO, J.G.A. **Produção e controle de qualidade de mudas vegetais**. Curitiba: UFPR/FUPEL, 1995. 451p.

CATTELAN, A.J. Desenvolvimento e absorção de nutrientes em plantas de soja inoculadas com bactérias promotoras do crescimento, em casa-de-vegetação. In: Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo, 3.; Reunião de Laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, 6., 1994, Londrina. Microbiologia do solo: desafios para o século XXI – anais. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, p.387-392. 1995.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. Traits associated with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: **Tópicos em Ciência do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. v.1, p. 213-234, 2000.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZKABANA, R.; KLOPPER, J.W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of Endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v.5, n.1, p.83-91, 1995.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW M, WILLIAMS, S.T., MORDARSKI, M. (eds) **Actinomycetes in Biotechnology**, Academic Press, London 1988. p. 443-459.

CRAWFORD, D. L.; et al.. Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. Oxford, v. 59, n. 11, p. 3899–3905, 1993.

DING, C.H.; JIANG,Z.Q.; LI,X.T.; LI, L.T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.20, p.7-10, 2004.

EL- ABYAD, M. S.; EL-SAYED, M. A.;EL-SHANSHOURY, A. R. Towards the biological control of fungal and bacteria disease of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, Wageningen ,v.149, p. 185-195, 1993.

EL-TARABILY, K.A.; SOLIMAN, M.H.; NASSAR, A.H.; AL-HASSANI, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNA, F.; HARDY, G..E.St.J. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, v.49, p.573-583, 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria, 45., 2000a, São Carlos, **Programa e resumos...** São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

GORIELY, A.; TABOR, M. Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes. **Journal of Theoretical Biology**. v. 22, p.211-218, 2003.

HOLL, F.B.; CHANWAY, C.P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R.A. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.) perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.19-24, 1988.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of s chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.66, p.434-442, 2005.

INBAR, E.; GREEN, S.J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. **Microbial Ecology**. v.50, 73-81. 2005.

JAMES, P.D.; EDWARDS, D.; DAWSON, M.J. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *S. thermoviolaceus* grow in chmostat. **Journal General Microbiology**, v. 137, p. 1715-1720, 1991.

KOSTOV, O.; RANKOV,V.; ATANACOVA, G. LINCH, J.M.Decomposition of sawdust and bark treated with cellulose-decomposing microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p.105-110. 1991.

LIMA, J.L. **Seleção de actinomicetos para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias. Cruz das Almas, Universidade Federal da Bahia, 2002. 63 p.

LYND, L. R.; P. J. WEIMER, W. H. VAN ZYL Y I. S. PRETORIUS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Review**. v. 66, p. 506-577, 2002.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.187-209, 1986.

LEWIS, K.J. Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler. PhD Thesis. Sheffield. University of Sheffield. 1988.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5p. 79-85, 1959.

MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: O autor. 2000. p.115-119.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 2002. 626p.

MULDER, E.G.; LIE, T.A.; WOLDENDORP, J.W. Biology and soil fertility. In: Unesco (Roma, Itália) **Soil biology, reviews of research**. Belgium, p. 163-208. 1969.

MURASHIMA, K.; A. KOSUGI Y R. H. DOI. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 5088-5095, 2002.

NASSAR, A.H.; EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.97-106, 2003.

NEJAD, P.; JOHNSON, P.A. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. **Biological Control**, San Diego, v. 18, n.3, p.208-215, 2000.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microorganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédia: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S. de & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p.327-343.

PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.269-273, 2003.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**. v.8, p.174-178, 1960.

SCHOTTEL, J.L.; SHIMIZU, K.; KINKEL, L.L. Relationships of in vitro pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. **Biocontrol Control**, v.20, p.102-112, 2001

RENWICK, A.; CAMPBELL, R. COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, London, v.40, p. 524-532, 1991.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 23, p. 15-22, 1957.

SOUSA, C. da S.; SOARES, A. C. F., PEREZ, J. O. SOUSA. Potencial de *Streptomyces* sp. no controle in vitro de fungos fitopatogênicos da cultura do tomateiro. V SEMANA DE ATUALIZAÇÃO AGRONÔMICA, 2005, Cruz das Almas. **Resumos...** Universidade Federal da Bahia, 2005a. CD-ROM.

SOUSA, C. da S. ; COIMBRA, J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M.da S.; PEREZ, J.O. Atividade nematicida de exsudatos de *Streptomyces* sp. sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathologica**, v. 31, n. 2, p. 207-209, 2005b.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; WINDING, A. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR 54 and the fungicide imazolil. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1147 – 1153, mar, 2001.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis. Burgess Publishing Company. 1969.

WHITELAN, M.A.; HARDEN, T.J.; BEDER, G.L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium redicum* sp. Nov. Australian **Journal of Soil Research**, Collingwood, v.35, p.291-300, 1997.

YOSHIKAWA, M. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1150-1154, 1993.

CAPÍTULO 3

ESTREPTOMICETOS NO CONTROLE DA MELOIDOGINOSE EM MUDAS DE TOMATEIRO¹

¹ Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Biologic Control

ESTREPTOMICETOS NO CONTROLE DA MELOIDOGINOSE EM MUDAS DE TOMATEIRO

RESUMO

Visando reduzir o impacto negativo dos nematicidas sobre os agrossistemas, a busca por métodos alternativos de controle de fitonematóides tem envolvido a seleção de actinomicetos que produzem metabólitos secundários com ação tóxica a estes patógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de metabólitos secundários produzidos por seis isolados de estreptomicetos na mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* e no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. Foi montado um bioensaio em placas tipo Elisa, sendo adicionados em cada célula, 200 µL dos metabólitos, juntamente com 20 µL da suspensão aquosa contendo 25 juvenis de *M. incognita*. Após 24 horas e 48 horas de incubação, avaliaram as percentagens de J2 imóveis e/ou mortos. Os metabólitos produzidos por *Streptomyces griseus* subsp. *Griseus* (AC-92) causaram 98,2% de mortalidade dos J2 de *M. incognita*. Em outro bioensaio, foram adicionados 3 mL dos metabólitos em frascos de vidro tipo penicilina, juntamente com 100 µL da suspensão contendo 25 ovos de *M. incognita*. Após 15 dias, foi feita a contagem do número de juvenis eclodidos. O isolado de *Streptomyces* N0035 (AC-95) proporcionou 98,8% de inibição da eclosão de J2 de *M. incognita*. No terceiro experimento, o substrato de produção de mudas foi inoculado com suspensão contendo propágulos dos estreptomicetos e incubado por trinta dias. Quinze dias após a germinação das sementes, foi realizada a inoculação de 2000 J2 por planta. Após 40 dias, avaliou-se a altura, o diâmetro, a massa seca da parte aérea, massa de ovos e número de galhas nas raízes. Verificou-se a redução de 68% no número de galhas por grama de raiz e de 76,8% no número de massa de ovos por grama de raiz, nas mudas produzidas no substrato inoculado e incubado com *Streptomyces griseus* subsp. *Griseus* (AC-92), quando comparado com a testemunha. Estes microrganismos apresentam o potencial para o controle da meloidoginose no tomateiro.

Palavras-chave: actinomicetos, nematóide das galhas, metabólitos, biocontrole.

CONTROL OF *Meloidogyne incognita* IN TOMATO PLANTS WITH STREPTOMYCETES

ABSTRACT

To reduce the negative environmental impacts of the nematicides, the search for alternative control methods of plant parasitic nematodes has involved among others, the selection of actinomycetes that produce secondary metabolites with activity against these pathogens. This work had the objective of evaluating the effect of secondary metabolites produced by six streptomycete isolates in the mortality, egg hatching, and control of *Meloidogyne incognita*, on tomato. An assay was conducted in ELISA plates, with the addition of 200 µL of the streptomycete metabolites, along with 20 µL of suspension containing 25 second stage juveniles (J2) of *M. incognita*. After 24 and 48 hours of incubation, the percentage of immobile and/or dead J2 was assessed. The metabolites produced by *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92) caused 98.2% mortality of *M. incognita* (J2). A second assay was conducted with 3 mL of streptomycete metabolites and 25 eggs of *M. incognita*. After 15 days of incubation, the number of juveniles was counted. *Streptomyces* N0035 (AC-95) caused 98.8% inhibition of egg hatching. In the third experiment, potting mix was inoculated with isolates streptomycetes and incubated for 30 days. Fifteen days after germination, the tomato seedlings were inoculated with a suspension containing 2000 J2 of *M. incognita*. Forty days after inoculation, plant height, stem diameter, shoot dry weight, number of root galls and egg mass were recorded. Reductions of 68% in the number of galls per gram of roots and of 76.8% in the number of egg mass per gram of roots were observed on tomato seedlings grown in the potting mix inoculated with *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92), when compared to the ones grown in the potting mix not inoculated with the streptomycete. Streptomycetes have the potential to control on *Meloidogyne incognita* on tomato.

Palavras-chave: actinomycetes, root gall nematode, secondary metabolites, biocontrol.

INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) ocupa um lugar de destaque entre as hortaliças cultivadas e comercializadas, a nível mundial. Contudo, é uma solanácea susceptível a um grande número de doenças (Filgueira, 2000).

A meloidoginose situa-se entre os mais importantes problemas fitossanitários do tomateiro em quase todas as regiões do mundo (Almeida e Moura, 1984). Essa doença é causada por nematóides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como “nematóides das galhas”, devido ao sintoma característico de formação de galhas nas raízes da planta. A formação de galhas nas raízes do tomateiro impede a absorção de água e nutrientes do solo, provocando deficiência mineral e perda de produtividade da ordem de 25 a 85% (Lopes e Santos, 1994).

Os agroquímicos além de possuírem um elevado custo, são prejudiciais à saúde humana, animal e ao meio ambiente (Reis & Lopes, 2002) e os nematicidas são tóxicos e pouco eficientes no controle da meloidoginose em hortaliças. Assim, o controle biológico tem se apresentado como uma alternativa viável para o manejo de fitonematóides, por minimizar o desequilíbrio ecológico e ser economicamente mais vantajoso, quando comparado aos métodos químicos convencionais (Coimbra & Campos, 2005).

Os actinomicetos constituem um importante grupo de bactérias, comumente isoladas do solo, pertencentes à classe Actinobacteria, conhecidos pela sua ampla produção de metabólitos secundários, dentre eles os antibióticos, enzimas extracelulares e inibidores enzimáticos, com aplicações nas áreas de medicina, agricultura e veterinária. O gênero *Streptomyces* tem sido o mais estudado com relação ao controle biológico de fitopatógenos, em função da diversidade de metabólitos secundários produzidos por este gênero e da capacidade competitiva por substratos (Inbar et al., 2005; Skantar et al., 2005).

Existe uma grande diversidade de metabólitos secundários produzidos pelos estreptomicetos, que pode ter efeito nematicida, como por exemplo, o terpenóide geosmin, que possui comprovada toxicidade a nematóides (Pollak & Berger, 1996). A avermectina, produzida a partir da fermentação do micélio do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* (Stretton et al., 1987), é importante no setor agrícola devido

ao efeito nematicida já demonstrado no controle de *M. incognita*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Tylenchorhynchus dubius* e *Pratylenchus penetrans* (Blackburn et al., 1996; Garabedian & Van Gundy, 1983; Sasser et al., 1982).

Diversos estudos têm demonstrado o grande potencial dos actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus penetrans* (Esnard et al., 1998; Jonathan et al., 2000). *Streptomyces costaricanus* reduziu o número de galhas em raízes de pimenta, plantada em solo naturalmente infestado com *M. incognita*, bem como a população de *P. penetrans* em raízes de morango e a população de *R. reniformis* em tomateiro e pimenteira (Dicklow et al., 1993). Coimbra et al. (2004) testando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diferentes culturas, visando o controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro, observaram redução de 61% e 69% nos números de galhas e de massas de ovos, respectivamente, quando comparados com a testemunha. Isolados de *Streptomyces* eficientes em controlar, no campo, a sarna da batateira causada por *Streptomyces scabies*, e em inibir “*in vitro*” o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas, também demonstraram capacidade na redução populacional de *Pratylenchus penetrans* em raízes de alfafa (Samac & Kinkel, 2001).

A procura de novas moléculas produzidas por actinomicetos com possibilidades de aplicação no controle de doenças de plantas, causadas por nematóides do gênero *Meloidogyne*, permitirá ampliar as formas alternativas de controle desse importante gênero de nematóide. Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito de metabólitos secundários produzidos por isolados de estreptomicetos na mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* e o efeito desses microrganismos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos metabólitos produzidos pelos isolados de estreptomicetos

Foram avaliados seis isolados de estreptomicetos: *S. thermotolerans*, *S. griseus* subsp. *Griseus*, *Streptomyces* sp. N0035, *S. purpuraceans* e dois isolados

de *Streptomyces* sp., codificados como AC-29, AC-92, AC-95, AC-103, AC-147 e AC-26, respectivamente, provenientes da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Escola de Agronomia da UFBA, e previamente selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento (Lima, 2002). Os isolados foram multiplicados em meio de cultura sólido AGS (Potter, 1960), com a seguinte composição: 1 g de L-arginina; 12,5 mL de glicerol; 1g de K_2HPO_4 ; 1 g de NaCl; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 mL de solução de micronutrientes; 20 g de ágar, em 1 litro de água destilada, com pH ajustado para 7,2. A solução de micronutrientes continha: $Fe_2(SO_4)_3(6H_2O)$ - 1g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,1g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,1g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0,1g, em 100 mL de água destilada. As culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a 28°C, por 10 dias. Após incubação, foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri, deixando-as em repouso durante 24 horas. Posteriormente, a suspensão obtida foi centrifugada a 12000 rpm, durante 15 minutos e, em seguida, submetida à filtração em membrana de nitrocelulose Millipore (0,22 μm), para a obtenção de um filtrado livre de células de estreptomicetos, contendo apenas os metabólitos produzidos por estes microrganismos. A suspensão obtida contendo os metabólitos foi transferida para frascos de vidro do tipo penicilina, esterilizados e armazenados em congelador a 4°C.

Obtenção e desinfestação de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Para obtenção dos ovos, raízes de tomateiros cv. Santa Clara, cultivados em casa de vegetação, que apresentavam galhas e massas de ovos, foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 20 segundos em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Os resíduos das raízes e impurezas foram separados dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Para a desinfestação dos ovos, em câmara de fluxo laminar, a suspensão foi passada numa peneira de 400 mesh, previamente desinfestada com álcool 70%. Os ovos retidos na peneira foram lavados três vezes com água destilada esterilizada. Em seguida, foram colocados numa solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 minuto e lavados

com água destilada esterilizada por quatro vezes, sendo posteriormente, transferidos para um Erlenmeyer esterilizado, e armazenados em geladeira.

Para obtenção dos J2, raízes de tomateiro cv. Santa Clara, cultivados em casa de vegetação, infestadas com *M. incognita*, foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 20 segundos com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 60 mesh e uma peneira inferior de 400 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão montada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso. Os J2 eclodidos nas primeiras 24 horas foram descartados, sendo utilizados nos ensaios apenas J2 eclodidos nas 24 horas seguintes. Para a desinfestação dos J2, a suspensão obtida na câmara de eclosão, foi transferida para uma peneira de 400 mesh, na qual os J2 ficaram retidos. A peneira com os J2 foi imersa numa solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 minuto, seguido de quatro lavagens com água destilada esterilizada.

Para confirmação da espécie de *Meloidogyne*, foi feito o corte na região perineal das fêmeas coletadas das galhas presentes nas raízes de tomateiro infectados, conforme metodologia proposta por Taylor & Sasser (1978).

Efeito dos metabólitos produzidos pelos estreptomicetos na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Para avaliar o efeito dos metabólitos produzidos pelos seis isolados de estreptomicetos sobre os J2 de *M. incognita*, foi montado um bioensaio em placas tipo Elisa esterilizadas em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. Em cada célula da placa, foram adicionados 200 µL dos metabólitos produzidos pelos isolados de estreptomicetos, juntamente com 20 µL de uma suspensão aquosa contendo 25 J2 de *M. incognita*. A testemunha foi constituída dos J2 em água esterilizada. As placas foram vedadas com parafilme e acondicionadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a 28°C. Após 24 horas de incubação, foi feita a contagem dos nematóides móveis e imóveis, com auxílio de microscópio de objetiva invertida. Realizada essa avaliação, os nematóides foram retirados da

suspensão do metabólito e colocados em água e mantidos por mais 24 horas na câmara de crescimento tipo B.O.D., a 28°C. Foram considerados mortos os nematóides que, após esse período em água, não recuperaram a mobilidade. Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

Efeito dos metabólitos produzidos pelos isolados de estreptomicetos na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Para avaliar o efeito dos metabólitos produzidos pelos seis isolados de estreptomicetos na eclosão de J2, foi montado um segundo bioensaio, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Em frascos de vidro esterilizados, foram colocados 3 mL da suspensão de metabólitos produzidos pelos isolados de estreptomicetos, juntamente com 100 µL de uma suspensão contendo 25 ovos de *M. incognita*. Como testemunha, a suspensão de ovos foi colocada em frascos de vidro contendo água esterilizada. Os frascos foram incubados a 28°C em câmara de crescimento tipo B.O.D. Quinze dias após a incubação, foi realizada a contagem do número de J2 eclodidos em câmara de Peters com auxílio de um microscópio óptico. Com base na concentração de ovos da suspensão inicial e o número de J2 eclodidos, calculou-se a porcentagem de eclosão de ovos. Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

Efeito da inoculação e incubação do substrato orgânico com estreptomicetos no controle de meloidoginose em mudas de tomateiro

Para avaliar o efeito dos estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro, foi instalado um experimento em delineamento experimental em blocos casualizados com 15 repetições. Inicialmente, os estreptomicetos foram cultivados em arroz autoclavado (Soares et al., 2005) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 dias. O arroz colonizado pelos estreptomicetos foi lavado com água destilada e a concentração da suspensão foi ajustada para $A_{560}=0,4$. A inoculação foi feita com 20 mL da suspensão para cada 400 cm^3 de substrato e incubado durante quarenta e três dias, a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), em sacos pretos de polietileno. A umidade do

substrato foi mantida com a adição de água potável, no ponto friável. A semeadura foi realizada colocando-se três sementes de tomateiro cv. 'Santa Clara', sendo realizado o desbaste, uma semana após a germinação, deixando-se uma planta por saco.

Para obtenção do inóculo, foi feita a extração dos ovos de raízes de tomateiro infectadas com *M. incognita* e, posteriormente, realizada a coleta das fêmeas para confirmação da espécie, conforme metodologia proposta por Taylor & Sasser (1978). Raízes infestadas com *M. incognita*, foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 20 segundos em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 60 mesh e uma peneira inferior de 400 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão montada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso. Os J2 eclodidos nas primeiras 24 horas foram descartados, sendo utilizados no ensaio apenas J2 eclodidos nas 24 horas seguintes.

A suspensão de nematóides foi quantificada em câmara de Peters, com auxílio do microscópio de objetiva invertida. Quinze dias após a germinação das sementes de tomateiro, foi feita a inoculação das mudas com cerca de 2000 J2/planta, através orifícios no substrato e colocando o inóculo em contato com as raízes, com o auxílio de uma micropipeta de 1mL. Quarenta dias após a inoculação com *M. incognita*, foi feita a coleta das plantas, avaliando-se a altura das plantas e diâmetro do caule à altura dos cotilédones. Em seguida, separou-se a parte aérea das plantas, sendo estas lavadas em água corrente e em seguida colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Para a contagem do número de massa de ovos e galhas, foi feita a coloração das raízes, pela imersão destas em solução de fucsina ácida a 0,15 %, durante 20 minutos.

Colonização radicular *in vitro* de mudas de tomateiro e produção das enzimas extracelulares lipase e quitinase pelos estreptomicetos

Para avaliar a capacidade *in vitro* dos isolados de estreptomicetos em colonizar o sistema radicular das mudas de tomateiro, sementes de tomate cv. Santa

Clara foram desinfestadas através de imersão nas soluções de álcool 70% (3 minutos) e hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), seguida de seis lavagens consecutivas em água destilada. Após desinfestadas, as sementes foram transferidas, com auxílio de uma pinça estéril, para tubos de ensaio, contendo meio de cultura ágar-água com 0,6% de ágar. Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento sem luz, a 28°C, até a emissão da radícula (período de 3 a 4 dias). Após a emissão da radícula, com auxílio de uma alça de platina, fez-se a raspagem dos estreptomicetos e os esporos foram colocados próximo à radícula. Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura e luminosidade ambiente, sendo diariamente observada a colonização radicular. A produção de lipase pelos estreptomicetos foi avaliada no meio Sierra (1957), usando Tween 80 como substrato. A atividade quitinolítica dos estreptomicetos foi determinada de acordo com o método proposto por Renwick et al., (1991), utilizando quitina coloidal como substrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos metabólitos produzidos pelos estreptomicetos na mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Os isolados *Streptomyces* sp (AC-26), *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92) e *Streptomyces* N0035 (AC-95) aumentaram ($P \leq 0,05$) a mortalidade dos J2, quando comparados com a testemunha. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*, (AC-92), proporcionou 98,2% de mortalidade dos J2, quando comparado aos 27,3% observados na testemunha (Tabela 1), destacando-se como sendo o isolado mais eficiente no controle *in vitro* de *M. incognita*. Os metabólitos produzidos pelos isolados *Streptomyces* N0035 (AC-95) e *Streptomyces* sp (AC-26) causaram 50% e 59% de mortalidade dos J2, diferindo estatisticamente da testemunha e do isolado AC 92. Com relação aos isolados *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) e *Streptomyces thermotolerans* (AC-29), obteve-se 37% e 39% de mortalidade dos J2, respectivamente, não diferindo da testemunha.

Coimbra & Campos (2005), ao avaliar o efeito de exsudatos de actinomicetos na motilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica*, verificaram que seis isolados dentre os 37 testados tinham efeito nematicida, observando valores de mortalidade variando de 19 a 100%. A supressão da motilidade de J2 de *M. incognita* por

filtrados de culturas de isolados de *Streptomyces* sp. foi observada por Kasuyoshi et al. (2002). O efeito dos metabólitos secundários na mortalidade dos J2 variou com as espécies de estreptomicetos, sugerindo que, substâncias diversas, com diferentes graus de toxicidade aos nematóides são produzidas pelos estreptomicetos avaliados.

Além da diferença intrínseca que ocorre entre as espécies, outras características do meio de crescimento como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, podem interferir tanto na quantidade quanto na composição dos metabólitos produzidos (Waksman, 1961; Goodfellow et al., 1988), o que pode explicar, em parte, a diversidade metabólica e, conseqüentemente, o diferente grau de mortalidade proporcionado pelos isolados de estreptomicetos testados. Walker et al. (1966), testando filtrados de quatro isolados de *Streptomyces* sobre juvenis e adultos de *Pratylenchus penetrans*, observaram que ocorreu 40% de mortalidade quando as culturas foram incubadas em temperaturas de 5, 10 e 15°C, e 15% de mortalidade quando os filtrados foram obtidos de culturas incubadas à temperatura de 25°C.

Outros fatores como a concentração da suspensão de metabólitos e o período de exposição dos nematóides também podem influenciar na taxa de mortalidade dos J2. A imobilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica* aumentaram em todos os filtrados bacterianos testados por Naves et al. (2004), quando se aumentou o período de exposição de 24 para 48 horas. Esses autores concluíram que o somatório dos efeitos de substâncias diferentes demanda tempo para sua expressão e, portanto, o período de avaliação de 48 horas seria mais apropriado. Costa et al. (2001) verificaram com o filtrado do fungo *Paecilomyces lilacinus* que, ao passar da diluição de 1:2 para 1:3 (filtrado:água), houve uma queda na percentagem de J2 de *M. incognita* mortos, passando de aproximadamente 95% para 30%. Park et al. (2002) observaram percentagens de redução da mobilidade de *Caenorhabditis elegans* variando de 50 a 90% para os períodos de 3 e 6 horas de incubação, respectivamente, quando colocados diretamente na colônia de *Streptoverticillium albireticuli*, cultivado em placas de Petri por 7 dias no meio FMEA.

Tabela 1 - Efeito dos metabólitos produzidos pelos estreptomicetos na mortalidade e eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Mortalidade (%)	Eclosão (%)
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> (AC-92)	98,2 a	-*
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-26)	59,2 b	-*
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	50,0 bc	1,2 a
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	39,3 cd	96,3 b
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	37,0 cd	68,3 b
Testemunha (água)	27,3 d	76,3 b

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Material não avaliado devido à contaminação.

Além do efeito na mortalidade dos J2, os metabólitos produzidos pelo isolado *Streptomyces* N0035 (AC-95) também demonstraram efeito ovicida, inibindo a eclosão dos J2 de *M. incognita* em 98,2% (Tabela 1). Antibióticos e toxinas produzidos por microorganismos podem ser absorvidos pelos ovos dos nematóides, matando suas células, impedindo o desenvolvimento embrionário e formação do juvenil (Freitas, 2005). Por outro lado, os metabólitos produzidos pelos isolados *Streptomyces thermotolerans* (AC-29) e *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) não demonstraram efeito significativo na mortalidade e na inibição da eclosão dos J2 de *M. incognita*. Estes resultados indicam que os metabólitos produzidos por estes estreptomicetos, nas condições de cultivo analisadas, não apresentam efeito nematicida ou necessitam ser avaliados em concentrações mais elevadas ou períodos mais longos de contato com os nematóides, devido ao possível baixo grau de toxicidade. Dicklow et al., (1993) obtiveram redução na reprodução de *Caenorhabditis elegans* de 55 e 96%, com três e sete dias, respectivamente, de incubação com um filtrado de *Streptomyces* sp., sendo esse efeito atribuído à má formação das paredes das células germinais do ovário da fêmea, além de envolver várias substâncias separadas por diálise.

Efeito dos isolados de estreptomicetos no controle de meloidoginose em mudas de tomateiro

De acordo com os aspectos morfológicos da região perineal da fêmea, a espécie foi identificada como *M. incognita*. No teste *in vitro*, observou-se que alguns isolados de estreptomicetos, em especial, o isolado *Streptomyces griseus* subp

griseus (AC-92), produziu metabólitos secundários com efeito nematicida, causando a mortalidade dos J2 (Tabela 1). Este mesmo isolado, causou significativa redução nos números de galhas (68%) e massa de ovos por grama de raiz (76,8%) das mudas de tomateiro (Tabela 2). O desenvolvimento do nematóide no interior das raízes do tomateiro pode ter sido afetado pelos isolados de *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92), *Streptomyces* N0035 (AC-95) e *Streptomyces purpuraceans* (AC-103), nos quais foram observadas apenas 13,2; 14,3 e 14,5 galhas por grama de raiz, respectivamente, enquanto que as mudas do tratamento testemunha apresentaram uma média de 41,2 galhas por grama de raiz, correspondendo a uma redução de 68,0%, 65,3% e 64,8% em relação à testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de isolados de estreptomicetos no número de galhas e no número de massa de ovos por grama de raiz, nas mudas de tomateiro. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Galhas.g ⁻¹ de raiz		Massas de ovos.g ⁻¹ de raiz	
	Número	Redução (%)	Número	Redução (%)
Testemunha	41,2 a	-	9,5 a	-
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-26)	21,1 ab	48,8	4,4 b	53,7
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	21,4 ab	48,1	2,8 b	70,5
<i>S. griseus</i> sub <i>griseus</i> (AC-92)	13,2 b	68,0	2,2 c	76,8
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	14,3 b	65,3	2,5 b	73,7
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	14,5 b	64,8	3,0 b	68,4
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-147)	17,9 ab	56,6	4,2 b	55,8

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O substrato foi inoculado e incubado por 43 dias antes do plantio com os estreptomicetos, e provavelmente durante este período, esses microrganismos colonizaram e produziram metabólitos secundários no substrato que causaram a mortalidade e inibiram a eclosão dos J2, reduzindo a infectividade nas raízes do tomateiro. A produção de metabólitos secundários no substrato e/ou na rizosfera da planta pode causar a imobilidade e/ou mortalidade do nematóide, antes da sua penetração nas raízes, reduzindo a infectividade e, conseqüentemente, o número de galhas, em função do baixo número de nematóides infectando a planta. Além disso, as rizobactérias, ou seus metabólitos podem ser absorvidos pela planta e desencadear reação de hipersensibilidade nas células gigantes ou síncitos, que

quando são anormais em forma, tamanho e conteúdo, os nematóides não atingem a fase adulta e as fêmeas não conseguem reservas suficientes para produzir ovos (Freitas, 2005). Os metabólitos produzidos pelo isolado *Streptomyces purpuraceans* (AC-103) não demonstraram efeito nematicida significativo *in vitro*, contudo, as mudas de tomateiro produzidas no substrato inoculado e incubado com este isolado, apresentaram redução significativa no número de galhas e de massa de ovos nas raízes, sugerindo que podem ocorrer outros mecanismos de biocontrole, além da produção de metabólitos. Deve-se considerar também que as condições do meio de crescimento também afetam a produção em termos de quantidade e tipo de metabólitos pelos actinomicetos, ocorrendo muitas vezes resultado na planta diferente daqueles observados *in vitro*.

Dicklow et al. (1993) demonstraram que metabólitos produzidos em meio líquido, por espécies de *Streptomyces* sp, inibiram a reprodução de nematóides de vida livre da espécie *Caenorhabditis elegans* “*in vitro*” e também foram capazes de reduzir o número de galhas de *M. incognita* em raízes de tomateiro, quando incorporados ao solo. Jonathan et al. (2000) aplicaram isolados de actinomicetos no solo infestado por *M. incognita* e plantaram tomateiro e bananeira. Doze semanas após o plantio, constataram, em ambas as espécies de plantas, redução dos números de galhas e de ovos, bem como promoção do crescimento vegetativo comparado com a testemunha. Krechel et al. (2002) após testarem isolados de actinomicetos do gênero *Streptomyces* obtidos da rizosfera da batateira, visando o controle de *M. incognita* em casa de vegetação, observaram redução no número de galhas que variou entre 50 a 85% e redução no número de massas de ovos que variou entre 40 a 100% quando comparados com a testemunha.

Com relação ao número de massa de ovos, embora todos os isolados de estreptomicetos tenham demonstrado efeito nematicida, diferindo estatisticamente da testemunha ($P \leq 0,05$), destacaram-se os isolados *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92) e *Streptomyces* N0035 (AC-95), os quais proporcionaram uma redução de 76,8% e 73,7%, respectivamente, quando comparados à testemunha. Alguns trabalhos têm demonstrado a eficácia dos actinomicetos, principalmente os do gênero *Streptomyces*, na redução da população de fitonematóides. A infestação prévia do solo com trigo pré-incorporado com *S. costaricanus*, cultivado em meio

líquido, também reduziu a população de *Radopholus similis* e de *Helicotylenchus multicinctus* (Esnard et al., 1998).

Fatores bióticos e abióticos também podem afetar a eclosão (Wallace, 1971; Tefft & Bone, 1985), a mobilidade ou mortalidade de J2 (Campos et al., 2002). Dentre os fatores bióticos que afetam os fitonematóides no solo estão os exsudatos das plantas (Kaplan & Kenn, 1980; Brito & Ferraz, 1987). A orientação e a migração de fitonematóides para raízes dependem de vários fatores, dentre eles, a natureza dos exsudatos radiculares (Wallace, 1963). Contudo, os microorganismos, por sua vez, colonizam o sistema radicular e afetam a composição química de exsudatos liberados e, conseqüentemente, seu suprimento nutricional (Melo, 1998). A transformação dos exsudatos radiculares em subprodutos pode fazer com que o nematóide não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até esgotar suas reservas de energia, vindo a morrer sem penetrar na raiz (Freitas, 2005). O tratamento de raízes de soja com suspensão de *Bacillus subtilis* reduziu a infectividade por *Heterodera glycines* (Araújo et al., 2002). Esses autores citam que o efeito se deve à degradação bacteriana dos compostos que compõe os exsudatos que, por sua vez, estimulam a migração dos juvenis recém eclodidos até a raiz. Oostendorp & Sikora (1990) observaram redução na eclosão e na infectividade de juvenis de *H. schachtii* no tratamento de plantas de beterraba açucareira antes de coletar os exsudatos como ao tratar soluções de exsudatos radiculares contendo fatores de eclosão com rizobactérias.

Outro possível mecanismo de biocontrole consiste no parasitismo pelos estreptomicetos, através da produção de enzimas como proteases, quitinases e lipases que atuam na destruição da cutícula dos nematóides (Park et al., 2002). Todos os isolados de estreptomicetos testados demonstraram produzir a enzima lipase, e com exceção do isolado *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92), apresentaram capacidade de produção de quitinase (Tabela 3). Miller & Sands (1977), testando os efeitos *in vitro* das enzimas protease, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que após 24 horas houve modificações estruturais na cutícula do nematóide, devido a uma provável degradação enzimática.

Tabela 3. Produção de quitinase, lipase e capacidade de colonização radicular *in vitro* de mudas de tomateiro pelos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Produção de enzimas		Colonização radicular
	extracelulares		
	Lipase	Quitinase	
<i>Streptomyces</i> sp (AC-26)	+	+	+
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	+	+	+
<i>S. griseus</i> subsp griseus (AC-92)	+	-	+
<i>Streptomyces</i> N0035 (AC-95)	+	+	+
<i>S. purpuraceans</i> (AC-103)	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp (AC-147)	+	+	+

No solo, a decomposição da quitina libera substâncias tóxicas a fitonematóides como a amônia, uma vez que essa macromolécula possui teor elevado de nitrogênio. Além da liberação de substâncias tóxicas, a quitina serve como substrato e fonte de energia para os actinomicetos, permitindo a esses organismos competir com mais eficiência com outros microorganismos do solo e da rizosfera. Vários trabalhos demonstraram o efeito da quitina em controlar nematóides fitoparasitas quando adicionada no solo, devido possivelmente, à sua decomposição por actinomicetos (Miller et al., 1973; Spiegel et al., 1987).

Além da produção de metabólitos secundários, parasitismo, competição por nutrientes, outros fatores são decisivos para o efetivo biocontrole dos fitonematóides, como a capacidade competitiva dos estreptomicetos na presença da microflora nativa, permitindo o seu estabelecimento no ambiente onde são introduzidos (Habe & Uesughi, 2000), bem como a colonização das raízes, que funcionam como barreira à penetração do patógeno e os exsudatos radiculares que servem de fonte de energia e nutriente para os actinomicetos (Weller, 1998). Além disso, é necessária uma adequação da forma de inoculação do antagonista, permitindo sua adaptação e estabelecimento, para que níveis populacionais adequados sejam alcançados e se estabeleça uma proteção para a planta hospedeira por ocasião do ataque do patógeno (Robbs, 1991).

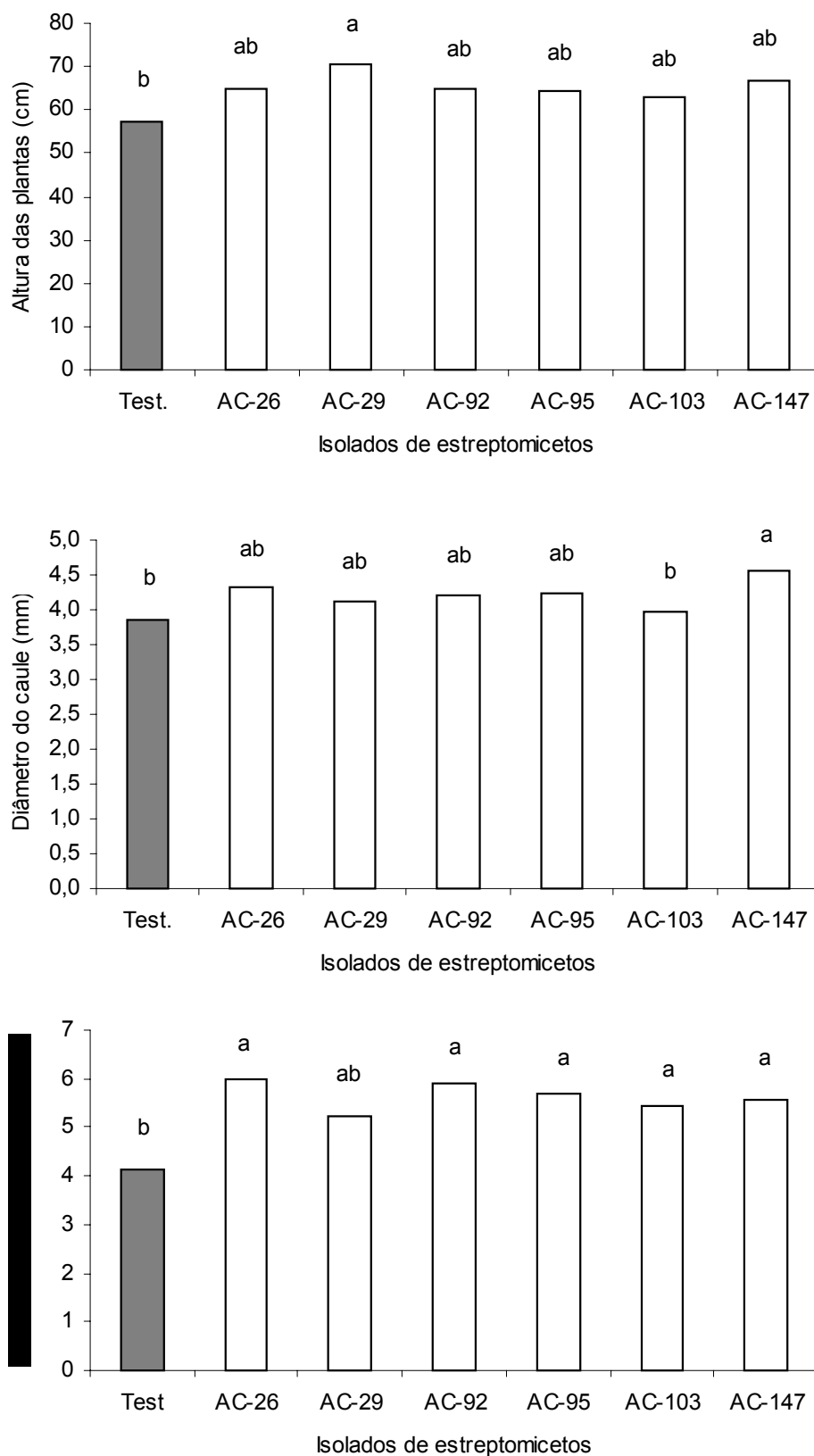


Figura 1. Altura, diâmetro do caule e matéria seca da parte aérea de mudas de tomateiro cv Santa Clara produzidas em substrato inoculado e incubado com estreptomicetos e inoculado com *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

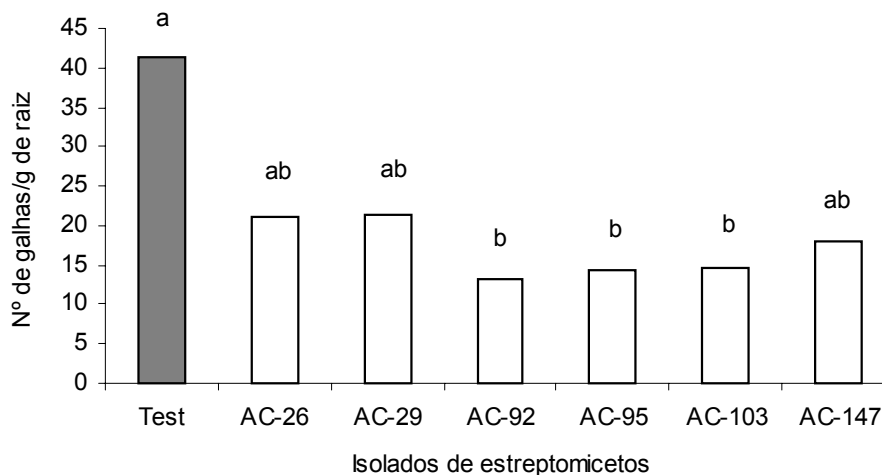
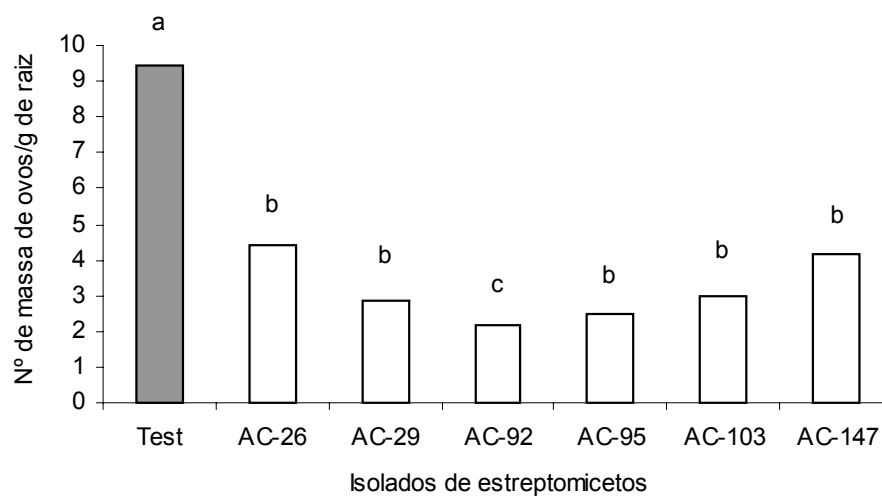
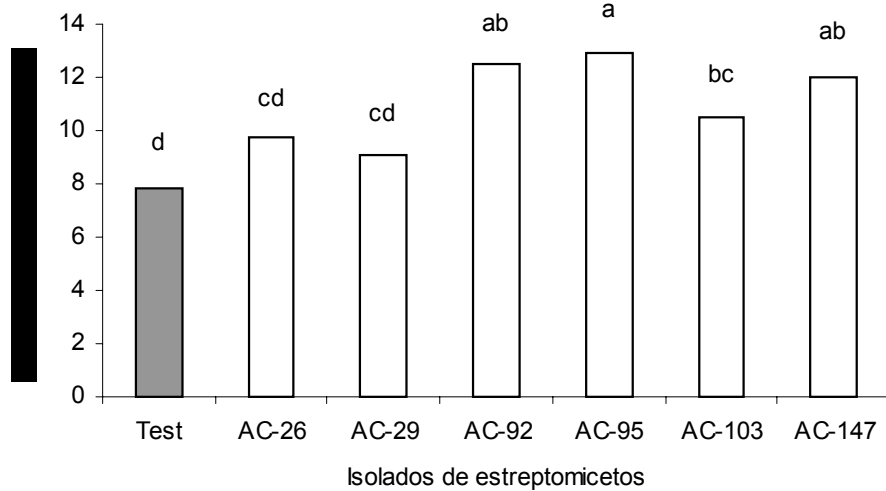


Figura 2. Matéria seca da raiz, número de galhas e de massa de ovos por grama de raiz de mudas de tomateiro cv Santa Clara no substrato inoculado e incubado com estreptomicetos e inoculado com *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

A inoculação e incubação do substrato orgânico com estreptomicetos selecionados *in vitro* também promoveu crescimento das mudas de tomateiro. Foi observado um incremento de 22,8% na altura das mudas de tomateiro produzidas no substrato inoculado e incubado com o isolado AC 29, quando comparado com a testemunha (Figura 1). Um aumento de 18,4% foi observado no diâmetro do caule das plantas produzidas no substrato incubado com o isolado *Streptomyces* sp (AC-147). Com relação ao acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas, observou-se incremento significativo de 43,9% nas mudas de tomateiro produzidas no substrato incubado com o isolado *Streptomyces* sp (AC-26) (Figura 2). Houve incremento de 64,9% na matéria seca das raízes das mudas produzidas no substrato inoculado e incubado com o isolado *Streptomyces* sp. N0095 (AC-95). A promoção de crescimento por actinomicetos está associada à capacidade destes microorganismos em colonizar o sistema radicular das plantas e produzir substâncias promotoras de crescimento e enzimas que atuam na mineralização da matéria orgânica, disponibilizando nutrientes para as plantas (Inbar et al., 2005). Segundo James et al. (1991), durante o crescimento de actinomicetos, é comum a liberação de enzimas extracelulares, as quais são envolvidas na biodegradação e reciclagem de compostos carbonados. Além disso, os actinomicetos também proporcionam o melhor crescimento das plantas por meio do biocontrole de fitopatogenos (El-Abyad et al., 1993), o que pode justificar o crescimento das mudas de tomateiro, após infestação com *Meloidogyne incognita*.

Os resultados deste trabalho demonstraram que os estreptomicetos têm um grande potencial para o biocontrole de *M. incognita*. Adicionalmente, estes microrganismos também possuem efeito de promoção de crescimento das plantas, sendo esse efeito, em parte associado ao controle do *M. incognita*, com redução na formação de galhas e massa de ovos, permitindo o melhor desenvolvimento da planta.

CONCLUSÕES

1. Os isolados *Streptomyces* sp. (AC-26), *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92), *Streptomyces* N0095 (AC-95) produzem metabólitos secundários com efeito nematicida provocando a mortalidade dos J2 de *M. incognita*;

2. Metabólitos produzidos pelo isolado *Streptomyces* N0095 (AC-95), inibiu a eclosão dos J2 de *M. incognita*;
3. A inoculação e incubação do substrato orgânico com os estreptomicetos avaliados promoveu o crescimento das mudas de tomateiro infestadas com *Meloidogyne incognita*;
4. A inoculação e incubação do substrato orgânico com os isolados estreptomicetos *Streptomyces griseus* subsp *griseus* (AC-92), *Streptomyces* N0095 (AC-95) e *Streptomyces purpuraceans* (AC-103), reduziu significativamente o número de galhas g⁻¹ de raiz nas mudas de tomateiro infestadas com *Meloidogyne incognita*;
5. Todos os isolados de estreptomicetos reduziram o número de massas de ovos g⁻¹ de raiz nas mudas de tomateiro infestadas com *Meloidogyne incognita*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F.F. de; SILVA, J.F.V.; ARAÚJO, A.S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**. v.32, n.2, p. 2002.

BLACKBURN, K.; ALM, S.R.; YEH, T.S. Avermectin B1, izafox, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. **Journal of Nematology**, v.48, p.687-694, 1996.

BRITO, J.A. de; FERRAZ, S. Antagonismo de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* cv. Guiné a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.11, p.270-285. 1987.

BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. suplemento. v. 6, p.533 - 543. 1981.

CAMPOS, H.D., CAMPOS, V.P., RIBEIRO, L.O. & CAMPOS, J.R. Efeito de exsudato radicular de *Brachiaria decumbens* sobre a eclosão e mobilidade de juvenis do

segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**. suplemento. v.27, p.185-186. 2002.

COIMBRA, J.L. & CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p. 232-238, 2005.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Efeito antagônico de actinomicetos isolados de diferentes culturas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p.231-234, 2004.

COOLEN, W.A & D'HERBE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77p.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Toxicidade de filtrados a *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.4, p. 749-755, 2001.

DICKLOW, M.B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B.M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.2, p.159-173, 1993.

EL- ABYAD, M. S.; EL-SAYED, M. A.;EL-SHANSHOURY, A. R. Towards the biological control of fungal and bacteria disease of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, Wageningen ,v.149, p. 185-195, 1993.

ESNARD, J.; MARBAN-MENDONZA, N.; ZUCKERMAN, B. Effects of three microbial broth cultures and a organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.457-463, 1998.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000a, São Carlos, **Programa e resumos...** São Carlos: UFSCar, p. 255-258. 2000.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de oleicultura: cultura e comercialização de hortaliças**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda., v.2, 2000. 357p.

FREITAS, L.G. Rizobactérias versus nematóides. In:<<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>, acesso em Jan. 2005.

GARABEDIAN, S.; VAN GUNDY, S.D. Use of avermectin for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. **Journal of Nematology**, v.15, p.503-510, 1983.

GOODFELLOW, M.; WILLIAM, S.T. & MORDARSKI, M. **Actinomycetes in biotechnology**. London, 1988, 501 p.

GORIELY, A.; TABOR, M. Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes. **Journal of Theoretical Biology**. v. 22, p.211-218, 2003.

HABE, M. H.; UESUGHI. C. H. Método in vitro para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.657-660, 2000.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington. v.57, n.12, p.1025-1028, 1973.

INBAR, E.; GREEN, S.J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. **Microbial Ecology**. v.50, 73-81. 2005.

JAMES, P.D.; EDWARDS, D.; DAWSON, M.J. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *S. thermoviolaceus* grow in chmostat. **Journal General Microbiology**, v. 137, p. 1715-1720, 1991.

JONATHAN, E.L.; BARKER, K.R.; ABDEL-ALIM, F.F.; VRAIN, T.C.; DICKSON, D.W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v.30, n.2, p. 231-240, 2000.

KAPLAN, D.T. & KEEN, N.T. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. **Revue de Nématologie**, v.3, p.123-134. 1980.

KAZUYOSHI, C.; FURUKAWA, M.; FUKUDA, S.; SHOJI, M.; YANAGISAWA, T.; HIDEO, I.; TERUO, S.; AKIRA, N. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. **Biocontrol Science**, v.7, n.1, p.25-29, 2002.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.772-786, 2002.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R, M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 67p.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, p.17-67. 1998.

MILLER, P.M.; SANDS, D.C.; RICH, S. Effect of industrial mycelial residue, wood fiber waste, and chitin on plant parasitic nematodes and some soil borne diseases. **Plant Disease Reporter**, v.57, p. 438-442, 1973.

MILLER, P.M.; SANDS, D.C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.9, n.3, p.192-197, 1977.

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.384-388, 2004.

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nematologie**, v.13, p.269-274, 1990.

PARK, J.O.; EL-TARABILY, K.A.; GHISALBERTI, E.L.; SIVASITHAMPARAM, K. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p. 361-365, 2002.

POLLAK, F.C.; BERGER, R.G. Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, 1996.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**, v.8, p.174-178, 1960.

ROBBS. C. F. Tomate: doenças causadas por bactérias. **Informe Agropecuário**. v. 131, p. 45-50, 1991.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R. COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, London, v.40, p. 524-532, 1991.

SAMAC, D.A.; KINKEL, L.L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfafa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.235, p.35-44, 2001.

SASSER, J.N.; KIRKPATRICK, T.L.; DYBAS, R.A. Efficacy of avermectins for root-knot control in tobacco. **Plant Disease**, v.66, p.691-693, 1982.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 23, p. 15-22, 1957.

SKANTAR, A.M.; AGAMA, K.; MEYER, S.L.F.; CARTA, L.K.; VINYARD, B.T. Effects of geldanamycin on hatching and juvenile motility in *Caenorhabditis elegans* and *Herterodera glycines*. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, n.10, p.2481-2491.2005

SPIEGEL, Y.; CHET, L.; COHN, E. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes II. Mode of action. **Plant and Soil**, v.98, p.337-345, 1987.

STRETTON, A.O.W.; CAMPBELL, W.C.; BABU, J.R. Biological activity and mode of action of avermectins. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. **Vistas on Nematology: A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists**, p.136-146, 1987.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C.da S.; PEREZ, J.O.; GARRIDO, M. da S. Produção de inóculo de *Streptomyces* sp. em arroz autoclavado. **Fitopatologia Brasileira**, Uberlândia, v. 30, (suplemento), p. S66. 2005.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. Identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Raleigh, North Carolina State University Graphics. 1978.

TEFFT, P.M. & BONE, L.W. Plant-induced hatching of eggs of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.17, p.275-279, 1985.

WALLACE, H.R. The influence of temperature on embryonic development and hatch of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**. v.171, p.179-186. 1971.

WALLACE, H.R. The biology of plant parasitic nematodes. London, Edward Arnold Ltd. 1963.

WALKER, J.T.; SPECHT, C.H.; BEKKER, J.F. Nematicidal activity to *Pratylenchus penetrans* by culture fluids from actinomycetes and bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.12, p.347-351, 1966.

WAKSMAN, S.A. The role of antibiotics in nature: perspectives in biology and medicine. vol.II. University Chicago Press. Chicago, 1961.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. v.26, p.79-407.1998.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE INÓCULO DE ESTREPTOMICETOS EM ARROZ ESTERILIZADO¹

¹ Artigo submetido a Ciente Agrícola em 16/01/2006.

PRODUÇÃO DE INÓCULO DE ESTREPTOMICETOS EM ARROZ ESTERILIZADO

RESUMO

Os actinomicetos são importantes agentes de controle biológico de doenças e promoção de crescimento de plantas, tornando-se necessária a obtenção de grandes quantidades de inóculo para trabalhos em casa-de-vegetação e campo. No presente trabalho, avaliou-se o crescimento e diversas espécies de estreptomicetos em arroz esterilizado para a produção de inóculo. O arroz foi incubado com isolados de *S. thermotolerans*, *S. griseus* subsp. *griseus*, *Streptomyces* sp. N0035, *S. purpuraceans* e *Streptomyces* sp. e incubado a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Cinco dias após a incubação, observou-se o crescimento micelial e esporulação em todos os isolados dos estreptomicetos nos grãos de arroz. Doze dias após incubação, o arroz colonizado foi transferido para envelopes de papel pardo e colocado em estufa a 30°C por três dias. Após secagem, adicionou-se 1 g do arroz em 200 mL de água e fez-se a contagem de esporos/g de arroz, em câmara de Newbauer. A produção de esporos dos estreptomicetos variou de $0,14 \times 10^9$ a $1,47 \times 10^9$ esporos.g de arroz⁻¹. O arroz esterilizado é um substrato viável para a produção massal e de baixo custo, de inóculo de estreptomicetos.

Palavras-chave: actinomicetos, controle biológico, promoção de crescimento de plantas.

PRODUCTION OF ESTREPTOMICETES INOCULUM IN STERILIZED RICE

ABSTRACT

Actinomycetes are important agents of biocontrol and plant promotion. Mass production is essential to produce large quantities of inoculum for green-house and field studies. The present work had the objective of evaluating the growth and sporulation of several isolates of *Streptomyces* in sterile rice for inoculum production. The sterile rice was inoculated with isolates of *S. thermotolerans*, *S. griseus* subsp. *griseus*, *Streptomyces* sp. N0035, *S. purpurascens*, and *Streptomyces* sp., and incubated at 28±2°C. Five days after inoculation, mycelial growth and sporulation was observed for all *Streptomyces* isolates on rice grains. Twelve days after inoculation, the colonized rice was transferred to envelopes of dark brown paper and dried in an incubator at 30°C, for three days. After drying, 1 g of colonized rice was added to 200 mL of sterile distilled water, and the number of spores was counted under a microscope with a Newbauer chamber. The number of spores varied from 0.14 x 10⁹ to 1.47 x 10⁹ spores.g⁻¹ rice. Sterile rice might be an alternative substrate for low cost mass production of *Streptomyces* inoculum.

Key words: Actinomycetes, biological control, plant growth promotion

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos apresentam características importantes para o controle biológico e promoção de crescimento de plantas, devido à capacidade de produção de antibióticos, enzimas com ação antimicrobiana, substâncias promotoras de crescimento e decomposição da matéria orgânica (Crawford et al., 1993). Esses microorganismos têm um papel importante na degradação de polímeros como lignina, quitina, amido, etc. (Crawford, 1988; Nolan & Cross, 1988), além de produzirem importantes metabólitos secundários de interesse comercial (Lancini & Lorenzetti, 1993).

A multiplicação desses microorganismos em meios de cultura, torna-se inviável para a produção massal de inoculo, visando a sua utilização em trabalhos de casa de vegetação e/ou campo, por ser um método caro e trabalhoso, além de não permitir a obtenção de grandes quantidades de inoculo. Em trabalhos de controle biológico e promoção de crescimento de plantas com estreptomicetos, as colônias crescidas em meios de cultura sintéticos, normalmente são resuspendidas em água estéril ou soluções tampão e a suspensão de esporos é utilizada como inoculo (Getha et al., 2005; Cao et al., 2005). A produção de inoculo de actinomicetos em grãos de trigo esterilizados para inoculação de amostras de solo foi relatado por El-Tarabily et al., (2000). Alguns estudos utilizam agentes de biocontrole em formulações comerciais como o Mycostop® (Verdera OU, Helsinki, Finlândia), uma formulação de *S. griseoviridis*, para o controle de patógenos radiculares da cultura do tomateiro (Minuto et al., 2005).

Para agentes fungicos de controle biológico, um exemplo clássico é a produção em larga escala de *Beauveria* e *Metarhizium* em grãos de arroz para o controle biológico de insetos (Nelson et al., 1996) e a produção massal de espécies de *Trichoderma* em grãos de arroz para o biocontrole de fungos fitopatogênicos. Este trabalho teve como objetivo, avaliar a produção massal de inóculo de diferentes isolados de estreptomicetos em arroz estéril.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do arroz

Para hidratação, foram adicionados 500 mL de água destilada a 300g de arroz parboilizado. Após uma hora de imersão, o excesso de água foi removido, utilizando-se uma peneira de 35 mesh e porções de 50 g do arroz hidratado foram colocadas em frascos de vidro vedados com folha de alumínio e plástico PVC. O arroz foi esterilizado em autoclave a 120⁰C, por 55 minutos.

Inoculação do arroz

Para inoculação do arroz autoclavado, os isolados de estreptomicetos foram previamente multiplicados em meio AGS sólido (Poter, 1960) e incubados por um período de dez dias, em câmara de crescimento B.O.D. a 25±2⁰C. Os isolados testados foram: *Streptomyces* sp., *S. thermotolerans*, *S. griseus* subsp. Griseus, *Streptomyces* sp. N0035 e *S. purpuraceans*, selecionados em trabalhos anteriores como agentes potenciais de biocontrole. Para o preparo da suspensão dos isolados de estreptomicetos foram adicionados 15 mL de água destilada em cada placa de Petri contendo as culturas e, com o auxílio de alça de platina, foi feita a raspagem das colônias. A concentração da suspensão de células dos estreptomicetos foi ajustada para densidade ótica $A_{540}=0,4$ em espectrofotômetro UV e, em seguida, adicionou-se 1 mL dessa suspensão de estreptomiceto em cada frasco contendo 50g de arroz autoclavado. Para cada isolado de estreptomiceto foram utilizadas seis repetições. Após a inoculação, o arroz foi incubado em câmara de crescimento B.O.D. a temperatura de 28±2⁰C.

Quantificação de esporos de estreptomicetos no arroz colonizado

Após doze dias de incubação, o arroz colonizado (Figura 1) foi transferido para envelopes de papel pardo e colocado em estufa a 30° C, por três dias, para facilitar a extração dos esporos no arroz. Após este período de secagem, fez-se a diluição de 1g do arroz em 200 mL de água destilada. Em seguida, a suspensão foi filtrada em gaze esterilizado e o número de esporos foi quantificado por contagem de esporos em câmara de Newbauer, em microscópio óptico. Para comprovar a viabilidade dos esporos, 40 µl da suspensão na concentração de 1 x 10⁵ esporos/mL

foi transferida para lâmina escavada. As laminas foram mantidas em câmara úmida, dentro de placas de Petri, sendo observada a germinação dos esporos a cada 1 hora, com auxílio do microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado crescimento micelial e esporulação dos estreptomicetos no arroz, cinco dias após a sua inoculação. A produção de esporos dos estreptomicetos variou de $0,08 \times 10^9$ a $1,42 \times 10^9$ esporos.g de arroz⁻¹, após 12 dias de incubação a 28°C, seguido de 3 dias de secagem a 30°C (Tabela 1). O isolado de *Streptomyces* sp., (AC-26), apresentou a maior capacidade de colonização e multiplicação no arroz, produzindo maior quantidade de esporos por grama de arroz colonizado, em relação aos demais isolados (Tabela 1). O isolado de *Streptomyces* sp. N0035 apresentou a menor produção de esporos por grama de arroz colonizado (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de esporos.g de arroz⁻¹ colonizado pelos isolados de estreptomicetos. Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Isolado de estreptomiceto	Nº de esporos.g de arroz ⁻¹
<i>Streptomyces</i> sp. (AC-26)	1,42 x 10 ⁹ a
<i>S. thermotolerans</i> (AC-29)	0,54 x 10 ⁹ ab
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> (AC-92)	1,10 x 10 ⁹ ab
<i>Streptomyces</i> sp. N0035 (AC-95)	0,08 x 10 ⁹ b
<i>S. purpuraceans</i> (AC103)	0,33 x 10 ⁹ ab

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise descritiva indica que, apesar de *S. griseus* subsp. *griseus* e *Streptomyces* sp. N0035 apresentarem maior colonização no arroz (Figura 1), estes não foram os isolados com maior produção de esporos (Tabela 1), possivelmente devido à produção de grandes quantidades de micélio. Os esporos produzidos pelos estreptomicetos no arroz apresentaram-se viáveis, conforme observação da germinação destes em água.



Figura 1. Arroz esterilizado (A) e colonizado por *Streptomyces thermotolerans* (B), *Streptomyces purpurascens* (C), *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (D), *Streptomyces* sp. (E), e *Streptomyces* sp. N0035 (F). Cruz das Almas, Bahia, 2006.

Não foram encontrados relatos na literatura consultada, sobre a produção de inoculo de estreptomicetos em arroz esterilizado. Estes resultados indicam que a multiplicação dos estreptomicetos em arroz esterilizado é um método viável para a produção massal de inoculo de estreptomicetos. Contudo, a quantidade de inoculo, em termos de produção de esporos, varia com a espécie do estreptomiceto. Neste trabalho, o arroz foi incubado a 28°C, seguido de secagem a 30°C. A variabilidade quanto á capacidade dos estreptomicetos de colonizar e produzir esporos no arroz indica que a quantificação de inoculo tem que ser feita para cada isolado e outros substratos e temperaturas de incubação devem ser avaliados para a produção massal desses potenciais agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas.

AGRADECIMENTOS

Á FAPESB, pelo financiado do projeto e da bolsa PRODOC. Á CAPES pela bolsa de mestrado. Ao Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo, Laboratório de bioquímica e Fitopatologia, pelo sequenciamento do DNA dos actinomicetos. Ao Dr. Kazunori Hatano, do Departamento de Biotecnologia do National Institute of Technology and Evaluation (NITE), no Japão, pela identificação dos isolados de estreptomicetos, com base nas seqüências de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p.147-152, 2005.

CRAWFORD, D. L.; et al.. Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, p.3899–3905, 1993.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: Goodfellow M, Williams, S.T., Mordarski M (eds): **Actinomycetes in biotechnology**, 1988. p. 433-459.

EL-TARABILY, K.A.; SOLIMAN, M.H.; NASSAR, A.H.; AL-HASSANI, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNA, F.; HARDY, G.E.St.J. Biological control of *Sclerotinia* minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, v.49, p.573-583, 2000.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; WONG, W.H.; SEKI, T.; WARD, A.; GOODFELLOW, M. Evaluation of *Streptomyces* sp. strasin g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.24-32, 2005.

LANCINI, G. LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites**. New York: Plenum Press, 1993. 235p.

MINUTO, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, 2006. In Press.

NELSON, T.L.; LOW, A.; GLARE, T.R. Large production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*. **Proceedings of the 49th New Zealand Plant Protection Conference**, 1996, p.257-261.

NOLAN, R.D.; CROSS, T. Isolation and screening of actinomycetes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M., ed. **Actinomycetes in biotechnology**. Orlando: Academic Press, 1988.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**. v.8, p.174-178, 1960.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caracterização morfológica e enzimática indicou que os isolados de estreptomicetos avaliados apresentam características potencial como agentes de promoção de crescimento e controle de fitopatógenos. Todos os isolados produziram as enzimas amilase, catalase e lipase, assim como o ácido indolacético. Todos os isolados apresentam atividade celulolítica e quitinolítica, com exceção o AC-92. Somente o AC-26 não demonstrou atividade xilanolítica. Os isolados AC-147, AC-95 e AC-29, foram os maiores produtores de sideróforos. Somente os isolados AC-26 e AC-29, não demonstram a capacidade de solubilizar fosfatos. Todos os isolados colonizaram o sistema radicular das plântulas de tomateiro e o AC-92 apresentou crescimento satisfatório em todos os níveis de salinidade e pH avaliados.

Além disso, a capacidade de crescimento em meio de cultura com níveis de pH e salinidade elevados possibilita a adaptação desses em solos ácidos e salinos, o que pode favorecer o estabelecimento de espécies vegetais em condições ambientais adversas.

Houve resultado significativo no crescimento das mudas de tomateiro, quando foi feita a inoculação, seguida de incubação do substrato com os estreptomicetos. Esse resultado indica que a incubação proporciona o tempo necessário para a colonização do substrato pelos actinomicetos, a produção de metabólitos secundários e a decomposição dos compostos orgânicos do substrato, aumentando a eficiência de utilização destes pelas plantas. Contudo, outros aspectos devem ser considerados na promoção de crescimento das mudas como a produção de substâncias reguladoras de crescimento e solubilização de fosfatos pelos estreptomicetos. A produção de antibióticos, metabólitos secundários e sideróforos pelos estreptomicetos reduzem a população de patógenos na rizosfera, podendo também ser esse um mecanismo indireto de promoção de crescimento proporcionado pelos estreptomicetos.

Os isolados de estreptomicetos demonstraram eficácia em aumentar a mortalidade e inibir a eclosão dos J2 de *Meloidogyne incognita*. Esse resultado foi comprovado através da significativa redução no número de massas de ovos e no número de galhas por grama de raiz nas mudas produzidas no substrato inoculado

com esses microorganismos. Possivelmente, os isolados atuaram por meio de diversos mecanismos no controle da meloidoginose nas mudas de tomateiro, como produção metabólitos secundários e produção de enzimas que atuam degradando a cutícula do nematóide, favorecendo o parasitismo pelos estreptomicetos, dentre outros.

A produção de inóculo de estreptomicetos em arroz autoclavado demonstrou ser uma alternativa viável, considerando a significativa esporulação dos microorganismos, a praticidade no manuseio do inóculo, além dessa ser uma metodologia menos trabalhosa, mais acessível e de baixo custo, quando comparada ao uso de meios de cultura sintéticos.