



Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Estrutura e diversidade das comunidades bacterianas associadas à *Triticum aestivum* L. e potencial antagonista contra os fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*

Ana Gabriele Barbosa Casteliani

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências - Área de concentração: Microbiologia Agrícola
Piracicaba, 2016.

Ana Gabriele Barbosa Casteliani
Bacharel em Ciências Biológicas

Estrutura e diversidade das comunidades bacterianas associadas à *Triticum aestivum* L. e potencial antagonista contra os fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*

Orientador:
Prof. Dr. ITAMAR SOARES DE MELO

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – /ESALQ/USP**

Casteliani, Ana Gabriele Barbosa

Estrutura e diversidade das comunidades bacterianas associadas à *Triticum aestivum* L. com potencial antagonista contra os fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* / Ana Gabriele Barbosa Casteliani. - - Piracicaba, 2016.

120 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2016.

1. *Triticum aestivum* 2. *Pyricularia grisea* 3. *Fusarium graminearum* 4. Rizosfera 5. Controle Biológico 6. Comunidades bacterianas L. I. Título

Ofereço

*Aos meus pais, Francisca e João, e minhas irmãs,
Mariana e Fernanda, que contribuíram tanto com
a minha formação, e mesmo com toda a distância
não deixam de acreditar em mim e me apoiar.
Vocês foram fundamentais! Amo vocês!*

Dedico

*Ao meu marido e meu melhor amigo Alex, parceiro
nas horas boas e ruins, por todo amor e apoio
incondicional. É um prazer poder trilhar o meu caminho
com você ao meu lado! Que venham novas aventuras, Te
amo!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus pela vida e aos constantes ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação e por acreditar no meu trabalho, obrigada!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa de mestrado;

A Embrapa Meio Ambiente, pela infraestrutura oferecida para realização da pesquisa,

A Dra. Vanessa Nessner Kavamura (Van), pela paciência nos ensinamentos, pela confiança no meu trabalho ao me convidar para desenvolver o projeto junto ao seu, pelas risadas, enfim por tudo, muito obrigada!

Ao Jorge F. A. Moraes pela ajuda com todas as etapas deste projeto, por ser muitas vezes mais do que um colega de trabalho e sim um verdadeiro amigo! Pelos momentos atrapalhados que nos renderam muitas risadas, enfim por tudo!

A Camila Cristiane Pansa pela ajuda nos momentos que mais precisei, pelas muitas risadas, momentos de desabafo e diversas viagens juntas. Muito obrigada!

Ao amigo e parceiro de viagem em momentos cruciais, Leonardo José da Silva (Léo), pela ajuda com as análises filogenéticas, pelas risadas e pela confiança ao me indicar para o Itamar;

Aos colegas e amigos do LMA que tornam a rotina de trabalho mais agradável: Harold, Martinha, Carol, Bononi, Maikê, Josi, Stalin, Fábio, Danilo, Rafael, Taketani, Diego,

Wallace, Suikinai, enfim todos participaram do meu dia a dia de alguma forma, muito obrigada!

Aos amigos e técnicos de Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente; Rosefy, Elke, Márcia, Ana Maria, João e Tatiana, meu eterno agradecimento pelos ensinamentos, paciência e risadas.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 TRIGO: ORIGEM E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	17
2.2 DOENÇAS DO TRIGO.....	19
2.3 A BRUSONE DO TRIGO.....	19
2.4 A TAXONOMIA DO PATÓGENO, CICLO DA DOENÇA E SINTOMATOLOGIA.....	20
2.5 A GIBERELA EM TRIGO.....	25
2.6 A TAXONOMIA DO PATÓGENO, CICLO DA DOENÇA E SINTOMATOLOGIA.....	25
2.7 MEDIDAS DE CONTROLE	28
2.8 CONTROLE BIOLÓGICO.....	30
2.9 CONTROLE BIOLÓGICO COM MICRO-ORGANISMOS DA RIZOSFERA.....	32
2.10 IMPORTÂNCIA DAS FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 ÁREAS DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO E RIZOSFERA DE <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	37
3.2 ANÁLISE DO POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRIGO EM INIBIR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS POR MEIO DE TÉCNICAS DEPENDENTES DE CULTIVO	40
3.2.1 Isolamento de bactérias a partir de amostras de solo e rizosfera de trigo	40
3.2.2 Linhagens de fungos fitopatogênicos utilizadas.....	41
3.2.3 Avaliação antifúngica por meio de antagonismo direto	42
3.2.4 Seleção das linhagens com potencial para controle biológico	42
3.2.5 Avaliação do potencial de inibição dos extratos brutos	42
3.2.6 Análise estatística	43
3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS COM ATIVIDADE ANTAGÔNICA POR MEIO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA.....	43
3.3.1 Extração de DNA genômico.....	43
3.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA.....	43
3.3.3 Purificação dos produtos de PCR e quantificação em gel de agarose	44
3.3.4 Reação para sequenciamento	44
3.3.5 Precipitação.....	44
3.3.6 Análise das sequências e construção da árvore filogenética dos isolados	45
3.4 ANÁLISE DA ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRIGO POR MEIO DE TÉCNICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO.....	45
3.4.1 Extração de DNA metagenômica de solo e rizosfera.....	45
3.4.2 Preparo das bibliotecas de amplicons 16S rRNA	45
3.4.3 Manipulação e análise das sequências	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 ANÁLISE DO POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRIGO EM INIBIR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS POR MEIO DE TÉCNICAS DEPENDENTES DE CULTIVO	49
4.1.1 Obtenção dos isolados a partir da rizosfera e solo	49

4.1.2 Avaliação antifúngica por meio de antagonismo direto com os fungos fitopatogênicos <i>Pyricularia grisea</i> e <i>Fusarium graminearum</i>	53
4.1.3 Avaliação do potencial inibitório dos extratos brutos de linhagens bacterianas com potencial para biocontrole	60
4.1.4 Identificação das linhagens selecionadas.....	64
4.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRIGO POR MEIO DE TÉCNICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO	72
4.2.1 Filo Actinobacteria.....	83
4.2.2 Filo Proteobacteria	84
4.2.3 Filo Firmicutes	86
4.2.4 Filo Acidobacteria.....	88
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS	94

RESUMO

Estrutura e diversidade das comunidades bacterianas associadas à *Triticum aestivum* L. e potencial antagonista contra os fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*

A cultura de trigo (*Triticum aestivum* L.) é a segunda maior do mundo e o Brasil ocupa o segundo lugar de produção na América do sul. Entretanto, a produtividade desta cultura pode ser limitada devido à ocorrência de doenças como a brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* e a doença denominada giberela, causada pelo fungo *Fusarium graminearum*. Populações bacterianas associadas à rizosfera de trigo podem apresentar potencial como agentes de controle biológico de diferentes fitopatógenos. Neste contexto, esta pesquisa foi direcionada ao estudo da composição da comunidade bacteriana rizosférica do trigo e a busca por micro-organismos com potencial para o controle biológico da brusone e da giberela. Assim, para melhor compreensão das comunidades associadas ao trigo, foram realizadas coletas em duas regiões diferentes no Brasil, sendo possível a obtenção de 606 estirpes entre bactérias e actinobactérias da rizosfera do trigo e de solo de cultivo da mesma cultura. Destas, 16 apresentaram, em testes in vitro, potencial antagonista diante dos fungos fitopatogênicos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* com diferentes porcentagens de inibição. Dez dos isolados selecionados apresentaram similaridade com a família Streptomycetaceae, porém, quatro linhagens necessitam de estudos mais detalhados, pois a similaridade foi baixa, podendo indicar uma espécie ainda não descrita; quatro linhagens demonstraram similaridade com a família Bacillaceae e dois com a família Paenibacillaceae. Na avaliação de produção de metabólitos secundários com efeito inibitório, apenas dez apresentam potencial, porém estudos mais detalhados se fazem necessários para a confirmação deste mecanismo. A análise de diversidade bacteriana demonstrou uma maior abundância do filo Actinobacteria, seguido pelo filo Proteobacteria e Acidobacteria em ambas as áreas amostradas, entretanto, o filo Acidobacteria foi o que demonstrou a maior variação entre as classes presentes nas diferentes regiões estudadas, indicando uma seleção da comunidade de acordo com a variedade do cultivar e o estágio de desenvolvimento do vegetal. A comunidade bacteriana de trigo apresenta micro-organismos com potencial para a inibição dos fungos causadores da brusone e da giberela, porém o efeito destas linhagens deve ser melhor investigado em condições de campo. A compreensão das comunidades bacterianas associadas ao trigo pode se apresentar como uma importante ferramenta para direcionar a busca por antagonistas.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*; *Pyricularia grisea*; *Fusarium graminearum*; Rizosfera; Controle biológico; Comunidades bacterianas

ABSTRACT

Structure and diversity of bacterial communities associated with *Triticum aestivum* L. and potential antagonist against phytopathogens *Pyricularia grisea* and *Fusarium graminearum*

Wheat (*Triticum aestivum*) is the second largest crop in the world and Brazil is in the second position in the ranking of production in South America. However, its productivity can be limited due to the occurrence of diseases like wheat blast, caused by the fungus *Pyricularia grisea* and the disease called *Fusarium head blight* (FHB), caused by the fungus *Fusarium graminearum*. Bacterial populations associated to wheat rhizosphere may have potential to act as biological control agents of different plant pathogens. In this context, this research aimed to look at wheat rhizosphere bacterial community and the pursuit of microorganisms with potential for the biological control of wheat blast and FHB. Given this, in order to study wheat bacterial communities, data collection was carried out in two different regions in Brazil, returning 606 bacterial and actinomycetes isolates from wheat rhizosphere and bulk soil. Among these, 16 strains revealed antagonistic potential against both plant pathogens *Pyricularia grisea* and *Fusarium graminearum*, with different percentages of inhibition. Ten strains were selected out of the 16 and showed similarity with the family *Streptomycetaceae*, whereas four of them displayed a low similarity, requiring a deeper analysis and might indicate new species. Four isolates showed similarity with the family *Bacillaceae* and two with the family *Paenibacillaceae*. On the assessment of production of secondary metabolites with inhibitory effects, only ten strains were positive, but more detailed studies are necessary to confirm this mechanism. The analysis of bacterial diversity revealed a larger abundance of the phylum Actinobacteria, followed by the phylum Proteobacteria and Acidobacteria in both areas, however, the phylum Acidobacteria revealed more variation among its classes when both areas were compared, indicating a selection of the community according to the cultivar and the developmental stage. Wheat bacterial community presents microorganism with inhibition potential against fungi responsible for wheat blast and FHB, yet the effect of such strains should be investigated closely under field conditions. The understanding of bacterial communities associated to wheat may be seen as an important tool to help in the search for antagonists.

Keywords: *Triticum aestivum*; *Pyricularia grisea*; *Fusarium graminearum*; Rhizosphere; Biological control; Bacterial communities

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TRIGO ENTRE OS PRINCIPAIS PAÍSES QUE APRESENTAM A PRODUÇÃO DESTE CEREAL.....	18
FIGURA 2 - ASPECTO DO CRESCIMENTO DO FUNGO <i>PYRICULARIA GRISEA</i> EM PLACA DE PETRI (FONTE: WWW.CNPT.EMBRAPA.BR) CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS EM FORMATO PIRIFORME (FONTE: WWW.ORSEMENTES.COM.BR).....	21
FIGURA 3 - ETAPAS DO CICLO DE INFECÇÃO DE <i>MAGNAPORTHE GRISEA</i> . ADAPTAÇÃO DE: RIBOT ET AL., 2008.	22
FIGURA 4 - (A) ESPIGAS DE TRIGO COM MORTE DE ESPIGUETAS APRESENTANDO SINTOMAS CARACTERÍSTICOS; FONTE: ANA GABRIELE B. CASTELIANI; (B) ESPIGUETAS COM PRESENÇA DE MICÉLIO CINZA INDICANDO SINAIS DO PATÓGENO (SETA VERMELHA); (C) LESÃO FOLIAR EM FORMATO ELÍPTICO. FONTE: EMBRAPA TRIGO.....	23
FIGURA 5 - CICLO REPRODUTIVO DA GIBERELA, CAUSADO PELO FUNGO <i>GIBBERELLA ZEA</i> EM TRIGO (FONTE: : DANELLI E REIS, 2012).....	26
FIGURA 6 - SINTOMAS DE GIBERELA EM ESPIGAS DE TRIGO (A) ARISTAS COM CARACTERÍSTICA DE GIBERELA, COMPARANDO COM (B) ESPIGAS COM SINAIS DE BRUSONE (FONTE: DANELLI E REIS (2012). (C) SEMENTES DE TRIGO COM GIBERELA, MOSTRANDO SINTOMAS ENRUGADOS, CHOCHOS E RÓSEOS. FONTE: ARIANO MORAES PRESTES.....	27
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE AMOSTRAGEM REALIZADA EM PALMITAL /SP.	37
FIGURA 8 - ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TRIGO CONFORME ESCALA DE ZADOKS (ZADOKS ET AL. 1974), INDICANDO O MOMENTO DE COLETA EM CADA LOCALIDADE, SENDO COLETA REALIZADA EM TRIPPLICATA EM PALMITAL /SP DURANTE OS ESTÁDIOS 64 (A) E 80 (B) E COLETA REALIZADA EM TRIPPLICATA EM PLANALTINA /DF, DURANTE OS ESTÁDIOS 65 (A) E 90 (B).....	38
FIGURA 9 - LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE AMOSTRAGEM REALIZADA EM PLANALTINA /DF.....	38
FIGURA 10 - ESQUEMA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA.	40
FIGURA 11 - DIVERSIDADE MORFOLÓGICA OBTIDA APÓS O ISOLAMENTO DA RIZOSFERA E SOLO DAS ÁREAS DE PALMITAL/SP E PLANALTINA/DF. (A) COLÔNIA CARACTERÍSTICA DE ACTINOBACTÉRIA DESTACADA PELO CÍRCULO VERMELHO; (B) PLAQUEAMENTO DA DILUIÇÃO DA RIZOSFERA; (C, D E E) COLÔNIAS OBTIDAS APÓS A PURIFICAÇÃO, SENDO C E E ACTINOBACTÉRIAS E D BACTÉRIA.....	51
FIGURA 12 - QUANTIDADE DE BACTÉRIAS E ACTINOBACTÉRIAS OBTIDAS A PARTIR DO SOLO E RIZOSFERA DAS ÁREAS DE PALMITAL (SP) E PLANALTINA (DF).....	51
FIGURA 13 - GEL DE AGAROSE A 2% COM PRODUTOS DE PCR OBTIDOS DA REAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE CORRESPONDENTE À MAGNAPORINA PARA DNA FÚNGICO EXTRAÍDO DE <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> E DOIS ISOLADOS DE <i>PYRICULARIA GRISEA</i> . M - MARCADOR DNA LADDER; 1 - <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> ; 2 - <i>PYRICULARIA GRISEA</i> LINHAGEM PY5003 DNA EXTRAÍDO COM KIT; 3 - <i>PYRICULARIA GRISEA</i> LINHAGEM PY5003 DNA EXTRAÍDO COM B-MERCAPTOETANOL; 4 - <i>PYRICULARIA GRISEA</i> LINHAGEM PY5003 DNA EXTRAÍDO COM NITROGÊNIO LÍQUIDO; 5 - <i>PYRICULARIA GRISEA</i> LINHAGEM 36.1 DNA EXTRAÍDO COM KIT; 6 - <i>PYRICULARIA GRISEA</i> LINHAGEM 36.1 DNA EXTRAÍDO COM B-MERCAPTOETANOL; 7 - CONTROLE NEGATIVO DA REAÇÃO.	54
FIGURA 14 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE DUAS RAÇAS DE <i>P. GRISEA</i> (A E B) E <i>F. GRAMINEARUM</i> (C) APRESENTADO POR BACTÉRIAS E ACTINOBACTÉRIAS PROVENIENTES DAS DUAS ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO. AS BARRAS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO DAS MÉDIAS (N=12). MÉDIAS SEGUIDAS PELAS MESMAS LETRAS NÃO DIFEREM ENTRE SI SIGNIFICATIVAMENTE, PELO TESTE DE TUKEY.	55

- FIGURA 15 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS FUNGOS PATÓGENOS DE TRIGO *PYRICULARIA GRISEA* E *FUSARIUM GRAMINEARUM* PELAS BACTÉRIAS ANTAGONISTAS ISOLADAS A PARTIR DO SOLO (S) E RIZOSFERA (R) DE PALMITAL/SP (TS E TR) E PLANALTINA/DF (AS, AR, BS E BR)..... 58
- FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DE DIFERENTES ISOLADOS DIANTE DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *PYRICULARIA GRISEA* (PY5003), SENDO (A) E (B) OBTIDOS APÓS EXTRAÇÃO COM ACETATO DE ETILA, E (C) E (D) OBTIDOS APÓS EXTRAÇÃO COM DICLOROMETANO..... 62
- FIGURA 17 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA OBTIDA PARA O FILO ACTINOBACTERIA DOS ISOLADOS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO AOS FUNGOS CAUSADORES DA BRUSONE E GIBERELA EM TRIGO. CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, ÁRVORE CONSENSO DE *BOOTSTRAP* UTILIZANDO 1000 REPLICAÇÕES PELO MÉTODO TAMURA-NEI. 67
- FIGURA 18 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA OBTIDA PARA O FILO ACTINOBACTERIA DOS ISOLADOS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO AOS FUNGOS CAUSADORES DA BRUSONE E GIBERELA EM TRIGO. CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, ÁRVORE CONSENSO DE *BOOTSTRAP* UTILIZANDO 1000 REAMOSTRAGENS PELO MÉTODO TAMURA NEI..... 69
- FIGURA 19 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA OBTIDA PARA O FILO ACTINOBACTERIA DOS ISOLADOS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO AOS FUNGOS CAUSADORES DA BRUSONE E GIBERELA EM TRIGO. CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, ÁRVORE CONSENSO DE *BOOTSTRAP* UTILIZANDO 1000 REPLICAÇÕES PELO MÉTODO TAMURA-NEI. 70
- FIGURA 20 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 16S rRNA OBTIDA PARA O FILO FIRMICUTES DOS ISOLADOS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO AOS FUNGOS CAUSADORES DA BRUSONE E GIBERELA EM TRIGO. CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, ÁRVORE CONSENSO DE *BOOTSTRAP* UTILIZANDO 1000 REPLICAÇÕES PELO MÉTODO TAMURA NEI. 71
- FIGURA 21 - ANÁLISE DAS COORDENADAS PRINCIPAIS (PCoA) DA DIVERSIDADE BACTERIANA PRESENTE NA RIZOSFERA (TR - QUADRADO) E SOLO (TS - CÍRCULO) DE CULTIVO DE TRIGO, COLETADAS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO (1 - AZUL E 2 - VERDE) DA ÁREA LOCALIZADA EM PALMITAL/SP..... 73
- FIGURA 22 - ANÁLISE DAS COORDENADAS PRINCIPAIS (PCoA) DA DIVERSIDADE BACTERIANA PRESENTE NA RIZOSFERA (AR E BR - QUADRADO) E SOLO (AS E BS - CÍRCULO) DE CULTIVO DE TRIGO, COLETADAS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO (A - VERDE E B - VERMELHO) DA ÁREA LOCALIZADA EM PLANALTINA/DF..... 76
- FIGURA 23 - FILOS BACTERIANOS COM FREQUÊNCIA RELATIVA (%) MAIOR QUE 1% PARA AS MÉDIAS (N=3) PARA A COLETA REALIZADA EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2) EM PALMITAL (SP) PROVENIENTES DA RIZOSFERA DE TRIGO (TR) E SOLO DE CULTIVO (TS) (A) E COLETA REALIZADA EM PLANALTINA (DF) EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2), ORIUNDAS DA RIZOSFERA (RIZ.) E SOLO DE ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO (B)..... 80
- FIGURA 24 - FREQUÊNCIA RELATIVA MAIOR QUE 1% DAS CLASSES PERTENCENTES AO FILO ACTINOBACTERIA PARA A COLETA REALIZADA EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2) EM PALMITAL (SP) PROVENIENTES DA RIZOSFERA DE TRIGO (TR) E SOLO DE CULTIVO (TS) (A) E COLETA REALIZADA EM PLANALTINA (DF) EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2), ORIUNDAS DA RIZOSFERA (RIZ.) E SOLO DE ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO (B)..... 83
- FIGURA 25 - FREQUÊNCIA RELATIVA MAIOR QUE 1% DAS CLASSES PERTENCENTES AO FILO PROTEOBACTERIA PARA A COLETA REALIZADA EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2) EM PALMITAL (SP) PROVENIENTES DA RIZOSFERA DE TRIGO (TR) E SOLO DE CULTIVO (TS) (A) E COLETA REALIZADA EM PLANALTINA (DF) EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2), ORIUNDAS DA RIZOSFERA (RIZ.) E SOLO DE ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO (B)..... 85
- FIGURA 26 - FREQUÊNCIA RELATIVA MAIOR QUE 1% DAS CLASSES PERTENCENTES AO FILO FIRMICUTES PARA A COLETA REALIZADA EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2) EM PALMITAL (SP) PROVENIENTES DA RIZOSFERA DE TRIGO (TR) E SOLO DE CULTIVO (TS) (A) E COLETA REALIZADA EM PLANALTINA (DF)

EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2), ORIUNDAS DA RIZOSFERA (RIZ.) E SOLO DE ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO (B). 87

FIGURA 27 - FREQUÊNCIA RELATIVA MAIOR QUE 1% DAS CLASSES PERTENCENTES AO FILO ACIDOBACTERIA PARA A COLETA REALIZADA EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2) EM PALMITAL (SP) PROVENIENTES DA RIZOSFERA DE TRIGO (TR) E SOLO DE CULTIVO (TS) (A) E COLETA REALIZADA EM PLANALTINA (DF) EM DIFERENTES ESTÁDIOS VEGETATIVOS (1 E 2), ORIUNDAS DA RIZOSFERA (RIZ.) E SOLO DE ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO (B). 89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO E RIZOSFERA COLETADAS DE DUAS REGIÕES PRODUTORAS DE TRIGO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO.	39
TABELA 2 - <i>PRIMERS</i> DA REGIÃO 16S rRNA UTILIZADOS NAS REAÇÕES PARA SEQUENCIAMENTO DAS BACTÉRIAS ANTAGONISTAS.	44
TABELA 3 - AS AMOSTRAS FORAM DIVIDIDAS DE FORMA A SEREM SEQUENCIADAS UTILIZANDO-SE DOIS CHIPS, SENDO QUE NO CHIP 1 ENCONTRAM-SE AS AMOSTRAS DA ÁREA DE PALMITAL-SP; NO CHIP 2 ENCONTRAM-SE AS AMOSTRAS DA ÁREA DE BRÁSILIA-DF.	46
TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS A PARTIR DE CADA PONTO DE COLETA PROVENIENTES DE SOLO E RIZOSFERA DE DUAS ÁREAS DE CULTIVO DE TRIGO.	49
TABELA 5 - ISOLADOS BACTERIANOS COM POTENCIAL ANTAGONISTA E PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS FUNGOS <i>PYRICULARIA GRISEA</i> (PY 5003 E 36.1) E <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i>	57
TABELA 6 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO (PI) OBTIDAS A PARTIR DA ATIVIDADE APRESENTADA PELO EXTRATO BRUTO DOS MICRO-ORGANISMOS SELECIONADOS, FRENTE AO FUNGO <i>P. GRISEA</i> (PY5003).	61
TABELA 7 - IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA DE LINHAGENS BACTERIANAS SELECIONADAS DE ACORDO COM POTENCIAL ANTAGÔNICO DE LINHAGENS OBTIDAS DA RIZOSFERA (R) E SOLO (S) DE CULTIVO DE TRIGO DE DIFERENTES PONTOS DE AMOSTRAGEM.	65
TABELA 8 - ÍNDICES DE DISSIMILARIDADE DAS ESTRUTURAS BACTERIANAS DO SOLO (TS) E RIZOSFERA (TR) DE TRIGO DE DIFERENTES PONTOS DE AMOSTRAGEM (1 E 2), PROVENIENTES DE PALMITAL/SP.	73
TABELA 9 - PRINCIPAIS GRUPOS BACTERIANOS RESPONSÁVEIS PELA DISSIMILARIDADE OBSERVADA APÓS ANÁLISE DE SIMPER PARA AS AMOSTRAS DE PALMITAL/SP.	75
TABELA 10 - ÍNDICES DE DISSIMILARIDADE DAS ESTRUTURAS BACTERIANAS DO SOLO (AS E BS) E RIZOSFERA (AR E BR) DE TRIGO DE DIFERENTES PONTOS DE AMOSTRAGEM (1 E 2), PROVENIENTES DE PLANALTINA/DF.	77
TABELA 11 - PRINCIPAIS GRUPOS BACTERIANOS RESPONSÁVEIS PELA DISSIMILARIDADE OBSERVADA APÓS ANÁLISE DE SIMPER PARA AS AMOSTRAS DE PLANALTINA/DF.	78
TABELA 12 - MÉDIAS DO ÍNDICE PD, CHAO1 E OTUS OBSERVADAS PARA AS AMOSTRAS PALMITAL-SP, DE SOLO (S) E RIZOSFERA (R) DE TRIGO OBTIDO EM DUAS COLETAS DISTINTAS: PRIMEIRA COLETA (1), SEGUNDA COLETA (2). MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS IGUAIS, NAS COLUNAS, NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY A 1%.	79
TABELA 13 - MÉDIAS DO ÍNDICE PD, CHAO1 E OTUS OBSERVADAS, OBTIDA PARA AS AMOSTRAS DE PLANALTINA – DF, DO SOLO (S) E RIZOSFERA (R) DE TRIGO OBTIDO EM DUAS COLETAS DISTINTAS: PRIMEIRA COLETA (A), SEGUNDA COLETA (B). MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS IGUAIS, NAS COLUNAS, NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY A 1%.	79

1. INTRODUÇÃO

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) ocupa o segundo lugar em termos de produção de grãos a nível mundial e constitui a base alimentar de diferentes países. Uma das limitações da produtividade do trigo de maior destaque em diferentes países é a ocorrência de várias doenças de origem biótica ou abiótica, podendo estar relacionadas às sementes, atingindo órgãos superiores ou podendo ser provenientes de patógenos do solo (REIS et al., 2001). De acordo com Murray (2010), os fungos constituem um dos principais causadores de doenças na cultura do trigo, sendo que a ocorrência de tais patógenos é favorecida pelas variáveis ambientais apresentadas em cada região (GOULART et al., 2001), podendo ocasionar prejuízos de até 100% em diferentes áreas de cultivo.

Dentre os principais fungos causadores de infecção floral, atualmente ocupam posição de destaque a doença conhecida como brusone causada, por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., e a doença denominada giberela ou fusariose, causada por *Fusarium graminearum* (Schwabe) Petch; sendo que ambos os patógenos se apresentam com sintomas confundíveis e dependentes das condições climáticas para o seu estabelecimento.

Diversos trabalhos com diferentes abordagens têm sido realizados com o intuito de minimizar o impacto destes patógenos sobre a triticultura de países da América do Sul, porém todos os estudos são realizados separadamente para cada fungo. Além do que, o uso de tais técnicas não apresenta resultados efetivos quanto à proteção das plantas diante dos fungos causadores da brusone e da giberela.

A brusone e a giberela são doenças que ocorrem sob as mesmas condições ambientais, tais como temperatura em torno de 24 a 30°C e ambos patógenos necessitam de altas umidades para que ocorra a infecção (MCMULLEN et al., 1997; (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007). A busca por medidas de controle efetivas para ambos fitopatógenos de trigo, pode se apresentar como uma alternativa relevante, pois o controle de apenas um fitopatógeno tende a deixar a planta susceptível à outra doença.

Atualmente, o cenário agrícola mundial tem apresentado alterações quanto ao uso de defensivos químicos. A procura por produtos e alimentos livres de resíduos provenientes de aplicações de agrotóxico, tem sido crescente no mercado mundial.

Uma das alternativas que tem apresentado grande potencial na redução do uso de agrotóxicos é o controle biológico. Apresenta um menor impacto sobre o ambiente, além de ser uma alternativa viável frente a diferentes patógenos (FREITAS; AGUILLAR-VILDOSO, 2004) e contribuir significativamente com a redução de gastos com agrotóxicos utilizados na aplicação agrícola.

Os micro-organismos obtidos a partir da rizosfera são ideais para uso como agentes de biocontrole, pois esta é a região em que ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos, plantas e patógenos (Weller, 1988; Dantas et al., 2011).

A compreensão da composição da comunidade bacteriana associada às raízes de trigo, pode direcionar a buscar por agentes de controle biológico, além de permitir traçar o perfil da diversidade bacteriana de diferentes variedades de trigo, oriundas de diferentes regiões tritícolas.

Assim sendo, o presente projeto teve como objetivo principal estudar a estrutura e a composição de comunidades bacterianas de solo e rizosfera de trigo proveniente de duas áreas de cultivo, de modo a possibilitar a descoberta de espécies antagonistas com potencial para controle biológico das doenças denominadas brusone e giberela, causadas, respectivamente, pelos fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*.

De modo a alcançar o objetivo principal, algumas questões foram levantadas:

- Existem micro-organismos presentes na rizosfera de trigo capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*?
- Os micro-organismos antagônicos são capazes de produzir metabólitos secundários com atividade contra os fitopatógenos?
- Existem espécies novas de micro-organismos com atividade antagônica?
- Quais os principais grupos taxonômicos responsáveis pelas diferenças entre as amostras?
- O que se pode dizer das técnicas de isolamento quando comparadas com as técnicas independentes de cultivo para o desenvolvimento de agentes de controle biológico?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TRIGO: Origem e importância econômica

O trigo é uma planta herbácea, monocotiledônea, fasciculada, com a parte aérea formada por um conjunto de colmos e apresenta inflorescência terminal do tipo espiga (OSÓRIO, 1992). Acredita-se que esta cultura é originária de gramíneas silvestres, que se desenvolveram no sudeste asiático, próximo dos rios Eufrates e Tigre (DE MORAES FERNANDES et al., 2000), por volta dos anos 10.000 a 15.000 a.C.

Botanicamente pertencente à família Poaceae, subfilo *Triticinae*, gênero *Triticum*, (SCHEEREN, 1986). As espécies pertencentes a este gênero apresentam sete cromossomos, entretanto, são observadas variações quanto ao nível de ploidia, formados a partir de três genomas distintos AA, BB e DD, podendo ser diploides AA ($2n=14$), tetraplóides AABB ($2n=28$), ou podem ainda apresentar hexaploidia AABBDD ($2n=42$). Diante desta ampla variabilidade apresentada dentro do gênero *Triticum*, as espécies de trigo mais cultivadas comercialmente no mundo são do tipo comum hexaploide, *Triticum aestivum* L., e do tipo duro tetraplóide, *Triticum durum* L. (DE MORAES FERNANDES et al., 2000; POPPER et al., 2006).

O trigo foi uma das primeiras culturas domesticadas, entre 7.000 e 9.000 a.C. e desde então, passou por um processo de grande expansão por todo o mundo (BELL, 1987). Atualmente o trigo de panificação, *Triticum aestivum* L., é a espécie mais cultivada, sendo conhecidas mais de 20 mil variedades. Tal diversidade é resultante da hibridização natural de três genomas diferentes (AA, BB e DD), o que garante grande capacidade adaptativa frente a diferentes condições ambientais (CUNHA et al., 1999).

O trigo é considerado um dos principais constituintes da alimentação humana (BRAMMER et al., 2000), sendo classificado como um cereal importante para obtenção de proteínas, carboidratos e minerais (GILL, 2010), constituindo assim a base alimentar de diferentes países, principalmente após a transformação do cereal em farinha, o que proporciona uma grande variabilidade de transformações possibilitando a fabricação de pães, bolos, macarrão, entre outros (SINGH;

CHAUDHARY, 2006). É consumido de forma direta ou indireta por 35% da população global (BACALTCHUK, 1999).

Atualmente, a produção mundial de trigo encontra-se distribuída em diferentes países, sendo que a União Européia se apresenta como a maior produtora de trigo no mundo, seguido pela China, Índia, Rússia, entre outros.

De acordo com Bacaltchuk (1999), até 2020 serão consumidos 1 bilhão de toneladas de trigo ao redor do mundo devido ao constante aumento populacional. Entretanto para atender esta demanda, será necessário aumentar a produção em torno de 2,5% ao ano, o que corresponde passar o atual rendimento anual que se apresenta em torno de 2,5 toneladas por hectare para 4,5 toneladas por hectare.

Apesar do Brasil não ser um dos maiores produtores de trigo, quando comparado ao mercado mundial, na América do Sul, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção deste cereal, ficando atrás apenas da Argentina (AGRIANUAL, 2008), conforme apresentado na figura 1.

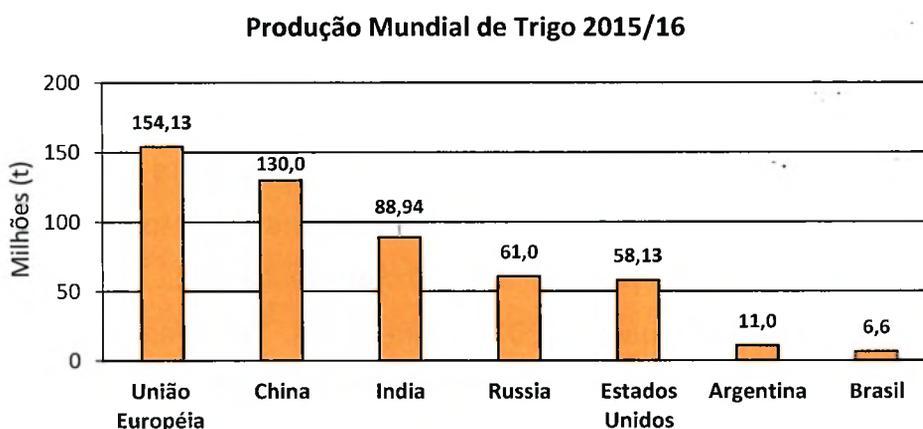


Figura 1 - Comparação da produção de trigo entre os principais países que apresentam a produção deste cereal.

No Brasil, o trigo teve seu cultivo alterado em diferentes estados ao longo dos anos (IGNACZAK et al., 2006). Atualmente, encontra-se dividido em três regiões tritícolas: Região Sul-Brasileira (RS e SC), Região Centro-Sul-Brasileira (PR, MS e SP) e Região Centro-Brasileira (GO, DF, MG, MT e BA) (CUNHA et al., 2006). Entretanto, a região sul apresenta-se com destaque, sendo responsável por 90% da produção nacional (LIMA, 2004).

2.2. Doenças do trigo

De acordo com Mingoti et al., (2014) e Roman (2005), o Brasil apresenta grande potencial para expansão do cultivo de trigo, tanto em produtividade quanto em área. Entretanto, este acréscimo na produtividade da triticultura brasileira pode encontrar limitações de ordem biótica e abiótica, tais como: pragas, doenças, condições climáticas diversas e composição do solo (CUNHA et al., 2006).

As doenças bióticas do trigo podem ser classificadas em quatro grandes grupos: (I) doenças causadas por fungos, (II) doenças causadas por bactérias, (III) doenças causadas por vírus e (IV) doenças causadas por nematoides (MEHTA, 1978).

Nos últimos anos, as doenças causadas por fungos ocupam um lugar de destaque devido aos grandes prejuízos gerados para os agricultores (MURRAY, 2010). Dependendo do patógeno, condições climáticas e cultivar, as doenças fúngicas podem ocasionar prejuízos de até 100% em diferentes áreas de cultivo (MEHTA, 1993).

Todas as partes aéreas da planta podem ser afetadas por fungos fitopatogênicos, no entanto, os maiores danos ocorrem durante o período de formação da espiga, impedindo a formação do grão e conseqüentemente ocasionando queda drástica no rendimento (IGARASHI; BALAN, 2004; PRESTES et al., 2007). Dentre os principais fungos causadores de infecção floral, atualmente ocupam posição de destaque a doença conhecida como brusone causada, por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., e a doença denominada giberela ou fusariose, causada por *Fusarium graminearum* (Schwabe) Petch; sendo que plantas infectadas por ambos patógenos apresentam sintomas confundíveis e dependentes das condições climáticas para o seu estabelecimento, por isso, as epidemias variam de ano para ano.

2.3. A brusone do trigo

A doença denominada brusone é causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, um ascomiceto filamentososo (OU, 1980) que atinge várias culturas como o arroz, cevada e trigo (COUCH et al., 2005). Os primeiros relatos sobre a ocorrência de brusone descrevem a doença em cultura de arroz, sendo esta descoberta em 1.637 na China e no Japão (BEDENDO; PRABHU, 2005). A ocorrência de brusone em trigo era

desconhecida para a ciência até a sua primeira detecção em campos de cultivo brasileiro (IGARASHI et al., 1986).

A brusone do trigo, também conhecida como branqueamento da espiga, é uma doença que foi detectada pela primeira vez no norte do Paraná, em meados da década de 80 (IGARASHI et al., 1986); disseminou-se rapidamente para outras regiões tritícolas brasileiras, tais como: São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e cerrado do Brasil Central (LASCA et al., 2001). Quatro anos após os primeiros registros na cultura de trigo em áreas brasileiras, o fungo identificado como *Magnaporthe grisea*, causou grandes prejuízos em campos tritícolas do Paraguai (TORRES et al., 2009). A Argentina constatou as primeiras perdas ocasionadas por tal patógeno em 2007, com 100% de plantas infectadas (PERELLÓ et al., 2011). Atualmente, além do Paraguai e Argentina, também há relatos no Uruguai e Bolívia (URASHIMA, 2010). Porém, tal fitopatógeno apresenta potencial para disseminação em outras regiões tritícolas de importância ao redor do mundo, como África e Ásia (EMBRAPA, 2009); o que tem preocupado diferentes comunidades científicas.

2.4. Taxonomia do patógeno, ciclo da doença e sintomatologia

O agente causal da brusone do trigo é o fungo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. (teleomorfo) cujo anamorfo é *Pyricularia grisea* (Cook) Sacc., e apresenta seu ciclo biológico apenas na forma anamórfica, sendo a teleomórfica relatada apenas em laboratório (AGRIOS, 2005). O patógeno na forma assexuada pertence à espécie *Pyricularia grisea*, classe dos fungos mitospóricos Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales e família Monoliaceae (MENEZES; OLIVEIRA, 1993). É descrito como um fungo que se desenvolve em colônias que adquirem uma coloração cinza–claro, que produz conídios aderidos aos conidióforos com formato piriformes, lisos com base arredondada e afinado em direção ao ápice (PURCHIO-MUCHOVEJ; MURCHOVEJ, 1994) (Figura 2), no entanto, podem apresentar variação nas dimensões dos conídios entre os isolados (PRABHU; FILIPPI, 2006), sendo que em isolados provenientes de trigo a média é de aproximadamente 23x17µm (MEHTA, 1998).

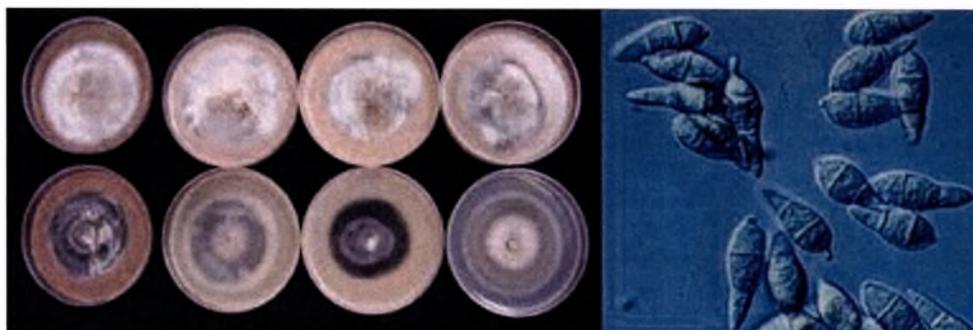


Figura 2 - Aspecto do crescimento do fungo *Pyricularia grisea* em placa de Petri (fonte: www.cnpt.embrapa.br) Características dos conídios em formato piriforme (fonte: www.orsementes.com.br).

O patógeno tem a capacidade de sobreviver em restos de cultura, sementes, hospedeiros alternativos e culturas que permanecem no campo após a colheita, podendo ser encontrados na forma de micélio ou conídios (REIS et al., 1988). De acordo com REIS et al., (1995), as sementes de trigo infectadas com o patógeno, podem se apresentar com uma das principais fontes primárias de inóculo. Além disso, segundo Urashima et al., (2007), o vento estabelece um importante meio de dispersão do patógeno através do transporte dos conídios pelo ar, podendo atingir campos localizados a pelo menos 1 quilômetro de distância do foco inicial da doença. Uma vez disseminado, o agente biológico entra em contato com as folhas, podendo infectar as folhas de diferentes alturas e a espiga (FILIPPI et al., 2006). A infecção ocorre devido à presença de uma cobertura mucilaginosa, formada por carboidratos e glicoproteínas, que permitem a adesão dos conídios na superfície vegetal com altos teores de umidade (HOWARD, VALENT, 1996). A presença da alta umidade é imprescindível para a germinação e posteriormente para a formação do tubo germinativo a partir dos conídios, que é favorecido pelo contato com a água de 30 a 120 minutos (PRABHU; FILIPPI, 2006). De acordo com Picinini e Fernandes (1995), a presença de orvalho durante 2 ou 3 dias favorece o estabelecimento da doença, pois tal umidade permite a formação de um apressório na extremidade do tubo de germinação, que é altamente melanizada, rompendo mecanicamente a superfície externa da planta após o aumento da pressão de turgor (TALBOT, 2003; SESMA; OSBOURNE, 2004). Isto permite sua penetração e colonização nas células vegetais (LEITE et al., 2001). As etapas de infecção são apresentadas na figura 3. Após a colonização intracelular da folha, a planta passa a apresentar lesões devido à formação de novos conídios assexuais (RIBOT et al., 2008).

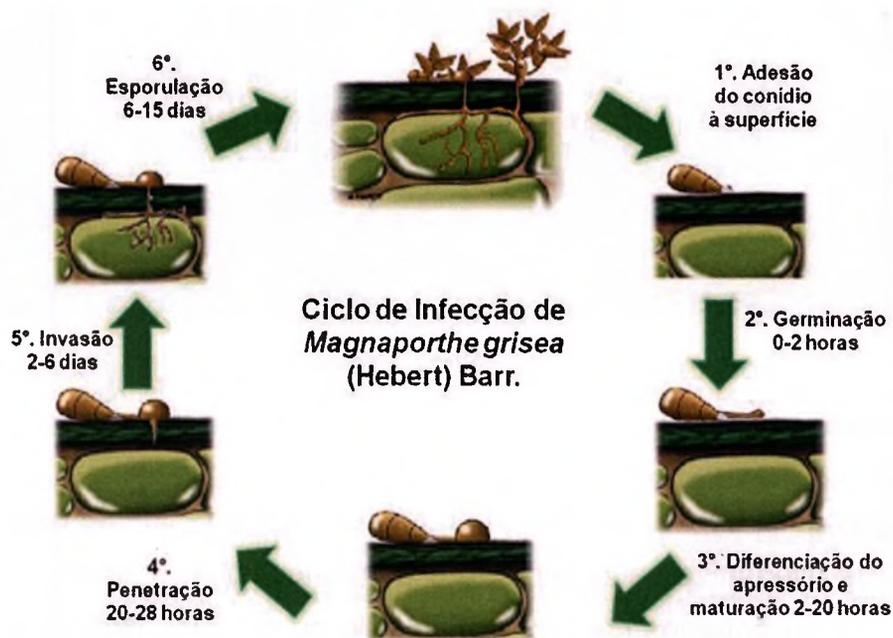


Figura 3 - Etapas do ciclo de infecção de *Magnaporthe grisea*. Adaptação de: Ribot et al., 2008.

Como consequência da invasão dos tecidos vegetais e extração de nutrientes, a planta passa a apresentar sintomas visíveis externamente, sendo inicialmente descrita como uma doença específica das espigas, devido ao branqueamento das mesmas (IGARASHI, 1988). No entanto, já se sabe que este fungo pode espalhar-se para o caule, nódulos ou panículos (DEAN et al., 2005) e manifestar-se em todos os órgãos aéreos da planta, tais como: folhas, colmos, bainhas, nós, pedúnculos e glumas (IGARASHI, 1988).

A infecção da espiga é a forma mais destrutiva, pois inviabiliza o grão (CRUZ et al., 2009), ocasionando grandes perdas em peso por espiga, podendo variar de 63,4% a 72,5% dependendo da época e grau de infecção (GOULART; PAIVA, 2000; GOULART et al., 2007). Os sintomas nas espigas são evidenciados pelo branqueamento parcial ou total da mesma acima do local da lesão. Tais lesões apresentam necrose a partir do ponto de infecção para cima, o que impede a translocação de água e nutrientes, prejudicando o desenvolvimento da espiga e consequentemente ausência de coloração (IGARASHI, 1988; IGARASHI; BALAN, 2004), assim como mostra a figura 4 (A e B). A interrupção do transporte de água e nutrientes para a espiga impede a formação do grão, comprometendo assim, a sua qualidade final (TOLEDO 2004).

Os sintomas nas folhas podem ser observados após o surgimento de uma lesão com coloração central que varia de branco a castanho claro e apresenta margens castanho-avermelhadas. As lesões possuem forma elíptica e alongada, com dimensões de 2 a 25 mm x 1 a 22 mm (Figura 4C), (TOLEDO; ESCOBAR, 2002). A doença se inicia nas folhas localizadas na parte mais inferior, porém pode progredir para as folhas superiores.

Em sementes infectadas, as mesmas aparentam estar sadias, porém o fungo pode ficar alojado no endosperma, sendo posteriormente transmitido após a germinação, apresentando-se como um importante meio de infecção primária. Durante o processo de amadurecimento da semente, estas podem apresentar má formação (TOLEDO; ESCOBAR, 2002).



Figura 4 - (a) Espigas de trigo com morte de espiguetas apresentando sintomas característicos; Fonte: Ana Gabriele B. Castelliani; (b) Espiguetas com presença de micélio cinza indicando sinais do patógeno (seta vermelha); (c) lesão foliar em formato elíptico. Fonte: Embrapa Trigo.

No entanto, apesar do fungo *Magnaporthe grisea* ser descrito como um patógeno de parte aérea, Sesma e Osbourn (2004) descrevem que tal patógeno apresenta a capacidade para infectar raízes e espalhar-se para o restante dos tecidos devido a uma estrutura de infecção chamada hifopódio, comumente produzida por fungos que infectam raízes; tais estruturas são encontradas, por exemplo, em *Gaeumannomyces graminis-tritici*, causador do mal-do-pé. É um patógeno existente

no solo que afeta diferentes cultivares de trigo (SANGUIN et al., 2009). Isso sugere algumas características genéticas são conservadas entre fungos distintos referentes às diferentes estratégias de colonização de plantas (HEUPEL et al., 2010). Entretanto, tais mecanismos precisam ser elucidados, visando a compreensão dos processos infecciosos utilizados por este agente patogênico.

O desenvolvimento do ciclo da brusone, desde a germinação dos conídios até o surgimento das primeiras lesões, é totalmente dependente de fatores ambientais, tais como disponibilidade de água e temperatura. Regiões com clima quente e que apresentam alta umidade devido às precipitações pluviais moderadas, apresentam alta vulnerabilidade para incidência do patógeno em áreas destinadas à triticultura, pois estas variáveis ambientais afetam diretamente a relação patógeno-hospedeiro (REIS et al., 1988). A umidade e a temperatura atuam como um catalisador, podendo acelerar ou retardar o processo infeccioso e reprodutivo do patógeno (REIS et al., 2004). Segundo OU (1985), quanto maior o período de molhamento foliar, maior a infecção. Estes resultados corroboram com os apresentados por Picinini e Fernandes (1995), que indicam a alta vulnerabilidade de cultivares à brusone após três dias consecutivos sob a presença de orvalho. Estudos também descrevem a alternância de luz como um fator importante que influencia diretamente a esporulação, atuando no crescimento micelial e favorecendo a produção de conídios. Quanto menor for o número de horas de exposição ao sol, maiores são as probabilidades de ataque do fungo *Maganaporthe grisea* (PHABHU; FILIPPI, 2006).

Por se tratar de um patógeno altamente dependente das condições ambientais, a ocorrência de brusone em áreas de cultivo é variável de ano para ano e se apresenta de forma distinta em diferentes áreas de plantio. Diante disso, as constantes alterações ambientais observadas nos tempos atuais, podem favorecer o surgimento da brusone em áreas que não relatavam sintomas da infecção por tal patógeno, devido à rápida alteração da temperatura e umidade resultante das alterações climáticas. Desta forma, torna-se necessário o estabelecimento de medidas de controle que se apresentem eficazes diante do patógeno para diferentes localidades.

2.5. A giberela em trigo

No Brasil e no mundo, o principal patógeno associado à giberela do trigo é o fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamorfo: *Fusarium graminearum* Schwabe (DEL PONTE et al., 2004). O fitopatógeno foi descrito pela primeira vez, pelo americano Schweinitz em 1982, com o nome *Sphaeria zeae* (SACCARO, 1882). E após cem anos, o micologista britânico corrigiu o nome para *Gibberella zeae* (DESJARDINS, 2003).

A doença denominada giberela ou fusariose, foi descrita pela primeira vez em 1884 na Inglaterra e demonstrou ser uma ameaça para a cultura do trigo e cevada durante o início do século XX (MURIUKI, 2001). Desde então, a doença tem sido relatada na Ásia, Canadá, Europa e América do Sul, promovendo danos à produtividade e comprometendo a qualidade dos grãos (PARRY et al., 1995; MCMULLEN et al., 1997). A doença é descrita como dependente das condições ambientais, tais como: períodos prolongados de chuva e temperatura média maiores que 20°C (REIS, CASA e MEDEIRA, 2001).

No Brasil, estudos recentes indicam que a doença é uma das mais frequentes na região Sul do país, atingindo principalmente áreas de cultivo de trigo (PANISSON et al., 2003). As epidemias ocorrem de forma leve e esporádica, porém causa enormes impactos econômicos para a economia do país (DEL PONTE et al., 2004). As constantes epidemias relatadas no Brasil são resultado das condições climáticas favoráveis encontradas principalmente na região Sul brasileira para o desenvolvimento do patógeno, que pode causar perdas superiores a 50% (SNIJDERS, 1990).

2.6. Taxonomia do patógeno, ciclo da doença e sintomatologia

A giberela é considerada uma doença monocíclica, ou seja, apresenta um único ciclo durante o período de cultivo. O fungo coloniza restos culturais durante a entressafra, como um organismo saprofítico. Nestes resíduos vegetais o fitopatógeno produz esporos assexuais, que podem ser liberados e dispersos por ação mecânica. Estes esporos são chamados de macroconídios, que, sob condições ideais de molhamento, formam estruturas que liberam os ascósporos (esporos sexuais) que passam a ocupar a superfície do vegetal no qual está associado, podendo ser dispersos por longas distâncias através da ação do vento e da chuva (REIS, 1988).

Além disso, o fitopatógeno também apresenta a capacidade de associar-se com as sementes, desta forma, o plantio constante de sementes contaminadas contribui com a disseminação da doença e início do ciclo reprodutivo do patógeno (Figura 5).

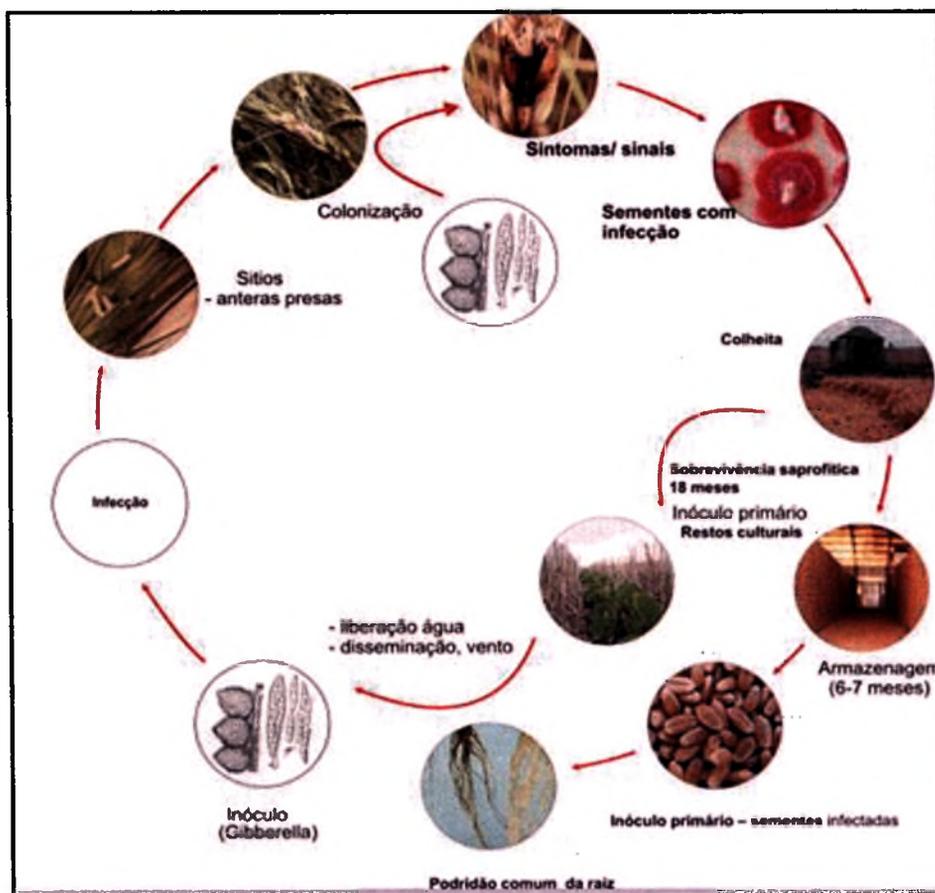


Figura 5 - Ciclo reprodutivo da giberela, causado pelo fungo *Gibberella zeae* em trigo (Fonte: : Danelli e Reis, 2012).

Tanto os macroconídios como os ascósporos, infectam os tecidos sob condições de alta umidade e com temperaturas entre 20 e 30°C. Ambas estruturas quando em contato com as espigas, ou durante o período de extrusão das anteras, penetram no tecido vegetal e propagam-se através das ráquis. Os ascósporos vindos pelo ar depositam-se sobre as anteras, germinam e pelo filete atingem o ovário. Quando depositados sobre as glumas, antes da extrusão das anteras, podem permanecer viáveis até o desenvolvimento destas para que possam germinar e penetrar no tecido, causando senescência prematura dos tecidos da espiga. A planta atacada por giberela apresenta sintomas semelhantes aos da brusone, ou seja, ocorre descoloração da espigueta. Entretanto, a giberela apresenta uma alteração do sentido das aristas (Figura 6 A e B) (REIS, 1988).

Grãos infectados apresentam-se deformados e chochos (Figura 6C) e podem conter micotoxinas produzidas pelo fungo (PAULITZ, 1999), que podem apresentar efeitos tóxicos aos seres humanos e animais (BOTTALICO; PERRONE, 2002)

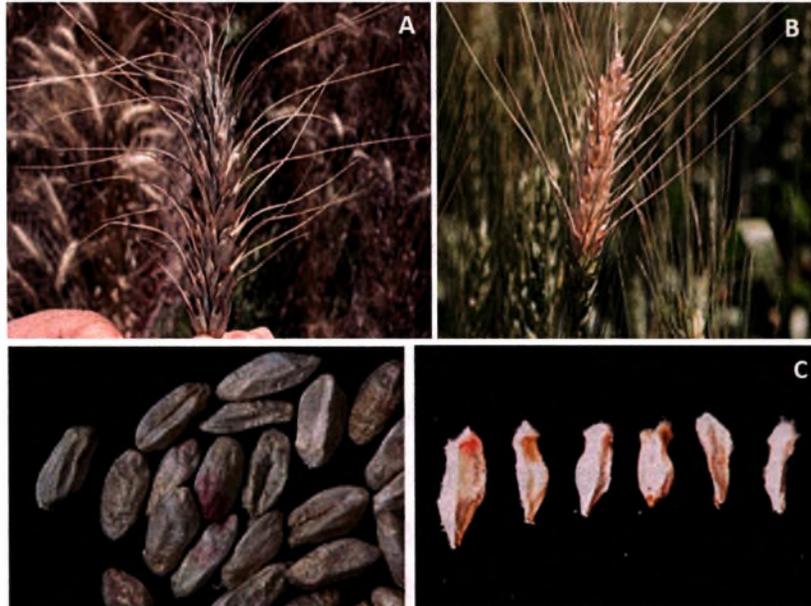


Figura 6 - Sintomas de giberela em espigas de trigo (A) aristas com característica de giberela, comparando com (B) espigas com sinais de brusone (Fonte: Danelli e Reis (2012)). (C) Sementes de trigo com giberela, mostrando sintomas enrugados, chochos e róseos. Fonte: Ariano Moraes Prestes.

A cada ano o Brasil vem apresentando mais intensidade de giberela em lavouras de trigo, tal aumento pode ser resultado das atuais técnicas agrícolas realizadas por diferentes produtores, que consiste em manter restos culturais sobre a superfície do solo, contribuindo assim com uma maior quantidade de inóculo no ar (PANISSON, 2003). Além disso, o fungo causador da giberela apresenta uma ampla gama de hospedeiros, o que dificulta o seu controle em restos culturais (MAULER-MACHNIK; ZAHN, 1994).

A ocorrência da giberela resulta na perda da qualidade dos grãos, reduzindo a sua qualidade e gerando grandes perdas econômicas. A produção de micotoxinas, por parte dos fungos que colonizam os grãos, pode causar diversos problemas a pessoas e animais, ao ingerirem os grãos contaminados (MARASAS et al., 1984).

2.7. Medidas de controle

Diversos trabalhos com diferentes abordagens têm sido realizados com o intuito de minimizar o impacto destes patógenos sobre a triticultura de países da América do Sul, porém todos os estudos são realizados separadamente para cada fungo. Sendo eles: o tratamento de sementes realizados com o uso de fungicidas de amplo espectro (GOULART; PAIVA, 1991; (GARCIA JUNIOR; VECHIATO e MENTEN, 2008), alternância da época de semeadura visando melhores condições ambientais (GOULART et al., 2001), uso de cultivares com resistência parcial (IGARASHI, 1990; URASHIMA; KATO, 1994; GOULART et al., 1996), entre outros. Entretanto, estas alternativas de controle resultam em um controle ineficiente, pois apresentam limitações e muitas vezes não são expressas da mesma maneira quando aplicadas em diferentes regiões geográficas (CRUZ et al., 2010), devido às diferenças das condições climáticas e variabilidade do patógeno, que confere uma maior adaptação ao ambiente e até mesmo a hospedeiros distintos (URASHIMA et al., 2004).

A brusone e a giberela são doenças que ocorrem diante das mesmas condições ambientais, tais como temperatura em torno de 24 a 30°C e ambos patógenos necessitam de altas umidades para que ocorra a infecção (MCMULLEN et al., 1997; (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007). A busca por medidas de controle efetivas diante de ambos os fitopatógenos de trigo, pode se apresentar como uma alternativa relevante, pois o controle de apenas um fitopatógeno tende a deixar a planta susceptível à outra doença.

Para ambas as doenças, a prática de plantio tardio tem sido bastante utilizada por diferentes produtores, entretanto, pode deixar a cultura vulnerável a outras condições que podem influenciar no rendimento e qualidade dos grãos. A realização da semeadura tardia visa evadir-se dos períodos chuvosos no início do ciclo da cultura (SANTANA et al., 2009). Entretanto, o controle da brusone e giberela por meio da variação da data de plantio não tem apresentado eficiência devido às inconstâncias climáticas apresentadas em diferentes regiões, com alternância de anos extremamente secos e anos extremamente chuvosos.

A ausência de fungicidas eficientes tem se mostrado um grande problema (EMBRAPA, 2009); além de que as recomendações para época ideal de aplicação e quais produtos utilizar também são apresentadas de forma variável (IGARASHI, 1988; RIEDE, 2004; GOULART et al., 2007). Medidas para o controle da brusone com o uso

de defensivos químicos tem mostrado baixa eficiência, não ultrapassando 50% de potencial de controle, independentemente do princípio ativo utilizado (GOULART, 2004). Para a giberela, o uso correto do fungicida e a descrição da melhor época para aplicação é uma das maiores barreiras para o controle da doença. Além disso, tais produtos podem ser aplicados diversas vezes o que pode acarretar um aumento do custo de produção (EMBRAPA, 2009).

A constante resistência apresentada por organismos alvo frente às substâncias aplicadas tem sido apontada como uma grande problemática, pois tem diminuído o potencial de tal tratamento (GERHARDON, 2002). Além disso, o uso indiscriminado destas substâncias pode ter impactos negativos sobre o ambiente, reduzindo a qualidade e a sustentabilidade do solo, além de afetarem as comunidades de organismos nativos não-alvo (YANG et al., 2011).

As medidas para o controle da brusone do trigo ainda não se apresentam de forma eficaz, sendo considerada uma doença de difícil controle (URASHIMA et al., 2004, GOULART et al., 2007). A busca por medidas de controle efetivas tem sido apontada como prioritária, em função da baixa eficiência das técnicas e produtos atualmente utilizados (CRUZ et al., 2010).

O uso de fungicidas é a técnica mais utilizada por diferentes produtores de trigo a fim de se evitar ou controlar o fungo causador da giberela, porém, a aplicação de tais medidas de controle não apresenta um padrão, ou a indicação de qual seria o melhor momento para o uso destes, de forma a garantir bons resultados (PICININI; FERNANDES, 2001). Desta forma, os níveis utilizados podem ser acima da dose recomendada, prejudicando a saúde humana e o meio ambiente.

De acordo com Silva et al., (2009), sementes infectadas transmitem diferentes patógenos para toda parte aérea do trigo, e mesmo que sejam utilizadas sementes com baixa incidência do agente biológico, pode haver transmissão do mesmo, comprometendo assim a produtividade. De tal forma, o controle químico de sementes é indicado visando a redução do inóculo inicial através da proteção da plântula, reduzindo assim, a transmissão do patógeno para a parte aérea (GOULART et al., 1991). Mesmo o patógeno podendo ser disseminado de outras formas, a utilização do tratamento de sementes, compõe uma das mais importantes estratégias que podem ser utilizadas na busca por medidas de controle da brusone e giberela em trigo, pois os fungos apresentam potencial para sobreviver longos períodos dentro da mesma

(REIS et al., 1995). Entretanto, estudos detalhados são necessários, pois diferentes tratamentos em sementes podem reduzir a germinação das mesmas.

Dentre todas as medidas adotadas visando à prevenção da brusone e da giberela em trigo, todas as metodologias indicadas apresentam fatores limitantes de eficácia. Entre as novas estratégias de controle que vêm ganhando espaço nos sistemas agrícolas, o controle biológico é uma das alternativas viáveis e apresenta menor impacto sobre o ambiente (FREITAS; AGUILLAR-VILDOSO, 2004), além de poder apresentar potencial para controle de ambos patógenos causadores da brusone e da giberela em trigo.

2.8. Controle biológico

Atualmente, o cenário agrícola mundial tem apresentado alterações quanto ao uso de defensivos químicos. Esta mudança pode ser explicada devido ao constante apelo para adoção de medidas menos agressivas, pois o uso de tais substâncias representa riscos para a saúde humana e ambiental (GERHARDSON, 2002). E estima-se que 90% dos pesticidas aplicados não alcançam o alvo, causando problemas de ordem ambiental, como a contaminação da água, solo, animais (BETTIOL; MORANDI, 2009) e diminuição de micro-organismos benéficos (GRIGOLETTI et al., 2000).

A procura por produtos e alimentos livres de resíduos provenientes de aplicações de agrotóxico, tem sido crescente no mercado mundial. Uma das alternativas que tem apresentado grande potencial na redução do uso de agrotóxicos é o controle biológico, pois representa um menor impacto sobre o ambiente, além de apresentar-se como uma alternativa viável frente a diferentes patógenos (FREITAS; AGUILLAR-VILDOSO, 2004) e contribuir significativamente com a redução de gastos com agrotóxicos utilizados na agricultura.

Controle biológico pode ser definido como a utilização intencional de organismos vivos, residentes ou introduzidos na planta hospedeira, que apresentem atividade antagonista supressora a uma determinada população patogênica ao hospedeiro, ou de maneira mais simples, é o controle de um micro-organismo patogênico por outro micro-organismo (PAL, GARDENER, 2006). A utilização de micro-organismos com o objetivo de biocontrole em plantas é registrada desde o início do século XX, sendo estes, até então utilizados massivamente em inúmeras

pesquisas com o intuito de controle das mais variadas doenças causadas por bactérias, fungos, nematoides ou vírus (ROMEIRO, 2005). O biocontrole com microorganismos antagonistas pode utilizar organismos isoladamente ou como suplemento, minimizando a ação do patógeno e diminuindo o uso de pesticidas químicos. Nos últimos anos tem se apresentado como uma alternativa importante para o sistema de manejo integrado de doenças (FREITAS; AGUILLAR-VILDOSO, 2004).

O potencial de biocontrole que determinados grupos microbianos podem apresentar diante do agente patogênico é resultado de diferentes interações específicas e não específicas e podem apresentar mais de um modo de ação que garantem o controle dos organismos alvo, sendo os mais descritos:

- Competição: Disputa por espaço e/ou nutrientes em um mesmo nicho ecológico (DJONOVIC et al., 2007);
- Micoparasitismo: Degradação da parede celular, por ação enzimática, que garante o controle de fungos fitopatogênicos (CHET, BENHAMOU, 1998);
- Indução de resistência: Organismos com potencial antagônico quando aplicados à superfície foliar ou em associação com as raízes podem atuar como agentes indutores de resistência no organismo hospedeiro (HELBING, 2001);
- Antibiose: Inibição do crescimento microbiano através da produção de compostos bioativos, resultantes do metabolismo secundário (BERDY, 2005);

Diversos mecanismos de ação podem atuar no agente controlador de fitopatógenos, entretanto, o contexto ambiental em que estes organismos estão inseridos pode resultar em todos estes tipos de interações com diferentes intensidades (PAL; GARDENER, 2006).

O controle biológico pode atuar em diferentes partes doentes da planta hospedeira, tais como: filoplano (superfície das folhas), sementes, frutos e rizosfera (solo aderido as raízes sob a influência de exsudatos radiculares) (Grigoletti et al., 2000) e ao ocuparem estes diferentes nichos, agem como tampão biológico, prevenindo a infecção do patógeno e atuando no controle biológico natural (Bettiol, 1991). Estas populações com potencial supressor são obtidas a partir dos inimigos naturais do patógeno e podem apresentar atividade de biocontrole não só sobre as culturas a partir das quais foram obtidas, mas também de outras culturas que apresentem tal patógeno (Gnanimanickam, 2002).

2.9. Controle biológico com micro-organismos da rizosfera

A região de solo que circunda as raízes das plantas é chamada de rizosfera, esta região está em constante interação com as raízes e conseqüentemente, com uma grande quantidade de micro-organismos (PHLIPPOT et al., 2013), devido à grande disponibilidade de compostos secretados e liberados pelas raízes das plantas, denominados exsudatos radiculares (MONTEIRO et al., 2012). Os exsudatos podem atuar como sinalizadores químicos e favorecer o estabelecimento de comunidades microbianas benéficas, que podem garantir proteção por meio de diferentes mecanismos de ação direta ou indireta (BAIS et al., 2004). Os micro-organismos obtidos a partir da rizosfera são ideais para uso como agentes de biocontrole, pois esta é a região em que ocorre a maior parte das interações entre micro-organismo, planta e patógeno, oferecendo uma defesa para as raízes contra o ataque de patógenos (Weller, 1988; Dantas et al., 2011).

Diversos trabalhos têm relatado o uso de isolados provenientes da rizosfera com potencial para atuarem como agentes de biocontrole diante de diferentes patógenos (Lucon, Melo, 1999; Amorim, Melo, 2002; Bello et al., 2002; Santos et al., 2011; Silva et al., 2012; Ludwig et al., 2013), indicando que este é um nicho ecológico que apresenta grande potencial para obtenção de agentes de biocontrole.

A interação entre micro-organismos rizosféricos e as plantas, na maioria dos casos, passa a ser benéfica e essencial para saúde do vegetal (FIGUEIREDO et al., 2010), devido à atividade antagonista que determinados grupos microbianos apresentam diante de micro-organismos fitopatogênicos, garantindo proteção à planta hospedeira (RAMAMOORTHY et al., 2001). Esta capacidade antagonista ocorre principalmente por meio da antibiose, que envolve a produção de metabólitos secundários e impede que os patógenos colonizem a rizosfera e estabeleçam a doença na planta (DOUMBOU et al., 2001). Estes micro-organismos benéficos também são conhecidos como agentes biocontroladores, além de apresentarem atividade antagonista devido à antibiose, podem atuar da mesma forma por meio da competição, parasitismo e predação (WHIPPS, 2001), como já mencionado anteriormente. Além disso, determinados micro-organismos podem atuar como indutores de resistência na planta, por meio da ativação de respostas específicas de defesa contra determinado patógeno (TAIZ, ZEIGER, 2004), sendo esta uma técnica de controle alternativo que não afeta o meio ambiente (CRUZ, 2011).

De acordo com Berendsen et al., (2012), a composição da comunidade microbiana da rizosfera é específica para cada planta, indicando que cada micro-organismo apresenta afinidade com determinado genótipo, ou seja, existe um grau de especificidade na interação entre genótipo da planta e a composição de sua comunidade de micro-organismos rizosféricos.

Entre os principais grupos microbianos presentes na rizosfera com potencial de aplicação no controle biológico de fitopatógenos, destacam-se as bactérias, e em especial o grupo das actinobactérias (ARAÚJO, 1998). Tais populações apresentam eficiência diante de uma vasta gama de patógenos, em diferentes plantas hospedeiras. As populações de actinobactérias são importantes componentes da comunidade rizosférica microbiana, e tais organismos tem demonstrado enorme potencial com agentes de biocontrole contra diferentes patógenos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Actinobactérias são bactérias gram-positivas encontradas facilmente no solo, sendo conhecidas em função da ampla variedade de compostos bioativos produzidos e diversidade funcional, tais como: produção de quitinase (GOMES et al., 2000), celulase (LIMA et al., 2005), fitohormônios (SHRIVASTAVA; SOUZA; DESAI, 2008), agentes antitumorais (CRAGG; KINGSTON; NEWMAN, 2005), substâncias que estimulam o crescimento vegetal e colonização em ectomicorrizas (RIEDLINGER et al., 2006), interação benéfica com outras rizobactérias (GREGOR; KLUBEK; VARSA, 2003), solubilização de fosfato inorgânico (HAMADALI et al., 2008), entre outros. Porém, a maior parte dos estudos descreve a capacidade de produção de metabólitos secundários com grande diversidade química que atraem o interesse de diversas indústrias (SOARES et al., 2012). Diante desta ampla capacidade metabólica, as actinobactérias são consideradas fontes incomparáveis na busca por novos produtos naturais que promovam o biocontrole de fitopatógenos, visando à diminuição de compostos sintéticos na agricultura.

Além das actinobactérias, as bactérias do gênero *Bacillus* são constantemente utilizadas para o biocontrole de diferentes patógenos (BETTIOL, 1991). Este grupo de micro-organismos apresenta capacidade para ocupar diferentes nichos ecológicos quando em associação com diferentes plantas (CAMPOS SILVA et al., 2008), além disso, estes procariotos apresentam a formação de endósporos, que lhes confere maior resistência a condições ambientais desfavoráveis (LANNA FILHO et al., 2010). Devido a estas características, este grupo tem sido usado comercialmente para o

biocontrole de enfermidades de diferentes plantas, assim como para aumentar a produtividade devido à estimulação do crescimento de plantas (YAO et al., 2006).

O controle biológico exercido pelas bactérias contra diferentes fungos fitopatogênicos é o resultado de diferentes mecanismos que garantem a sobrevivência em ambientes competitivos como o solo (GERHARDSON, 2002). Diante desta ampla gama de mecanismos que garantem a sobrevivência destas populações, as bactérias apresentam grande potencial para atuarem como agentes de biocontrole.

Por conta das relações biológicas estabelecidas na rizosfera com a planta hospedeira, vários micro-organismos já foram identificados como agentes de controle biológico (GNANAMANICAKAM, 2002). O uso de práticas que favoreçam o crescimento de micro-organismos antagonistas nativos ou a introdução de espécies com este potencial, são abordagens que podem melhorar significativamente a saúde de diversas plantas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Esforços têm sido feitos para a descoberta da diversidade de micro-organismos da rizosfera de trigo (VELÁZQUEZ-SEPÚLVEDA et al., 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre o potencial antagonista que determinadas comunidades microbianas da rizosfera, provenientes de variedades de trigo, podem apresentar diante do fungo causador da brusone e da giberela em trigo.

2.10. Importância das ferramentas moleculares para estudo de comunidades bacterianas

Os micro-organismos podem ser estudados por metodologias dependentes ou independentes de cultivo. Entretanto, as técnicas dependentes de cultivo são conhecidas por apresentarem uma determinada limitação, que impossibilita o estudo das comunidades microbianas presentes nos mais diversos ambientes.

Visando contornar tais barreiras, nos últimos anos, técnicas moleculares vêm sendo aprimoradas de forma a permitir uma melhor compreensão da distribuição dos micro-organismos em diferentes habitats (DIAS, 2010). A análise realizada a partir de genes informativos, tais como 16S e 18S rRNA (CAPORASO, 2012), permite uma melhor compreensão dos grupos microbianos, sem a necessidade de cultivo dos mesmos em condições de laboratório.

Várias ferramentas podem ser utilizadas para acessar as comunidades microbianas presentes nos mais diversos nichos. A metagenômica, que utiliza técnicas genômicas independentes de cultivo para o estudo de comunidades microbianas em seu ambiente natural (CHEN; PACHTER, 2005), tem sido empregada em vários tipos de amostras ambientais (ADAMS ET AL. 2009). Os estudos que envolvem a metagenômica, em geral têm por objetivo a identificação de genes funcionais, estimativa da diversidade microbiana, compreensão da dinâmica populacional de comunidade ou montagem de genomas completos de organismos não-cultiváveis (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008).

O uso desta ferramenta molecular a fim de se determinar a composição da comunidade bacteriana associada ao trigo ainda é restrita, não apresentando resultados atuais ou sob diferentes variáveis. Desta forma, o conhecimento das populações de procariontes associados com o trigo, pode fornecer informações importantes quanto a organismos com potencial antagônico, efeito de diferentes tratamentos sobre os organismos não-alvo e perfil das comunidades de acordo com o estágio de desenvolvimento do vegetal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Áreas de estudo e coleta das amostras de solo e rizosfera de *Triticum aestivum*

Os locais de coleta de solo e rizosfera foram determinados de acordo com áreas que apresentavam cultivo anual de trigo (*Triticum aestivum* L.) no Brasil, totalizando dois pontos de coleta em duas diferentes regiões brasileiras, sendo uma oriunda do estado de São Paulo e a outra proveniente de Brasília/DF.

O primeiro local de coleta pertence ao estado de São Paulo, município de Palmital (S 22° 47' 30"; W 50° 12' 18") (Figura 7). Trata-se de uma área particular, denominada Fazenda São José, onde anualmente é cultivado trigo da variedade IAC 385. A primeira coleta foi realizada em Julho de 2014 e as plantas encontravam-se no estágio 64 da escala fenológica de Zadoks et al., (1974), conforme indicado na figura 8 (A). A segunda coleta foi realizada em Setembro do mesmo ano e as plantas encontravam-se no estágio 80 da escala de Zadoks et al., (1974), conforme indicado na figura 8 (B). Ambas as coletas foram realizadas próximo ao ponto de irrigação suplementar e as plantas não apresentavam sinais de infecção por brusone ou giberela, entretanto, a ocorrência de ambas as doenças foi relatada em anos anteriores.

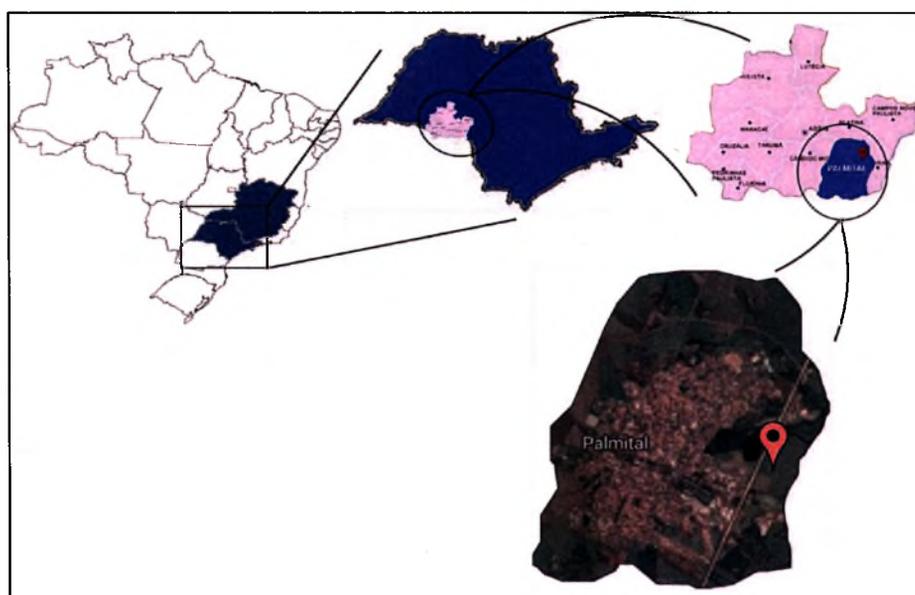


Figura 7 - Localização da área de amostragem realizada em Palmital /SP.

O segundo local de coleta pertence à Brasília, DF, no município de Planaltina (S 15°36'; W 47°42'). As amostras foram enviadas pelo pesquisador Dr. Angelo Aparecido Barbosa Sussel, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária unidade Cerrados – EMBRAPA Cerrados, em Planaltina, DF. As coletas foram realizadas no setor de campos experimentais da unidade (Figura 9) e as plantas pertenciam à cultivar BRS 208. A coleta foi realizada em Agosto de 2014, obtendo-se plantas no estágio 65 (Figura 8 A) e 90 (Figura 8 B) da escala de Zadoks et al. (1974). Nesta área o trigo é cultivado em sistema de sequeiro, suplementado com irrigação, e as plantas não apresentavam sinais de infecção por nenhum dos fitopatógenos que serão utilizados no presente estudo.

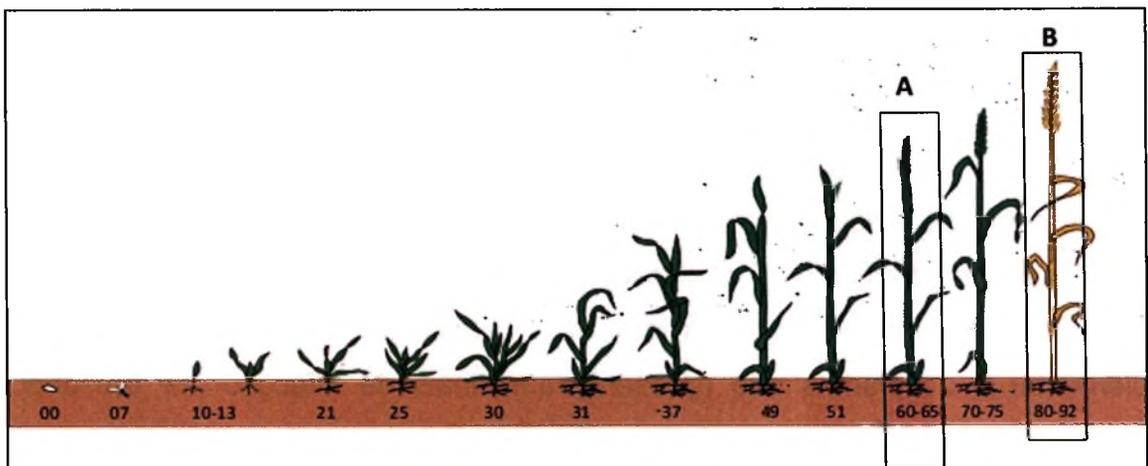


Figura 8 - Estádios de desenvolvimento do trigo conforme escala de Zadoks (Zadoks et al. 1974), indicando o momento de coleta em cada localidade, sendo coleta realizada em triplicata em Palmital /SP durante os estádios 64 (A) e 80 (B) e coleta realizada em triplicata em Planaltina /DF, durante os estádios 65 (A) e 90 (B).

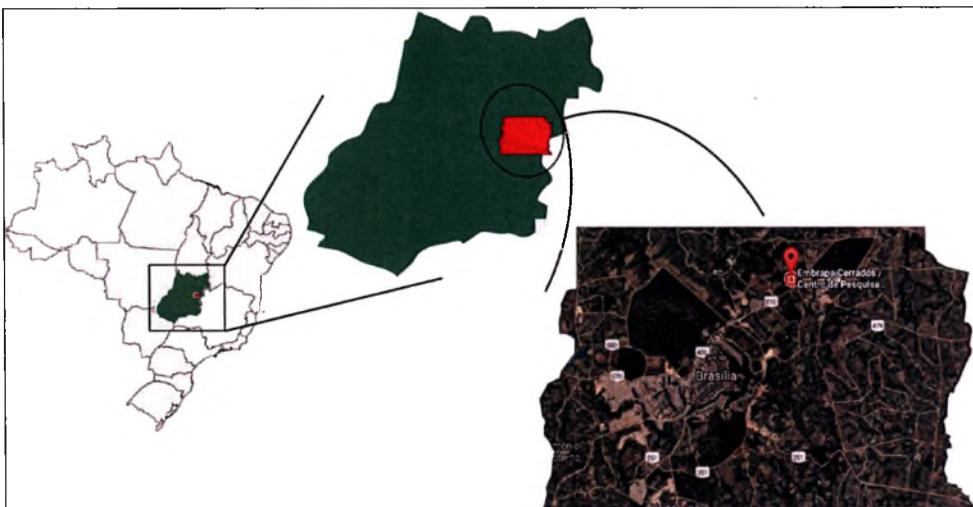


Figura 9 - Localização da área de amostragem realizada em Planaltina /DF.

Para cada ponto de coleta foram determinados três locais de amostragem, sendo retiradas três repetições de cada um, totalizando nove amostras de solo e nove amostras de solo rizosférico.

Para a obtenção de amostras da rizosfera, as plantas foram coletadas cuidadosamente, de modo a preservar o solo aderido às raízes. Para as amostras de solo, as mesmas foram retiradas próximas às plantas, porém sem a presença das raízes. Todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

Um resumo de todas as amostras obtidas encontra-se descrito na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 Identificação das amostras de solo e rizosfera coletadas de duas regiões produtoras de trigo em diferentes estádios de desenvolvimento.

Código	Tipo	Área	Variedade	Estádio de desenvolvimento	Mês da coleta
1TR	rizosfera	Palmital	IAC 385	64	Julho
2TR	rizosfera	Palmital	IAC 385	64	Julho
3TR	rizosfera	Palmital	IAC 385	64	Julho
1TS	solo	Palmital	IAC 385	-	Julho
2TS	solo	Palmital	IAC 385	-	Julho
3TS	solo	Palmital	IAC 385	-	Julho
4TR	rizosfera	Palmital	IAC 385	80	Setembro
5TR	rizosfera	Palmital	IAC 385	80	Setembro
6TR	rizosfera	Palmital	IAC 385	80	Setembro
4TS	solo	Palmital	IAC 385	-	Setembro
5TS	solo	Palmital	IAC 385	-	Setembro
6TS	solo	Palmital	IAC 385	-	Setembro
AR1	rizosfera	Planaltina	BRS 208	65	Agosto
AR2	rizosfera	Planaltina	BRS 208	65	Agosto
AR3	rizosfera	Planaltina	BRS 208	65	Agosto
AS1	solo	Planaltina	BRS 208	-	Agosto
AS2	solo	Planaltina	BRS 208	-	Agosto
AS3	solo	Planaltina	BRS 208	-	Agosto
BR1	rizosfera	Planaltina	BRS 208	90	Agosto
BR2	rizosfera	Planaltina	BRS 208	90	Agosto
BR3	rizosfera	Planaltina	BRS 208	90	Agosto
BS1	solo	Planaltina	BRS 208	-	Agosto
BS2	solo	Planaltina	BRS 208	-	Agosto
BS3	solo	Planaltina	BRS 208	-	Agosto

Na figura 10 está representado um esquema geral das etapas desenvolvidas nesta pesquisa.

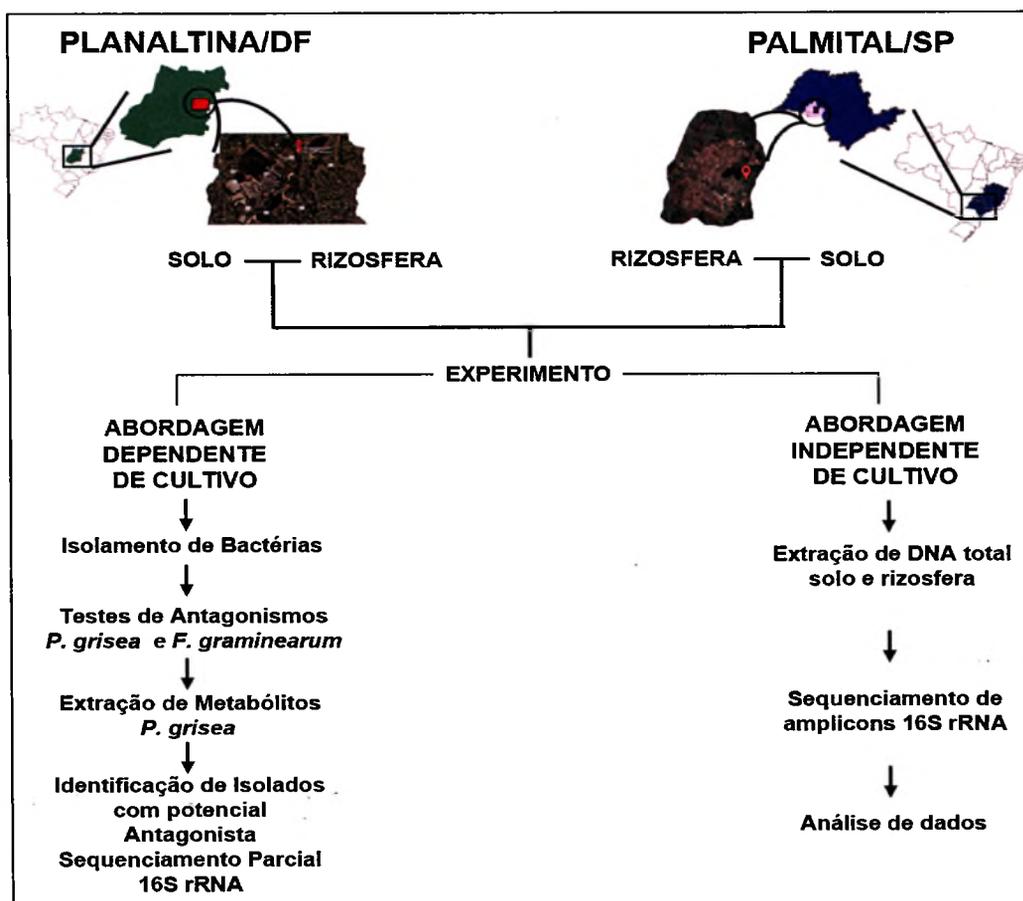


Figura 10 - Esquema da metodologia desenvolvida.

3.2. Análise do potencial de bactérias associadas ao trigo em inibir fungos fitopatogênicos por meio de técnicas dependentes de cultivo

3.2.1. Isolamento de bactérias a partir de amostras de solo e rizosfera de trigo

Para isolamento de bactérias do solo e rizosfera, cerca de 1 g de solo foi pesado e transferido para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina (0,85% NaCl), mantidos por 10 minutos em agitador Vortex e por 20 segundos em ultrassom (Ultracleaner 1400A), a fim de promover a liberação e homogeneização da suspensão bacteriana. Após o período de homogeneização foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} , seguida da retirada de alíquotas de 0,1 ml das duas últimas diluições que foram plaqueadas em meios de cultura apropriado, sendo utilizado o meio de cultura Tryptone Soya Agar (TSA) para o isolamento de bactérias e o meio GA (Yang et al., 2008) para isolamento de actinobactérias.

Os micro-organismos obtidos após o isolamento foram purificados por estrias de esgotamento em meio sólido específico para cada grupo microbiano, visando a obtenção de colônias isoladas. O procedimento foi repetido de acordo com a necessidade e os isolados foram mantidos em seus respectivos meios de cultura até análises posteriores.

3.2.2. Linhagens de fungos fitopatogênicos utilizadas

Duas linhagens de *Pyricularia grisea* (PY5003 e 36.1) (causador da brusone do trigo), cedidas pela Embrapa Trigo localizada em Passo Fundo (RS) e uma linhagem de *Fusarium graminearum* (causador da giberela em trigo), obtida no departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Estes foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) para ativação.

A fim de se confirmar a similaridade das linhagens fúngicas cedidas PY5003 e 36.1, quanto à similaridade com a espécie *Pyricularia grisea*, foi realizada a extração de DNA, devido à ausência das características morfológicas descritas na literatura. Como controle negativo, foi utilizada a linhagem pertencente à espécie *F. graminearum*. Utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores MHP1F e MHP1R (Su'udi et al., 2013) foi gerado um fragmento de aproximadamente 161 pb. Este gene tem papel na hidrofobicidade da superfície, desenvolvimento do fungo relacionado à infecção e é necessário para a patogenicidade de *P. grisea* (Kim et al., 2005), sendo denominado de magnaporina. Para isto, as linhagens foram inoculadas em meio de cultura líquido contendo Batata Dextrose (BD) e submetidas à agitação e temperatura de 28°C para crescimento por sete dias. Após este período, o DNA de cada linhagem foi extraído utilizando-se nitrogênio líquido e/ou β -mercaptoetanol e/ou kit da MoBio para extração de DNA de micro-organismos, com protocolo modificado. A biomassa fúngica foi transferida assepticamente para placas de Petri com papel filtro esterilizado, em seguida, transferida para cadinho e macerada com nitrogênio líquido até obtenção de um pó. A biomassa foi transferida para um tubo de microcentrífuga e a ela foi adicionado 1 ml de solução CTAB. As amostras foram aquecidas a 70°C por 20 minutos e agitadas num vortex por 10 minutos. Após duas centrifugações a 10000 x g por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 μ l da solução Microbead disponível no kit. Após agitação por 7 segundos, a suspensão foi

transferida para os tubos Microbeads e o protocolo foi seguido de acordo com especificações do fabricante.

3.2.3. Avaliação antifúngica por meio de antagonismo direto

As bactérias foram semeadas em meio (Batata-dextrose-ágar) BDA, estriadas a 3 centímetros de distância dos extremos da placa de Petri e incubados por cerca de 2 dias a 28°C, a fim de garantir acúmulo de metabólitos no meio. Posteriormente, um disco (0,5 cm de diâmetro) de micélio dos fungos fitopatogênicos (*Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*) foi inoculado no centro da placa de Petri e esta foi incubada a 25°C de 10 a 15 dias. As placas sem inóculo bacteriano foram utilizadas como controle e este experimento foi realizado em triplicata. A inibição do patógeno foi medida em milímetros e a porcentagem de inibição (PI) determinada de acordo com a fórmula:

$$PI = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Onde:

C; é o crescimento (mm) de *P. grisea* ou *F. graminearum* na ausência da bactéria.

T; é o crescimento (mm) de *P. grisea* ou *F. graminearum* na presença da bactéria.

3.2.4. Seleção das linhagens com potencial para controle biológico

Os isolados que apresentaram melhores resultados com relação ao antagonismo direto para as três linhagens de fungos, foram submetidos a cultivo em meio líquido e a ensaios “*in vitro*” para avaliação do potencial de suas biomoléculas com atividade antimicrobiana para *P. grisea* apenas.

3.2.5. Avaliação do potencial de inibição dos extratos brutos

Após a seleção dos isolados que apresentaram atividade antagonista, os mesmos foram crescidos em meio de cultura líquido por um período de 4 dias para bactérias em meio Tryptone Soya Broth (TSB) e de 7 dias para actinobactérias em meio Glucose Yeast (GY). Após o crescimento, foi realizada a extração dos metabólitos utilizando os solventes acetato de etila e diclorometano, ambos em pH ácido (3,0). Estes extratos foram submetidos à bioensaio fungicida de acordo com os

procedimentos descritos por Santos et al. (2001) usando a linhagem do fungo fitopatogênico *Pyricularia grisea* PY 5003.

3.2.6. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados referentes aos testes de antagonismo *in vitro*, foi utilizado o teste de Tukey (5%) com o auxílio do programa computacional Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3.3. Identificação das linhagens bacterianas com atividade antagônica por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA

3.3.1. Extração de DNA genômico

Após a obtenção dos isolados com potencial antagonista, foi realizada a extração de DNA destes, de acordo com Sunnucks e Hales (1996) com algumas modificações. Os isolados foram crescidos em 5 mL de TSB (Tryptone Soya Broth) a 28°C por 24 horas para bactérias e 5 mL de GY (Glucose Yeast) a 28°C por 96 horas para actinobactérias, ambos mantidos a 150 rpm. Após o crescimento, as colônias foram centrifugadas a 14000 x g por 5 minutos, e submetidas à extração com kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MOBio*, de acordo com as especificações do fabricante.

3.3.2. Amplificação do gene 16S rRNA

A reação de amplificação do gene 16S rRNA de bactéria foi realizada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos 27F e 1492R (Tabela 2), em quatro repetições e as reações de PCR foram realizadas para um volume de 25 µL, contendo 1 µl de DNA genômico, 2,5 µl de tampão de PCR 10X, 1,0 µl de solução de MgCl₂ (50 mM), 0,65 µl de dNTPs (10 mM cada), 0,5 µl do *primer* 27F (10 mM), 0,5 µl do *primer* 1492R (10 mM), 0,3 µl de *Taq* polimerase (5U/µl) e 17,7 µl de água *Milli-Q* autoclavada. As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems), programado para realizar uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C; 1 minuto a 55°C; 2 minutos a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 2 - *Primers* da região 16S rRNA utilizados nas reações para sequenciamento das bactérias antagonistas.

<i>Primers</i>	Sequências (5' – 3')	Fragmento (pb)
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~1.500
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACT	

Fonte: Heuer et al. (1997)

3.3.3. Purificação dos produtos de PCR e quantificação em gel de agarose

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit *Wizard® SV and PCR Clean-UP System* (Promega). Após a purificação, o DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% com o marcador *Low mass*.

3.3.4. Reação para sequenciamento

Após a quantificação dos produtos de PCR, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento nas seguintes condições: 2µl tampão 5x ABI; 1µl *Primer*; 1µl *BigDye*; 1µl DNA e água ultrapura (Millipore) ajustada para o volume final de 10µl, sendo a reação realizada em termociclador AB *Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle*, nas seguintes condições 96°C/1min; 35 ciclos de 96°C/15seg, 50°C/15 seg, 60°C/4 min; 4°C infinito.

3.3.5. Precipitação

As amostras foram precipitadas com adição de 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL de acetato de sódio (3 M) e 50 µL de álcool etílico (100%), seguida de mistura por inversão quatro vezes e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 30 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, em cada amostra foram adicionados 70 µL de álcool etílico (70%) e centrifugadas a 1650 x g por 15 minutos a 4°C. O excesso de álcool etílico foi evaporado a temperatura ambiente, após a evaporação completa do álcool, as amostras foram precipitadas e ressuspensas com 10µl de formamida HIDI.

3.3.6. Análise das sequências e construção da árvore filogenética dos isolados

Todas as sequências obtidas do sequenciador foram processadas utilizando o software *Sequencher 5.4.1* onde foram tiradas as regiões de baixa qualidade. As sequências, após processamento, foram comparadas com o banco de dados *EzTaxon* (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Para a construção da árvore filogenética, as sequências originais foram alinhadas com referências encontradas no banco de dados NCBI. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011), com o auxílio da ferramenta CLUSTALW e posterior correção manual.

As árvores filogenéticas foram divididas de acordo com o perfil de similaridade apresentado pelas linhagens, resultado na construção de quatro árvores com uma divisão baseada em clados.

3.4. Análise da estrutura e composição de bactérias associadas ao trigo por meio de técnicas independentes de cultivo

3.4.1. Extração de DNA metagenômico de solo e rizosfera

O DNA metagenômico de amostras de solo e rizosfera, coletadas no item 3.1 para as duas áreas de amostragem, foi extraído utilizando-se o *Power Soil™ DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A qualidade de DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) e fotografado.

3.4.2. Preparo das bibliotecas de amplicons 16S rRNA

Todas as amostras tiveram a concentração de DNA ajustada para 3ng/μl. Em seguida, o DNA metagenômico de cada amostra foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C) e 1046R (CGA CAG CCA TGC ANC ACC T) flanqueadores da região V6 do gene 16S rRNA (Sogin et al., 2006), entretanto, foi sintetizado um oligonucleotídeo iniciador 967F diferente para cada amostra, adicionando um tag de identificação (tabela 3) (barcode) composto por cinco pares de bases, que servirá para identificar a origem de cada uma das sequências, além disso, também foi adicionado o oligonucleotídeo adaptador AF (CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG) em cada um, conforme manual do

fabricante do sequenciador Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies). Já o oligonucleotídeo 1046R recebeu o adaptador 1R (CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT).

Tabela 3 - As amostras foram divididas de forma a serem sequenciadas utilizando-se dois chips, sendo que no chip 1 encontram-se as amostras da área de Palmital-SP; no chip 2 encontram-se as amostras da área de Brasília-DF.

	Amostras	Sequência do barcode
Chip 1	1TR	GCTCA
	2TR	GCATA
	3TR	GCGAT
	1TS	GCAGT
	2TS	TGCTG
	3TS	GTCTG
	4TR	GCGTG
	5TR	GCACG
	6TR	GAGCG
	4TS	CATCG
	5TS	TGTGC
	6TS	TGCAC
Chip 2	BR1	TCGAG
	BR2	TGTAG
	BR3	ACGAC
	BS1	TATAC
	BS2	TCGTC
	BS3	ATGCT
	AR1	GACAG
	AR2	TGACT
	AR3	CTACT
	AS1	CGACG
AS2	TGCGT	
AS3	CGTAC	

Cada biblioteca de amplicon foi gerada por meio da reação de amplificação em solução contendo 5,0 μL de tampão da enzima Dream Taq; 1,0 μL de dNTP (2,5 mM); 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 μL de Dream Taq (Fermentas); 1 μL de DNA metagenômico de cada amostra; água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 49 μL . As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) segundo as condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; extensão final de 10 minutos a 72°C (Sogin et al., 2006). A verificação da qualidade das amostras foi realizada em gel de agarose 2% (p/v). Então, cada biblioteca foi quantificada utilizando-se o Qubit, de modo a no final, obter concentrações equimolares de cada biblioteca em um mesmo chip. Cerca de 30 μL de cada biblioteca (com a concentração já ajustada) foi purificada utilizando-se 54 μL de Agencourt® AMPure® XP Reagent e estante magnética, de acordo com protocolo fornecido por Life Technologies - Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries) (www.iontorrent.com). Após purificação das bibliotecas, foi realizada nova quantificação utilizando-se o Qubit, e as amostras de cada chip foram unidas em um só tubo e foi submetida ao E-Gel, de modo a eliminar fragmentos menores ou maiores que o fragmento de interesse (250 a 300 pb). Em seguida, nova quantificação foi realizada utilizando-se o Qubit e foi preparado um pool equimolar (26 pM) de todas as bibliotecas, de onde 25 μL deste pool foram utilizados para a reação de amplificação de emulsão (PCR de emulsão) utilizando-se o Ion OneTouch™ 2 System, onde os fragmentos das bibliotecas de amplicons foram ligados a esferas, de acordo com protocolo fornecido por Life Technologies - Ion PGM™ 400 Xpress™ Template Kit (www.iontorrent.com). Após recuperação das esferas, foi feito enriquecimento utilizando-se o mesmo sistema. Logo em seguida foi feito o preparo e carregamento das esferas no chip 316 e posterior sequenciamento (Ion Sequencing Kit User Guide v2.0) no sequenciador Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies).

3.4.3. Manipulação e análise das sequências

A manipulação das sequências foi realizada por meio do software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al. 2010). Foi feito o teste de SIMPER (Similarity Percentage) para pesar a contribuição de cada grupo na similaridade/dissimilaridade entre as amostras (Mesel et al., 2004) utilizando-se o software PAST (Hammer et al. 2001). Além disso, a tabela de OTUs gerada foi exportada para o mesmo programa de modo a obter os gráficos de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Análises estatísticas para os índices de similaridade calculados foram realizadas utilizando-se o programa Assistat.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do potencial de bactérias associadas ao trigo em inibir fungos fitopatogênicos por meio de técnicas dependentes de cultivo

4.1.1. Obtenção dos isolados a partir da rizosfera e solo

Foram obtidos 313 isolados provenientes da rizosfera e 293 isolados oriundos do solo de ambos os locais de amostragem, entretanto, tais micro-organismos foram selecionados com base apenas em suas características morfológicas, sendo purificadas colônias com aparências distintas quando comparadas umas com as outras; desta forma a quantificação das unidades formadoras de colônias não foi contabilizada, pois o objetivo seria apenas a obtenção de isolados para testes de antagonismo com fungos fitopatogênicos de interesse. Os resultados obtidos para cada área de amostragem estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Quantificação dos isolados obtidos a partir de cada ponto de coleta provenientes de solo e rizosfera de duas áreas de cultivo de trigo.

		Variedade	Bactérias	Actinobactérias	Total
Rizosfera	Palmital/SP	IAC 385	69	48	117
	Planaltina/DF	BRS 208	125	71	196
Solo	Palmital/SP	IAC 385	59	44	103
	Planaltina/DF	BRS 208	118	72	190

A partir da área de Palmital/SP foram isoladas 69 bactérias e 48 actinobactérias, totalizando 117 procariotos da rizosfera de trigo da variedade IAC 385. Para a área de Planaltina/DF, obteve-se 125 bactérias e 71 actinobactérias, totalizando 196 isolados presentes na rizosfera da variedade de trigo BRS 208. O isolamento realizado com o solo das áreas de cultivo possibilitou a obtenção de 59 bactérias e 44 actinobactérias da área de Palmital/SP, totalizando 103 micro-organismos. Para a área de Planaltina/DF, foram isoladas 118 bactérias e 72 actinobactérias, totalizando 190 procariotos do solo.

A quantidade de isolados obtidos demonstra que o meio de cultura TSA utilizado para o isolamento de bactérias, apresentou-se de forma favorável, tornando possível a obtenção de diferentes colônias bacterianas. Este meio de cultura também possibilitou o crescimento de colônias de actinobactérias, porém em menor quantidade, indicando que esta fonte nutritiva não seria a mais indicada para a obtenção de tal grupo microbiano. Entretanto, este meio de cultivo é descrito como favorável ao crescimento de bactérias heterotróficas (MATEUS et al., 2013).

As actinobactérias obtidas a partir dos dois pontos de coleta foram consideradas prováveis micro-organismos pertencentes a este grupo devido às características apresentadas pelo crescimento da colônia sob o meio de cultura, sendo que as mesmas demonstravam aparência seca, aderidas ao ágar e formando pequenas colônias de crescimento lento, conforme descrito por Goodfellow e Williams (1983) (Figura 1A). A utilização do meio de cultura GA, descrito por Yang et al., (2011), se apresentou mais favorável ao crescimento de actinobactérias, pois dificultou o desenvolvimento dos demais grupos microbianos. Tal fato pode ser explicado devido à presença do amido como um dos componentes utilizados para o preparo deste meio de cultivo, pois este nutriente é considerado uma fonte de carbono complexa que dificulta o crescimento de outros micro-organismos, facilitando assim o desenvolvimento de colônias que possuem crescimento lento, tais como as actinobactérias (HOLT et al., 1994), que apresentaram, em média, crescimento em placa após 10 dias de inoculação. Desta forma, o uso deste meio de cultura proporciona o isolamento eficiente de actinobactérias. Entretanto, o número de colônias isoladas não indica a diversidade, pois como o isolamento foi baseado apenas em características morfológicas, colônias com genótipos iguais podem ter sido isoladas repetidamente. Visando inferir a diversidade das amostras, o mais indicado seria a realização de estudos sobre a comunidade total não cultivável através de análises moleculares. Diante do objetivo em se obter grupos microbianos com potencial de biocontrole, a metodologia empregada apresentou-se satisfatória, proporcionando o isolamento de diferentes colônias bacterianas (Figura 11B, 11C, 11D e 11E).

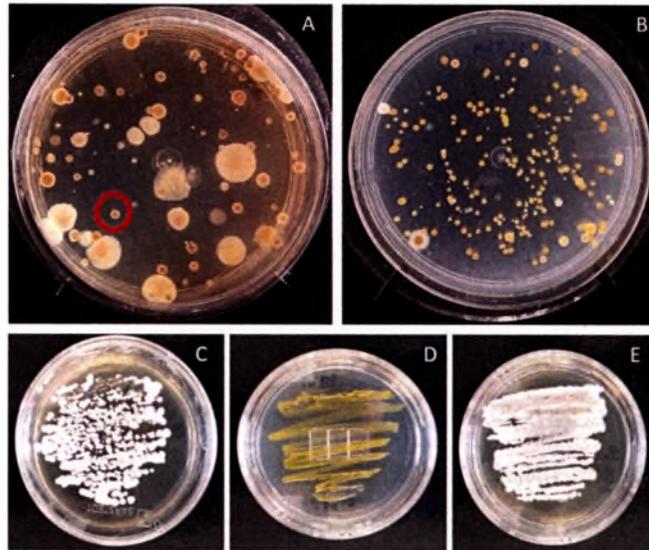


Figura 11 - Diversidade morfológica obtida após o isolamento da rizosfera e solo das áreas de Palmital/SP e Planaltina/DF. (A) colônia característica de actinobactéria destacada pelo círculo vermelho; (B) plaqueamento da diluição da rizosfera; (C, D e E) colônias obtidas após a purificação, sendo C e E actinobactérias e D bactéria.

A quantidade total de micro-organismos obtidos a partir das amostras da área de cultivo localizada em Planaltina (DF) foi maior quando comparada com a área de Palmital (SP). Este perfil de resultado continua sendo observado para as quantidades de bactérias e actinobactérias, de solo e rizosfera entre os dois pontos, onde sempre é possível a observação de quantidade de micro-organismos superiores para a área localizada no Distrito Federal, conforme mostra a figura 12.

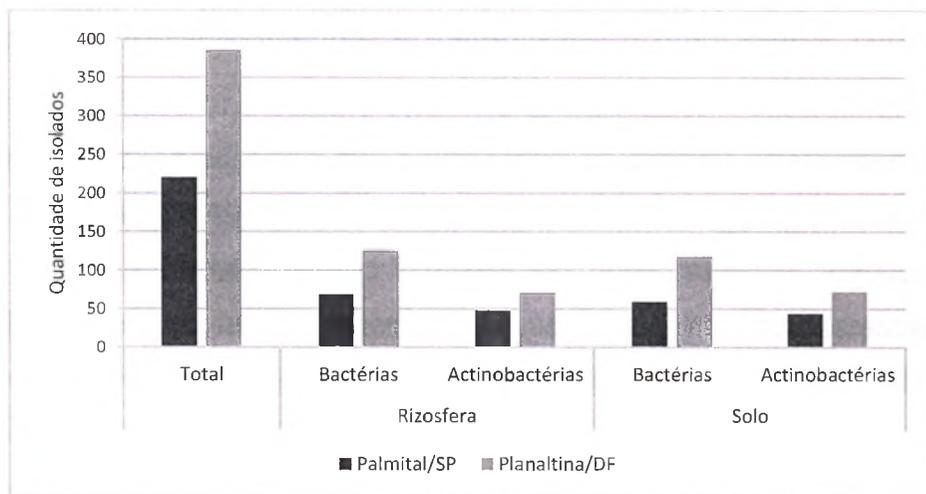


Figura 12 - Quantidade de bactérias e actinobactérias obtidas a partir do solo e rizosfera das áreas de Palmital (SP) e Planaltina (DF).

A pequena diferença apresentada entre a quantidade de isolados obtidos de cada ponto de coleta tanto para a raiz quanto para o solo, pode ser resultado das características do solo de cada região. Pois, segundo INCEOĞLU, SALLES e VAN ELSAS (2012), o tipo de solo exerce uma das maiores influências sobre a composição e estabelecimento das comunidades microbianas na rizosfera, podendo favorecer ou dificultar o crescimento de grupos específicos, de acordo com os constituintes do solo onde o hospedeiro está inserido.

Além disso, cada cultivar tende a apresentar uma determinada composição da comunidade microbiana associada e acredita-se que plantas da mesma espécie, porém de variedades diferentes tendem a selecionar perfis distintos de micro-organismos associados às raízes, devido à liberação de compostos sinalizadores em diferentes quantidades, que por sua vez atuam como moduladores específicos para cada variedade que passa a apresentar comunidades microbianas específicas (INCEOĞLU; SALLES; VAN ELSAS, 2012). Entretanto, estudos mais aprofundados se fazem necessários para a confirmação de padrões distintos de micro-organismos associados às variedades utilizadas no estudo em questão. Resultados referentes à análise independente de cultivo são mostrados posteriormente.

Os micro-organismos sofrem influência direta dos exsudatos radiculares, tipo de solo, estágio fenológico em que a planta se encontra, além da aplicação de pesticidas e características ambientais que cada área pode apresentar (PHILIPPOT et al., 2013), o que torna a amostragem e a quantidade de organismos isolados peculiar para cada local de coleta.

A quantidade total de bactérias obtidas a partir do solo e rizosfera dos dois pontos de amostragem foi superior quando comparada com o número de actinobactérias isoladas, tanto para a rizosfera quanto para o solo. Organismos procariontes são descritos como os mais abundantes nas camadas mais superficiais do solo (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012). Estima-se que em um grama de solo possam ser encontrados aproximadamente um bilhão de bactérias e um milhão de actinobactérias (MENDES et al., 2011), estes podem se apresentar como organismos de vida livre ou formando associações com plantas ou outros organismos, estabelecendo relações benéficas, neutras ou deletérias com diferentes hospedeiros (SCHIPPERS; BAKKER; BAKKER, 1987). Diante de tais características, é de se

esperar um número maior de bactérias após o isolamento, quando comparado com a quantidade de actinobactérias, assim como encontrado no presente trabalho.

A rizosfera é descrita como a parte do solo que está em contato constante com as raízes de uma determinada planta, sendo influenciado diretamente pela exsudação de diferentes compostos radiculares. Tais compostos atuam como sinalizadores para diferentes grupos microbianos, tornando o ambiente rico em micro-organismos, pois estes compostos além de selecionarem determinados grupos de organismos, também favorecem o estabelecimento dos mesmos na área que circunda as raízes (PRASHAR; KAPOOR; SACHDEVA, 2014). Em contrapartida, o solo apresenta uma lenta proliferação de micro-organismos devido à escassez de recursos disponíveis (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012). Tais características favorecem a obtenção de micro-organismos a partir da rizosfera e poderiam explicar a pequena diferença entre as quantidades de micro-organismos obtidos a partir da rizosfera e do solo.

4.1.2. Avaliação antifúngica por meio de antagonismo direto com os fungos fitopatogênicos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*

Após o isolamento e purificação dos isolados bacterianos, todas as colônias obtidas da rizosfera e solo foram submetidas ao teste de antagonismo direto, a fim de determinar a atividade efetiva diante de duas linhagens de *Pyricularia grisea* (PY 5003 e 36.1) e uma linhagem de *Fusarium graminearum*.

A fim de se confirmar se as linhagens fúngicas PY5003 e 36.1 eram de fato pertencentes a espécie *Pyricularia grisea*, os mesmos tiveram seu DNA extraído e utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores MHP1F e MHP1R (SU'UDI et al., 2013) foi gerado um fragmento de aproximadamente 161 pb (Figura 13). Este gene tem papel na hidrofobicidade da superfície, desenvolvimento do fungo relacionado à infecção e é necessário para a patogenicidade de *P. grisea* (KIM et al. 2005), sendo denominado de magnaporina.

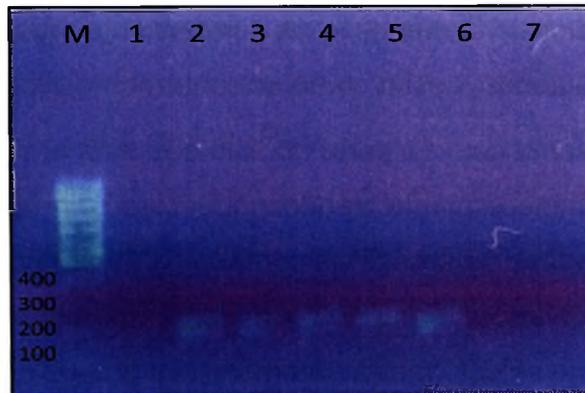


Figura 13 - Gel de agarose a 2% com produtos de PCR obtidos da reação para amplificação do gene correspondente à magnaporina para DNA fúngico extraído de *Fusarium graminearum* e dois isolados de *Pyricularia grisea*. M - Marcador DNA ladder; 1 - *Fusarium graminearum*; 2 - *Pyricularia grisea* linhagem Py5003 DNA extraído com kit; 3 - *Pyricularia grisea* linhagem Py5003 DNA extraído com β -mercaptoetanol; 4 - *Pyricularia grisea* linhagem Py5003 DNA extraído com nitrogênio líquido; 5 - *Pyricularia grisea* linhagem 36.1 DNA extraído com kit; 6 - *Pyricularia grisea* linhagem 36.1 DNA extraído com β -mercaptoetanol; 7 - Controle negativo da reação.

Com base na figura 3, como o DNA obtido de *F. graminearum* não foi amplificado, ao contrário do DNA das duas linhagens de *Pyricularia grisea*, é possível afirmar: que os primers específicos realmente funcionam para a identificação de linhagens de *Pyricularia grisea* e que as linhagens utilizadas no presente trabalho realmente pertencem à *Pyricularia grisea*.

Todos os 606 isolados obtidos de bactérias e actinobactérias nativas do solo e da rizosfera de trigo provenientes dos dois pontos de amostragem foram inicialmente avaliados quanto ao potencial antagônico apresentado diante do fungo *Pyricularia grisea*, linhagem PY 5003. Dentre os 606 isolados testados diante deste fungo, aproximadamente 11% demonstrou potencial inibitório contra esta linhagem. Desta forma, os 66 isolados que apresentaram algum grau de inibição do fungo PY 5003, foram pareados com outra raça de *P. grisea* identificada como 36.1. Assim, 35 linhagens (53%) demonstraram potencial para controle biológico de ambas as raças do fungo causador da brusone em trigo.

Além do teste com as diferentes raças de *P. grisea*, os isolados bacterianos restantes foram avaliados quanto ao potencial de inibição do fungo *Fusarium graminearum*, causador da giberela em trigo. Assim, dos 35 isolados testados, 48% apresentou capacidade de inibir o fitopatógeno.

Desta forma, foram selecionadas 16 linhagens bacterianas com potencial para inibição de dois importantes fitopatógenos de trigo, sendo duas raças de *P. grisea* (Figura 4A e 4B) e uma raça de *F. graminearum* (Figura 4C). Apenas dois isolados

das linhagens selecionadas não apresentaram potencial inibitório para o fungo *F. graminearum*, porém estes demonstraram percentuais de inibição consideráveis para os demais fitopatógenos.

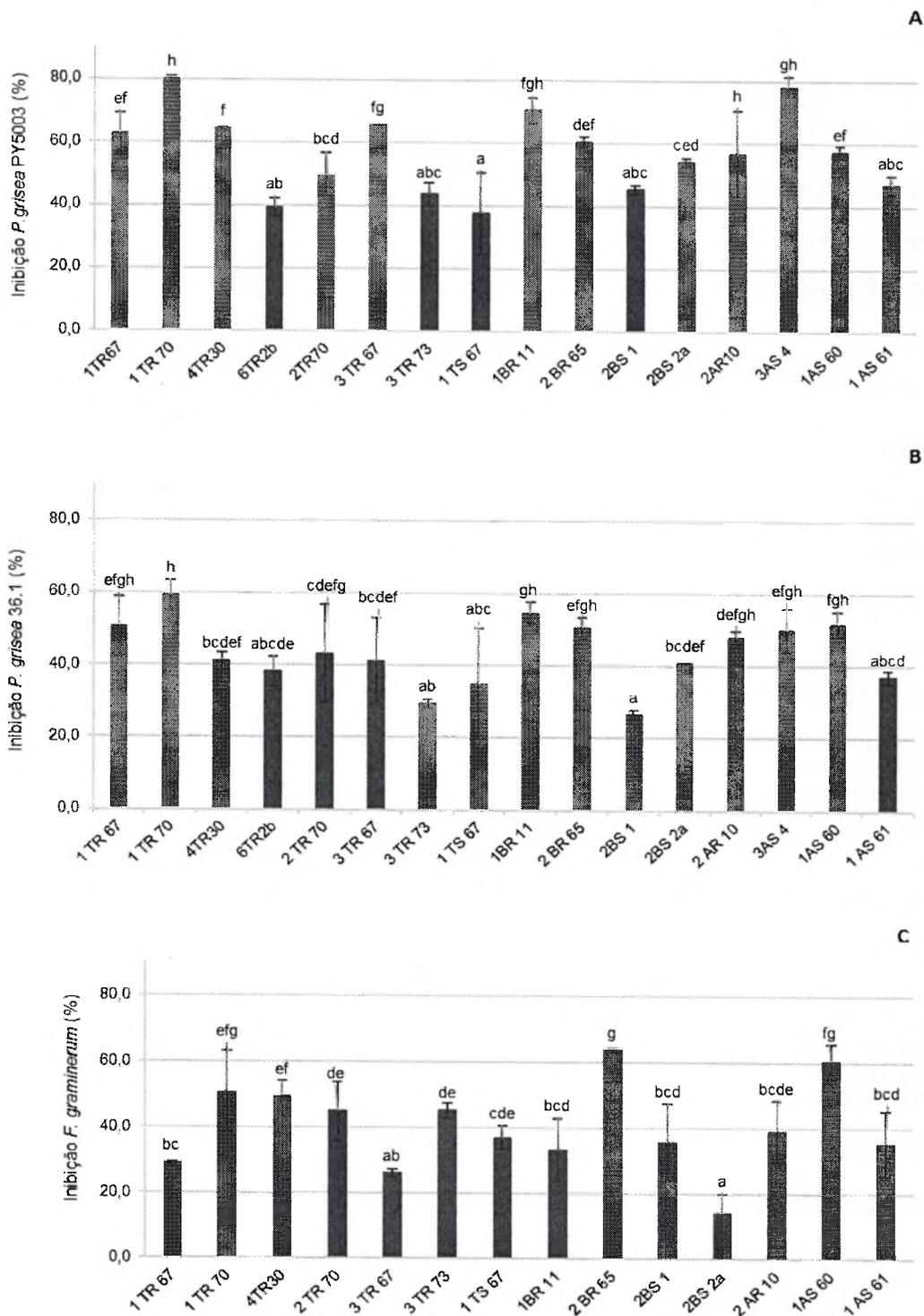


Figura 14 - Percentual de inibição do crescimento micelial de duas raças de *P. grisea* (A e B) e *F. graminearum* (C) apresentado por bactérias e actinobactérias provenientes das duas áreas de cultivo de trigo. As barras representam o desvio padrão das médias (n=12). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente, pelo teste de Tukey.

Os isolados foram submetidos ao teste de inibição do crescimento micelial com diferentes raças deste fungo devido à variabilidade apresentada pelo patógeno. O fungo *P. grisea* apresenta alta variabilidade genética que lhes confere maior adaptação a diferentes ambientes e hospedeiros distintos; esta variabilidade influencia diretamente a agressividade do fungo (CRUZ et al., 2010).

Devido à essa variabilidade demonstrada para fungos fitopatogênicos, Kommedahl, Windels e Wiley (1978), enfatizam a importância de se trabalhar com diferentes raças a fim de se encontrar antagonistas que apresentam amplo espectro inibitório. A utilização de diferentes raças fitopatogênicas, diante de um micro-organismo com potencial antagônico, pode favorecer a utilização deste organismo como agente de controle biológico, pois em condições de campo, diferentes populações do patógeno podem estar presentes no mesmo hospedeiro.

O fungo causador da giberela em trigo (*F. graminearum*) foi utilizado no estudo em questão, devido à ocorrência coletiva de ambos os patógenos em diferentes lavouras de trigo espalhadas pelo Brasil. A ocorrência em conjunto destes organismos pode ser explicada devido à similaridade das condições ambientais ideais para o desenvolvimento dos fungos causadores da brusone e giberela, pois ambas se desenvolvem com temperaturas entre 24 e 30°C e necessitam de altas umidades para que ocorra a infecção (MCMULLEN et al., 1997; (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007).

A busca por micro-organismos que apresentem potencial de inibição dos patógenos causadores da brusone e da giberela apresenta-se como uma técnica importante para o controle biológico destas doenças do trigo. Pois, mais uma vez, como estas desenvolvem-se em decorrência das mesmas condições ambientais, a inibição de apenas um patógeno deixaria a planta hospedeira suscetível ao outro fitopatógeno, impedindo que o produtor não tivesse prejuízos.

A partir do isolamento inicial realizado nos dois pontos de coleta, apenas 2% apresentaram potencial antagônico diante dos três fungos fitopatogênicos de trigo. A tabela 5 apresenta, de forma resumida, todos os 16 isolados positivos e suas características.

Tabela 5 - Isolados bacterianos com potencial antagonista e porcentagens de inibição do crescimento micelial dos fungos *Pyricularia grisea* (PY 5003 e 36.1) e *Fusarium graminearum*.

Isolado	Origem*	Porcentagens de inibição (PI)			
		PY 5003	36.1	<i>F. graminearum</i>	
1TR 67	Actinobactéria	Rizo/Palmital	62,60	50,4	29,0
1TR 68	Actinobactéria	Rizo/Palmital	62,20	33,6	45,0
1TR 70	Actinobactéria	Rizo/Palmital	79,80	59,2	50,8
4TR 30	Bactéria	Rizo/Palmital	64,10	41,2	49,6
6TR 2b	Bactéria	Rizo/Palmital	39,20	38,2	-
2TR70	Actinobactéria	Rizo/Palmital	49,60	43,3	45,0
3TR 67	Actinobactéria	Rizo/Palmital	65,50	41,2	26,1
3TR 73	Actinobactéria	Rizo/Palmital	43,70	29,4	45,4
1TS 67	Actinobactéria	Solo/Palmital	37,5	35,0	40,8
1BR 11	Bactéria	Rizo/Planaltina	70,4	54,6	33,3
2BR 65	Actinobactéria	Rizo/Planaltina	60,4	50,4	63,8
2BS 1	Actinobactéria	Solo/Planaltina	45,3	26,7	35,8
2 BS 2 a	Actinobactéria	Solo/Planaltina	54,2	40,8	14,2
2AR 10	Bactéria	Rizo/Planaltina	56,8	47,9	39,2
3AS 4	Actinobactéria	Solo/Planaltina	78,1	50,0	-
1AS 60	Bactéria	Solo/Planaltina	57,5	51,7	60,4
1AS 61	Bactéria	Solo/Planaltina	47,1	37,1	35,4

*Rizo: Rizosfera

De acordo com Romeiro (2007), apenas um pequeno percentual de micro-organismos presentes na rizosfera ou solo tendem a apresentar a produção de compostos benéficos para as plantas. Estima-se que apenas 2% da comunidade microbiana cultivável apresente mecanismos que possam beneficiar a planta hospedeira (Chen et al., 1996).

Diferentemente do observado para a quantidade total de isolados obtidos, a área de Palmital (SP) proporcionou a maior quantidade de linhagens com potencial antagonico para os três fungos avaliados (Figura 15).

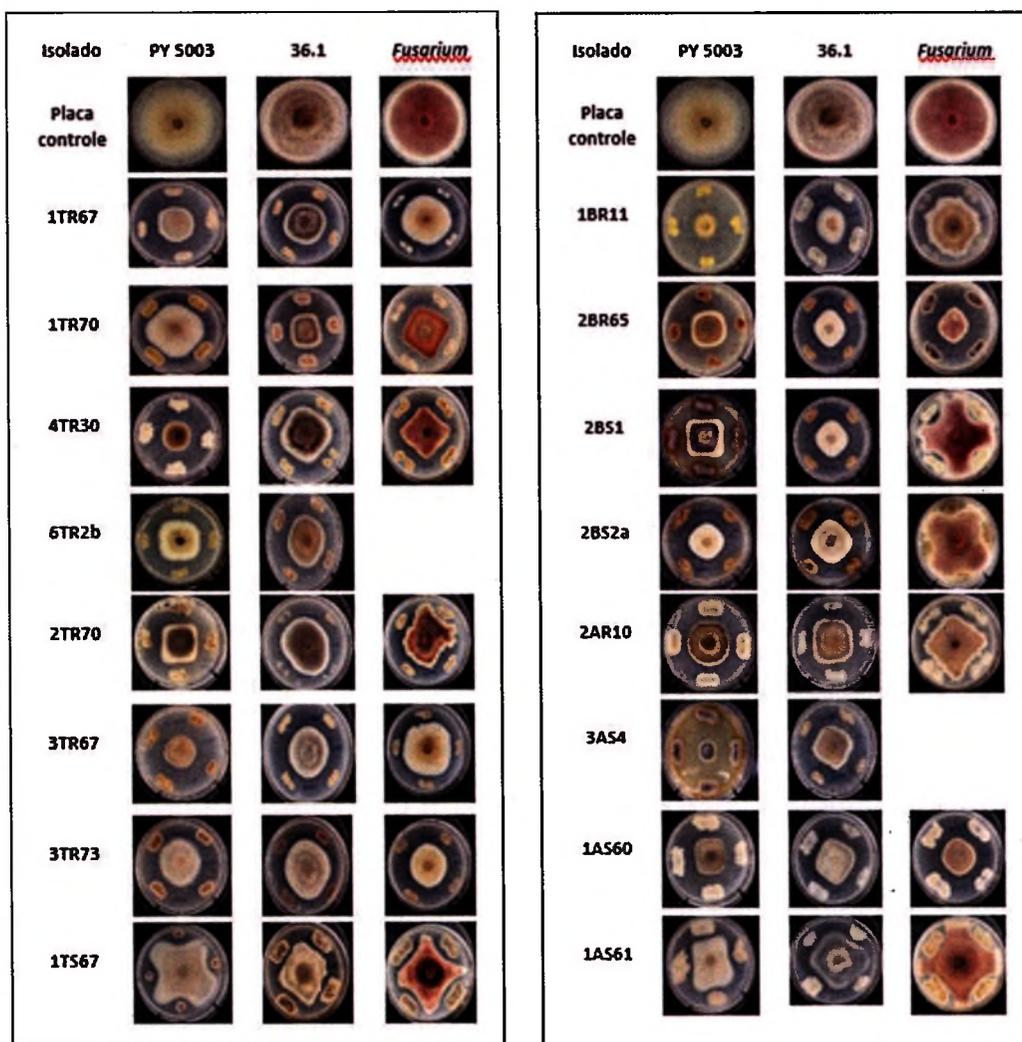


Figura 15 - Inibição do crescimento micelial dos fungos patógenos de trigo *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* pelas bactérias antagonistas isoladas a partir do solo (S) e rizosfera (R) de Palmital/SP (TS e TR) e Planaltina/DF (AS, AR, BS e BR).

Como já mencionado anteriormente, as plantas tendem a moldar o seu microbioma radicular, de forma que este pode tornar-se específico para cada cultivar (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012), devido à secreção ativa de compostos que podem estimular ou reprimir o desenvolvimento de determinados grupos microbianos de acordo com as necessidades e características de cada cultivar (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012). Em estudos com diferentes variedades de batata cultivadas no mesmo solo e em solos diferentes, Weinert et al. (2011) constataram que determinados grupos taxonômicos apresentavam abundância dependente do cultivar, indicando a seleção de grupos microbianos de interesse para cada variedade.

Estes resultados indicam que cada variedade tende a recrutar comunidades que beneficiam o desenvolvimento da planta, como por exemplo, fornecendo proteção contra o ataque de determinados patógenos. Acredita-se que exista uma especificidade entre o genótipo da planta e a composição da comunidade microbiana (MEYER et al., 2010). Desta forma, a quantidade de micro-organismos com potencial para o biocontrole de diferentes fungos tende a ser variável, de acordo com a variedade com a qual este encontra-se associado.

A melhor compreensão dos mecanismos que norteiam o estabelecimento de comunidades com potencial antagônico em associação com as raízes de diferentes plantas, se faz necessária para a otimização de estudos que visam o controle biológico, pois o entendimento de tal dinâmica pode garantir melhores resultados no controle de diferentes patógenos.

A pequena quantidade de linhagens com potencial antagonista provenientes do solo deve-se ao fato do solo ser considerado um habitat que apresenta escassez de recursos disponíveis, o que torna lenta a proliferação bacteriana neste ambiente (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012). Já a rizosfera apresenta maior proliferação microbiana devido à exsudação radicular, que favorece diferentes atividades metabólicas por parte dos micro-organismos, entre eles o potencial antagônico (BAIS et al., 2006). Desta forma o solo rizosférico é considerado o ambiente mais indicado para a obtenção de micro-organismos com diferentes aplicações biotecnológicas (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012; PHILIPPOT et al., 2013).

Dentre os organismos procariontes com potencial antagonista, as actinobactérias compõem o grupo mais abundante para este estudo. Apresentando 11 linhagens (65%) com potencial de biocontrole dos fungos causadores da brusone e giberela em trigo no trabalho em questão.

As populações de actinobactérias são importantes componentes da comunidade rizosférica microbiana e tais organismos apresentam características favoráveis como promotores de crescimento vegetal. Além disso, têm mostrado enorme potencial como agentes de biocontrole contra diferentes patógenos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Diversos trabalhos têm relatado o uso de actinobactérias isoladas de diferentes biomas e empregadas no controle de diferentes patógenos. Silva e Teixeira (2012) descrevem actinobactérias isoladas da rizosfera de

plantas nativas do cerrado com potencial para controle do fungo *Fusarium oxysporum*. Toumatia et al. (2016), buscaram actinobactérias do solo do deserto do Saara e analisaram o potencial para o biocontrole de *Fusarium culmorum* e promoção de crescimento de plantas de trigo. Tais estudos demonstram o grande potencial que este grupo microbiano pode apresentar quando em associação com as raízes de diferentes plantas, principalmente o trigo. As diversas aplicações das actinobactérias como agentes de controle biológico de diferentes fungos patogênicos, se deve principalmente ao fato de que este grupo microbiano é conhecido por apresentar organismos com uma ampla capacidade metabólica, o que contribui para a produção de diferentes compostos antimicrobianos e outros produtos naturais com ampla aplicação na indústria, agricultura e biotecnologia (SOARES; COSTA; SILVA, 2012). Diante disto, as actinobactérias são consideradas fontes incomparáveis na busca por novos produtos naturais que promovam o biocontrole de fitopatógenos, visando à diminuição de compostos sintéticos na agricultura.

A intensa competição por nutrientes e espaço gerada na rizosfera, favorece a produção de diferentes compostos químicos por parte dos micro-organismos e elucidaria o fato da rizosfera apresentar um maior número de linhagens com efeito biocontrolador, quando este é comparado com a quantidade de micro-organismos obtidos a partir do solo.

Apesar de vários trabalhos relatarem o uso de actinobactérias como agentes de biocontrole de diversos patógenos, a aplicação de tal grupo microbiano visando o controle do fungo causador da brusone e da giberela em trigo, ainda é restrita. A maioria dos trabalhos apresentam medidas de controle dos fungos causadores da brusone e da giberela, porém sempre de forma isolada.

4.1.3. Avaliação do potencial inibitório dos extratos brutos de linhagens bacterianas com potencial para biocontrole

As bactérias e actinobactérias que apresentaram potencial de inibição diante de duas linhagens do fungo *P. grisea* identificados como PY 5003 e 36.1, e do fungo *Fusarium graminearum*, respectivamente, foram submetidas à extração de metabólitos secundários, a fim de se determinar um dos possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos

avaliados. Desta forma, os 16 isolados com atividade contra os três fungos tiveram seus metabólitos secundários extraídos, após crescimento em meio líquido.

Estas linhagens foram submetidas à extração com os solventes orgânicos acetato de etila e diclorometano e posteriormente foram avaliadas quanto à porcentagem de inibição de seus extratos brutos, frente ao fungo *P. grisea* (PY 5003). As respectivas porcentagens inibitórias estão apresentadas na tabela 6 e alguns exemplos do halo inibitório são apresentados na figura 16.

Tabela 6 - Porcentagens de inibição (PI) obtidas a partir da atividade apresentada pelo extrato bruto dos micro-organismos selecionados, frente ao fungo *P. grisea* (PY5003).

Isolado		Porcentagens de inibição (PI)	
		Acetato de Etila	Diclorometano
1TR 67	Actinobactéria	0,0	0,0
1TR 68	Actinobactéria	10,4	10,4
1TR 70	Actinobactéria	8,8	3,3
4TR 30	Bactéria	0,0	0,0
6TR 2b	Bactéria	19,5	0,0
2TR70	Actinobactéria	8,3	0,0
3TR 67	Actinobactéria	0,0	0,0
3TR 73	Actinobactéria	11,3	0,0
1TS 67	Actinobactéria	6,7	17,1
1BR 11	Bactéria	0,0	0,0
2BR 65	Actinobactéria	7,9	0,0
2BS 1	Actinobactéria	0,0	0,0
2 BS 2 a	Actinobactéria	0,0	0,0
2AR 10	Bactéria	4,6	0,0
3AS 4	Actinobactéria	13,8	13,8
1AS 60	Bactéria	28,3	0,0
1AS 61	Bactéria	0,0	0,0

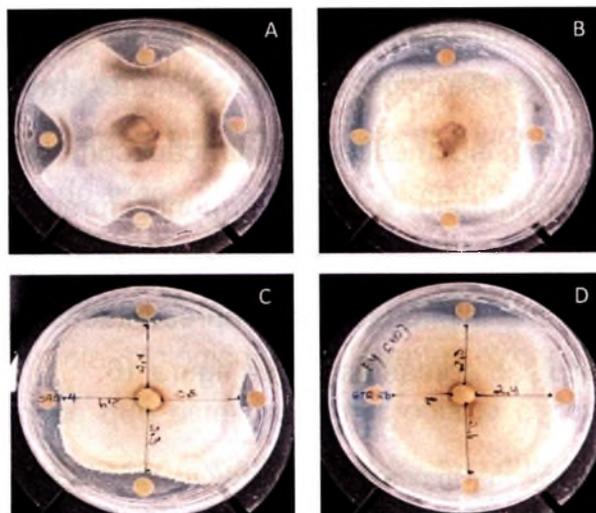


Figura 16 - Avaliação de atividade antifúngica dos extratos brutos obtidos de diferentes isolados diante do fungo fitopatogênico *Pyricularia grisea* (PY5003), sendo (A) e (B) obtidos após extração com Acetato de Etila, e (C) e (D) obtidos após extração com Diclorometano.

Dos 16 procariotos testados quanto à produção de metabólitos secundários com potencial para inibição do fungo *P. grisea*, apenas 10 (59%) demonstraram potencial para produção de compostos antimicrobianos, porém, foi possível observar diferença na atividade inibitória de acordo com o solvente utilizado. No total 10 extratos obtidos com acetato de etila apresentaram atividade inibitória e apenas 4 extratos continuaram a apresentar atividade após a extração com diclorometano. Esta diferença de atividade pode ser explicada devido à polaridade apresentada por cada solvente, pois a composição química deste influencia o tipo de produto a ser obtido e o rendimento do mesmo, devido à afinidade entre as moléculas do extrato e o solvente. Ou seja, cada extrato tende a apresentar maior afinidade com determinado solvente (MACIEL et al., 2002).

Nos estudos de Awla, et al., (2016), ao trabalhar com *Streptomyces sp.* diante do fitopógeno *Pyricularia oryzae* causador da brusone em arroz, observou que uma maior atividade inibitória dos extratos realizados com o solvente acetato de etila, entretanto, o meio no qual estava inserido a linhagem bacteriana era diferente do utilizado no presente estudo.

O conhecimento do perfil químico apresentado por cada amostra a ser trabalhada se faz necessário visando a obtenção de melhores resultados e otimização de processos produtivos. No estudo em questão, a utilização de variados meios de

cultivo poderia ter gerado resultados mais expressivos quanto à inibição de tal patógeno.

As actinobactérias apresentaram-se como as mais promissoras quanto à produção de moléculas antimicrobianas, pois 9 extratos com acetato de etila e 4 extratos com diclorometano foram oriundos de actinobactérias e apresentaram potencial inibitório da linhagem fitopatogênica. De acordo com Soares et al., (2012), estes organismos possuem ampla capacidade metabólica, sendo considerados fontes incomparáveis na busca por novos produtos naturais.

A pequena quantidade de isolados que demonstrou potencial para a produção de moléculas antimicrobianas pode ser devido aos diferentes mecanismos que podem estar envolvidos na inibição de determinado patógeno. O controle biológico pode ser exercido devido à antibiose, que pode ocorrer por competição, parasitismo, predação (WHIPPS, 2001), além da produção de metabólitos secundários (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000). Além disso, determinados micro-organismos podem atuar como indutores de resistência em plantas, por meio da ativação de respostas específicas para defesa contra determinado patógeno (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Nenhum extrato apresentou porcentagens de inibição maiores do que 50%. De acordo com Sardi et al. (1992) a composição do meio de cultura no qual o micro-organismo está inserido tem total relação com a produção de antibióticos, pois a constituição nutricional do meio pode não estimular a biossíntese de determinados antibióticos. De acordo com Reddy et al., (2011), o excesso nutricional no metabolismo celular, principalmente de actinobactérias otimiza a produção de massa celular ao invés da produção de metabólitos secundários. Desta forma, o uso de polissacarídeos ou oligossacarídeos tem se revelado com uma das melhores fontes de carbono, visando à produção de compostos bioativos (HUCK et al., 1991), apresentando resultados mais promissores do que com o uso da glicose. Estes fatores podem ter influenciado a obtenção de moléculas com potencial inibitório e o uso de diferentes fontes de carbono tendem a gerar resultados mais expressivos. Novos ensaios utilizando outras fontes nutritivas para o crescimento das linhagens bacterianas podem ser utilizados a fim de se obter porcentagens inibitórias mais expressivas, pois a não atividade de algumas linhagens observadas no presente trabalho, não indica que estas não sejam capazes de produzir tais compostos antimicrobianos.

Desta forma, a produção de metabólitos é apenas um dos possíveis mecanismos envolvidos na inibição de um patógeno e os demais procariotos podem apresentar outros mecanismos de inibição destes fungos, porém estudos mais detalhados se fazem necessários para a confirmação de tais mecanismos.

4.1.4. Identificação das linhagens selecionadas

As 16 linhagens que apresentaram potencial inibitório dos fitopatógenos de trigo testados foram identificadas através da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA com o banco de dados *NCBI*, tornando possível o agrupamento dos isolados em 2 filos taxonômicos (Actinobacteria e Firmicutes) (Tabela 7).

Tabela 7 - Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de linhagens bacterianas selecionadas de acordo com potencial antagonístico de linhagens obtidas da rizosfera (R) e solo (S) de cultivo de trigo de diferentes pontos de amostragem.

Linhagem	Família	Espécie mais próxima	Índice similaridade	nucleotídeos diferentes/total
1TR67	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces caniferus</i>	99,80%	2/1226
1TR70	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces lydicus</i>	99,54%	6/1315
2TR70	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces caniferus</i>	99,71%	4/1358
3TR67	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	99,64%	4/1111
3TR73	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces arenae</i>	100%	0/1359
1TS67	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces virginiae</i>	99,90%	1/1334
2BR65	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces caniferus</i>	99,80%	2/1342
2BS2a	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces phaeopurpureus</i>	99,90%	1/1263
2BS1	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces phaeopurpureus</i>	99,10%	13/1474
3AS4	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	99,20%	10/1392
4TR30	Bacillaceae	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99,58%	2/1376
6TR2b	Bacillaceae	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99,92%	1/1360
1BR11	Bacillaceae	<i>Bacillus safensis</i>	100%	0/1344
2AR10	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus peoriae</i>	99,34%	9/1372
1AS60	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus jamilae</i>	99,23%	11/1432
1AS61	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus elgii</i>	99,93%	1/1444

Dentre as linhagens selecionadas, 63% pertence à família Streptomycetaceae e mais especificamente ao gênero *Streptomyces*. De acordo com Javaid e Sultan (2013), bactérias pertencentes a este gênero correspondem a 20% dos organismos que colonizam o solo; sendo frequentemente isolados dos mais diferentes ambientes.

Como previamente mencionado, vários produtos naturais são sintetizados a partir de actinobactérias, devido à rica produção de metabólitos secundários apresentado por estes micro-organismos quando inseridos nos mais variados substratos (RANA; SALAM; 2014). Seus metabólitos podem apresentar diferentes aplicações biotecnológicas e atualmente são descritos como principais produtores de antibióticos (MACAGNAM et al., 2006).

Membros do gênero *Streptomyces* têm demonstrado amplo espectro de ação no biocontrole de diferentes fitopatógenos (WANG et al., 2013; QUECINE et al., 2008; ZHAO et al., 2012; FANG et al., 2011). Desta forma, o presente estudo indica o potencial inibitório que espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentam diante da inibição do crescimento dos fungos causadores da brusone e da giberela em trigo, podendo auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias de controle biológico.

As demais linhagens selecionadas pertencem ao filo Firmicutes, sendo representado por 37%, porém dividido em duas famílias: Bacillaceae e Paenibacillaceae. A família Bacillaceae apresentou organismos pertencentes a dois gêneros, *Brevibacillus* e *Bacillus*. Ambos são procariontes que têm como habitat natural o solo (LANNA FILHO et al., 2010), porém são formadores de endósporos que lhes permite sobreviver em vários ambientes (SHIDA et al., 1996). Têm sido descritos com potencial desnitrificante, biodegradador e agentes de biocontrole de diferentes patógenos de plantas (BAEK et al., 2006; JOSHI et al., 2013; HAMMAMI et al., 2009). O presente estudo corrobora com os resultados anteriormente obtidos (Boffoni et al., (2015); Zhang et al., (2005)) para o controle da giberela. Espécies de *Bacillus* estudadas por Boffoni et al., (2015) apresentaram inibição do fungo *Fusarium graminearum* quando em associação com *Lactobacillus plantarum*. Zhang et al., (2005) ao trabalhar com *Brevibacillus* spp. observaram o potencial antagônico frente ao fitopatógeno causador da giberela em espigas de cevada. A família Paenibacillaceae, por sua vez, apresentou linhagens pertencentes ao gênero *Paenibacillus* que é encontrado em diferentes habitats. São descritos como produtores de diferentes antibióticos, sendo de grande importância para a agricultura sustentável e aplicação em diferentes processos industriais (SENEVIRATNE et al., 2010). Apresenta potencial inibitório de diferentes fungos fitopatogênicos, inclusive fungos do gênero *Fusarium* (AKTUGANOV et al., 2008; WEID et al., 2005, XU et al., 2014). Vale ressaltar que a brusone é considerada uma doença relativamente nova, desta forma não foram encontrados na literatura estudos sobre o potencial de controle de bactérias diante do fungo *P. grisea* em trigo, dificultando a realização de comparações.

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA resultou em um fragmento que apresentava em média 1300 pb por linhagem selecionada e proporcionou a construção de quatro árvores filogenéticas, sendo três com representantes do filo

Actinobacteria (Figuras 7, 8 e 9) que foram divididas para melhor observação dos resultados, porém, todas as árvores filogenéticas pertencentes a este filo apresentaram como grupo externo a espécie *Streptacidiphilus albus*. A quarta árvore filogenética foi composta por procariontes pertencentes ao filo Firmicutes, sendo a espécie *Clostridium clariflavum* utilizada como grupo externo (Figura 17).

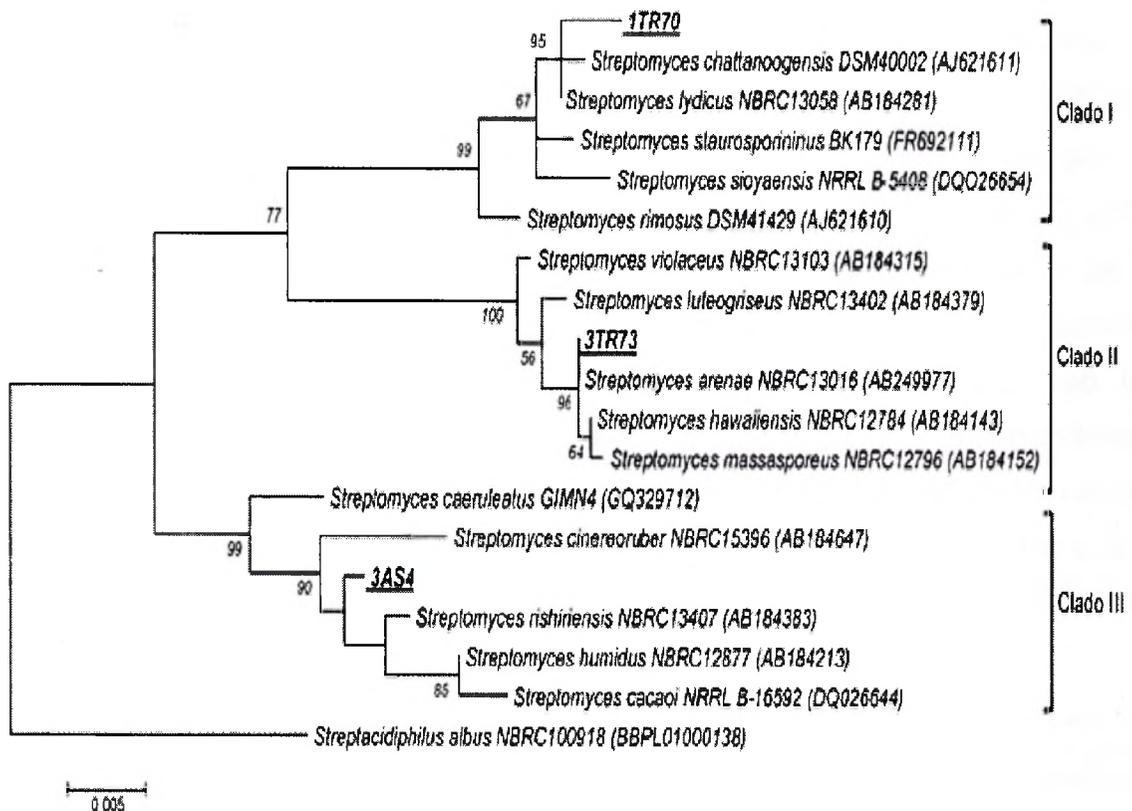


Figura 17 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA obtida para o Filo Actinobacteria dos isolados com potencial antagonístico aos fungos causadores da brusone e giberela em trigo. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, árvore consenso de *bootstrap* utilizando 1000 replicações pelo método Tamura-Nei.

Análises filogenéticas para o filo Actinobactéria revelaram que uma linhagem identificada inicialmente como 1TR70 foi inserida no clado I, suportado por um valor de *bootstrap* 99%, com similaridade de 99,5% à linhagem *S.lydicus* apresentando 6 nucleotídeos de diferença em um total de 1315 pb. Esta linhagem é descrita como uma forte antagonista a diferentes fungos fitopatogênicos (YUAN; CRAWFORD, 1995), assim como observado no presente estudo.

O clado II foi formado pelo isolado 3TR73 suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, com similaridade de 100% com a linhagem tipo *S. arenae* não apresentando nenhum nucleotídeo diferente para um total de 1359 pb.

O clado III demonstrou um *bootstrap* de 99% e foi composto pela linhagem 3AS4 com similaridade com as espécies *S. rishiriensis*, *S. cinereoruber*, *S. caeruleatus*, *S. humidus* e *S. cacaoi*, entretanto, apresentou de 10 a 18 nt diferentes, para um total de 1402 pb. A similaridade entre a linhagem e as linhagens tipo apresentaram variação de 99,9% a 98,7%. Estudos mais aprofundados com esta linhagem indicariam percentuais de similaridade mais conclusivos. Além disso, análises polifásicas podem ser necessárias para determinar se a linhagem em questão se trata de uma nova espécie de *Streptomyces*.

A análise filogenética dos isolados identificados como 3TR67, 2TR70, 1TR67 e 2BR65 permitiu seu agrupamento no clado I, suportado por um valor de *bootstrap* de 86. As linhagens 1TR67 e 2BR65 demonstraram similaridade com a linhagem *S. caniferus* ambas com similaridade de 99,8%, e com 2 nucleotídeos diferentes num total de 1226 pb, e 2 nucleotídeos distintos em comparação com 1342 pb, respectivamente. A linhagem 3TR67 apresentou similaridade com a espécie tipo *S. hygrosopicus* com percentual de 99,6% e 4 nucleotídeos díspares com base em 1111 pb. E a linhagem 2TR70 apresentou 4 nucleotídeos diferentes quando comparado com 1358 pb, podendo ser a espécie *S. caniferus* (Figura 18).

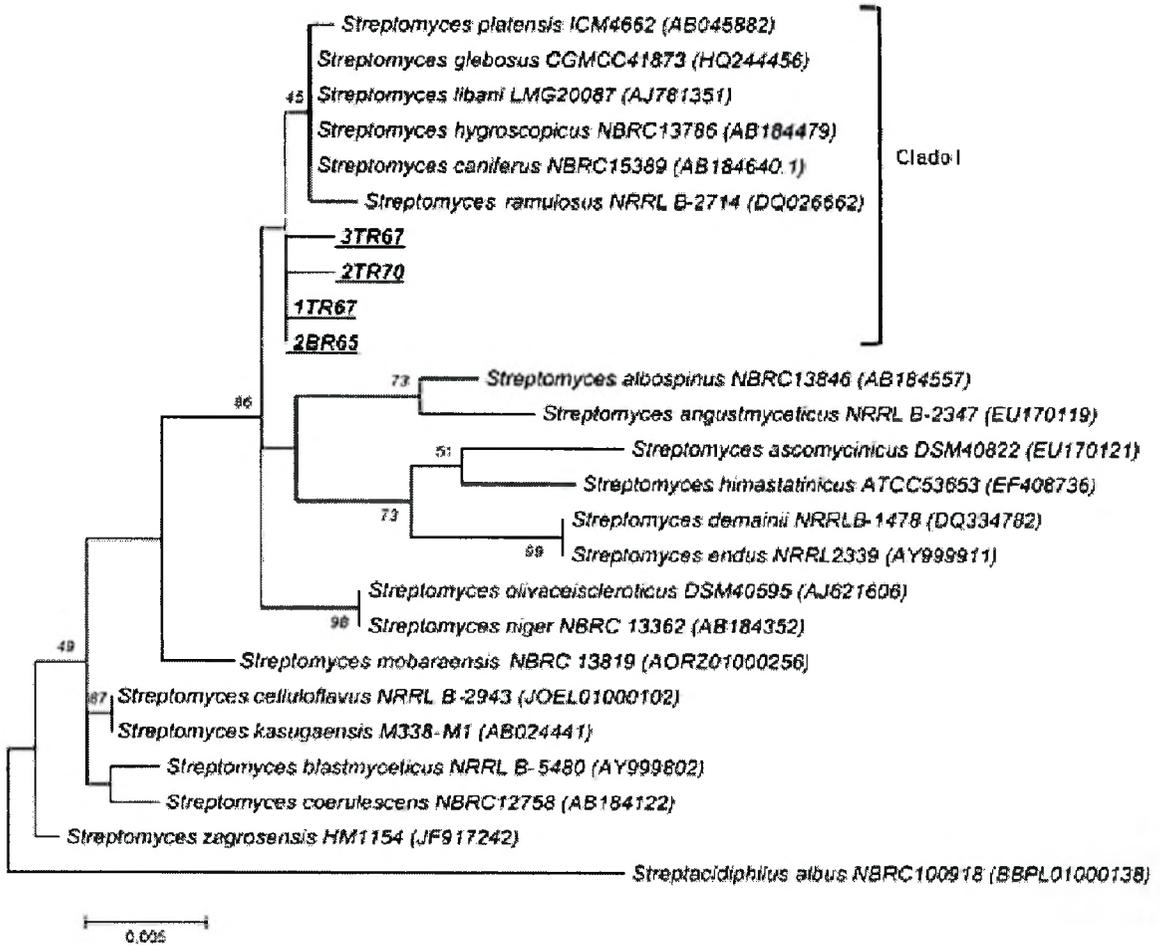


Figura 18 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA obtida para o Filo Actinobacteria dos isolados com potencial antagonístico aos fungos causadores da brusone e giberela em trigo. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, árvore consenso de bootstrap utilizando 1000 reamostragens pelo método Tamura Nei.

Estudos mais aprofundados entre estas linhagens obtidas a partir da rizosfera de plantas de trigo poderiam indicar possíveis similaridades entre os isolados, desta forma o uso de diferentes ferramentas moleculares, assim como a utilização de diversos programas de alinhamento de sequências poderiam comprovar a real proximidade entre tais procaríotos.

A análise dos demais isolados pertencentes ao filo Actinobacteria, permitiu a construção de uma árvore filogenética com 2 clados distintos. O clado I apresentou as linhagens 2BS1 e 2BS2a, ambas com similaridade à espécie *S. phaeopurpureus*, suportado por um valor de 100% (Figura 19). Os isolados demonstraram 99,9% e 99,1% de similaridade com a espécie tipo, e respectivamente 1 nucleotídeo diferente em comparação com 1263 pb, e 13 nucleotídeos distintos para um total de 1474 pb.

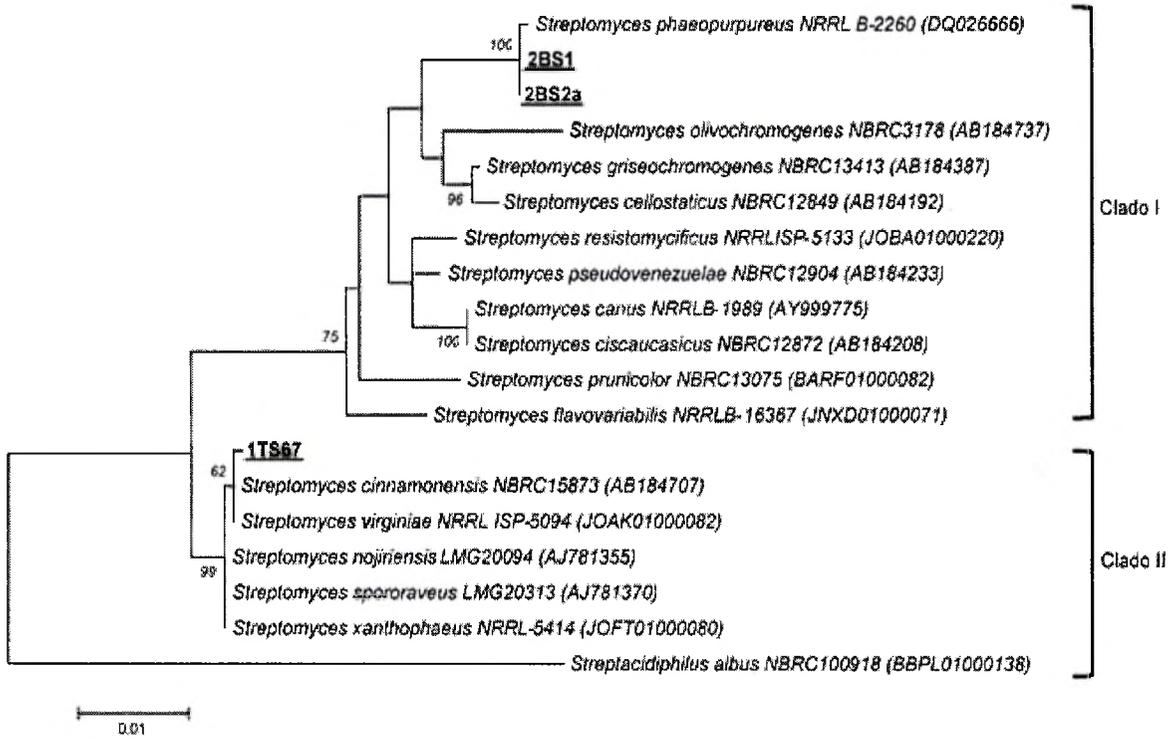


Figura 19 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA obtida para o Filo Actinobacteria dos isolados com potencial antagônico aos fungos causadores da brusone e giberela em trigo. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, árvore consenso de bootstrap utilizando 1000 replicações pelo método Tamura-Nei.

O clado II foi suportado por um *bootstrap* de 99, composto pela linhagem 1TS67 que apresentou similaridade de 99,9% com a espécie *S. virginiae*, e apenas 1 nucleotídeo diferente quando comparado com 1334 pb.

O gênero *Streptomyces* é descrito como o que apresenta a maior quantidade de linhagens dentre todos os gêneros pertencentes ao filo Actinobacteria, desta forma apenas a identificação taxonômica pode não ser suficiente para a identificação das espécies, devido à grande complexidade deste taxón (ZHAO et al., 2012). Desta forma, a identificação mais precisa pode ser fornecida pela caracterização morfológica, química e fisiológica (PRAUSER et al., 1997). O uso destas técnicas em conjunto favorece a melhor classificação das estirpes, e de tempos em tempos novas espécies são descobertas dos mais variados biomas (SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2016)

Desta forma, os isolados que não formaram uma relação concisa com nenhuma espécie necessitam de estudos complementares; e mesmo as linhagens que apresentaram similaridade com determinadas espécies, é possível apenas afirmar

uma maior proximidade com espécies já descritas e análises mais detalhadas também se fazem necessárias para uma definição confiável.

Análises filogenéticas de seis linhagens indicaram que tais organismos são pertencentes ao filo Firmicutes, conforme apresentado na figura 20.

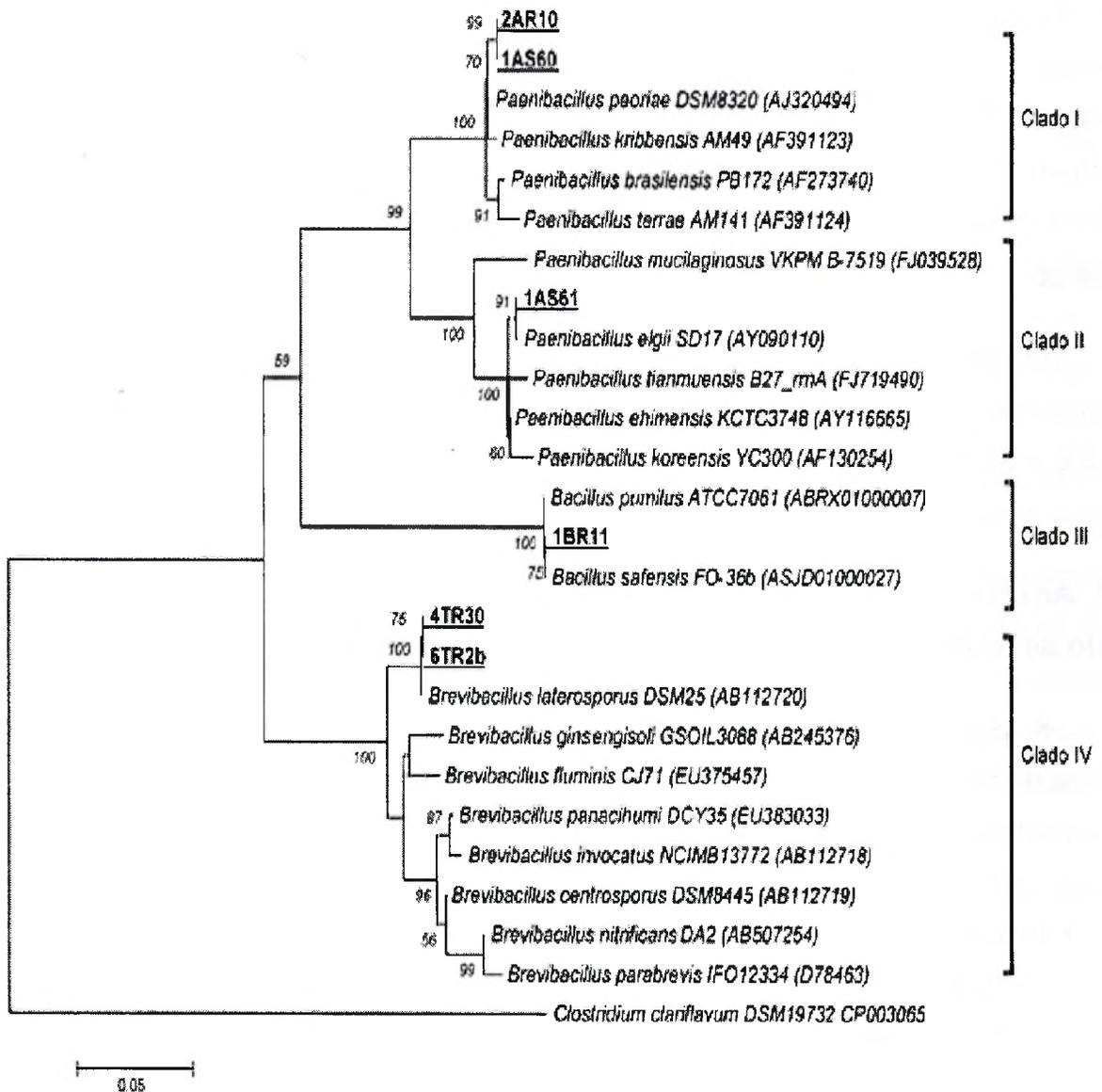


Figura 20 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA obtida para o Filo Firmicutes dos isolados com potencial antagônico aos fungos causadores da brusone e giberela em trigo. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, árvore consenso de bootstrap utilizando 1000 replicações pelo método Tamura Nei.

A análise proporcionou a formação de quatro clados, sendo o primeiro composto pelos isolados identificados como 2AR10 e 1AS60, com *bootstrap* de 100%. A linhagem 2AR10 apresentou 99,3% de similaridade com a espécie tipo *Paenibacillus peoriae*, sendo 9 nucleotídeos distintos quando em comparação aos 1372 pb. O isolado 1AS60 apresentou 11 nucleotídeos diferentes com base em 1432 pb, indicando similaridade com a espécie *Paenibacillus jamilae* com 99,2%.

O clado II apresentou um *bootstrap* de 100%, agrupando a linhagem 1AS61 com a espécie *Paenibacillus elgii* com 99,9% de similaridade e apenas 1 nucleotídeo diferente, para um total de 1444 pb. O clado III (*bootstrap* 100) foi composto pela linhagem 1BR11 com similaridade à espécie *Bacillus safensis* (100% similaridade) e nenhum nucleotídeo diferente quando comparado com 1344 pb e *Bacillus pumilus* (99,7% similaridade), apresentando 3 nucleotídeos diferentes quando comparado com 1344 pb.

O clado IV agrupou as linhagens 4TR30 e 6TR2b (*bootstrap* 100) em que ambas apresentaram similaridade com a espécie *Brevibacillus laterosporus*, com 99,5% e 99,9% de similaridade, baseado em 1376 pb com 2 nucleotídeos diferentes para o isolado 4TR30 e com 1 nucleotídeo divergente de 1360 nucleotídeos totais.

4.2. Análise da estrutura e composição de bactérias associadas ao trigo por meio de técnicas independentes de cultivo

A estrutura e a composição da comunidade bacteriana da rizosfera e solo de cultivo de trigo, oriundos das áreas de Palmital (SP) e Planaltina (DF) foram obtidas por meio do sequenciamento de amplicons 16S rRNA. Com relação à estrutura, a análise de PCoA (Análise de coordenadas principais) demonstrou uma variação total de 24,50% no eixo 1 e 13,91% no eixo 2 para as amostras provenientes de Palmital (Figura 21). É possível observar que ocorreu uma divisão principalmente entre a primeira e a segunda coleta, indicando uma sutil variação da comunidade de acordo com o estágio de desenvolvimento do trigo.

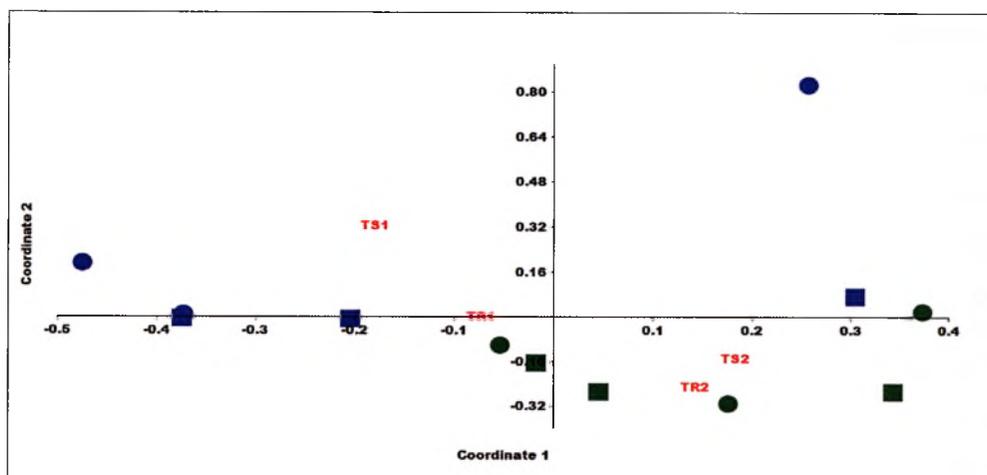


Figura 21 - Análise das Coordenadas Principais (PCoA) da diversidade bacteriana presente na rizosfera (TR - quadrado) e solo (TS - círculo) de cultivo de trigo, coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento (1 - azul e 2 - verde) da área localizada em Palmital/SP.

O teste de SIMPER é um teste estatístico que avalia a diferença entre os grupos analisados, expressando os resultados em valores percentuais de dissimilaridade, onde quanto maior esses valores mais diferentes são as amostras avaliadas, indicando desta maneira a dissimilaridade. Portanto, de modo geral, as amostras de Palmital diferiram em 45,44%. A diferença observada no gráfico pode ser confirmada pelo teste de SIMPER (Tabela 8), onde ao comparar amostras de solo da coleta 1 (TS1) e coleta 2 (TS2), a porcentagem de dissimilaridade é de 48,56%, sendo a maior porcentagem observada. Quando comparada a amostra da rizosfera da segunda coleta (TR2) com a amostra de solo da coleta 1 (TS1), estas apresentaram 48,43% de dissimilaridade; amostras da rizosfera e do solo da primeira coleta indicaram uma dissimilaridade de 45,96%. A menor dissimilaridade foi observada quando comparadas as amostras da rizosfera e solo da coleta 2, com dissimilaridade de 40,62%.

Tabela 8 - Índices de dissimilaridade das estruturas bacterianas do solo (TS) e rizosfera (TR) de trigo de diferentes pontos de amostragem (1 e 2), provenientes de Palmital/SP.

Amostras	Dissimilaridade (%)
TS1 x TS2	48,46%
TR2 x TS1	48,43%
TR1 x TS1	45,96%
TR1 x TS2	44,72%
TR1 x TR2	44,44%
TR2 x TS2	40,62%

Analisando-se um pouco mais afundo, por exemplo, a OTU 155460, classificada como pertencente à ordem RB41 pertencente à classe Chioracidobacteria, filo Acidobacteria, foi o principal grupo responsável pela dissimilaridade observada para as amostras de solo e rizosfera oriundos da cidade de Palmital/SP. Este contribuiu com 1,17% para a divergência entre os grupos analisados (tabela 9). Por sua vez, a OTU 95355, classificada como pertencente ao filo Actinobacteria, mais especificamente pela família Propionibacteriaceae foi a segunda responsável pela divergência entre as amostras, contribuindo com 1,054% da dissimilaridade, seguida por um representante do filo Acidobacteria, ordem III1-15 e pelo filo Bacteroidetes, gênero Flavobacterium. Estas dezoito OTUs foram responsáveis por mais de 10% da diferença total observada para as amostras analisadas e destas, a maior porcentagem é pertencente ao filo Acidobacteria, seguida do filo Actinobacteria.

Tabela 9 - Principais grupos bacterianos responsáveis pela dissimilaridade observada após análise de SIMPER para as amostras de Palmital/SP.

	Contribuição (%)	Contribuição acumulada (%)	Classificação
OTU 155460	1,17%	1,17%	Filo Acidobacteria; classe Chioracidobacteria; ordem RB41
OTU 95355	1,054%	2,224%	Filo Actinobacteria; família Propionibacteriaceae
OTU 153595	1,05%	3,274%	Filo Acidobacteria; classe Acidobacteria; ordem iii1-15
OTU 800664	0,927%	4,201%	Filo Bacteroidetes; gênero Flavobacterium
OTU 84712	0,7934%	4,995%	Filo Cyanobacteria; gênero <i>Phormidium</i>
OTU 157758	0,5528%	5,548%	Filo Acidobacteria; classe Acidobacteria
OTU 49755	0,5467%	6,094%	Filo Proteobacteria; família Moraxellaceae
OTU 11735	0,4855%	6,58%	Filo Fibrobacteres; ordem 258ds
OTU 16858	0,4751%	7,055%	Filo Actinobacteria; família Solirubrobacteraceae
OTU 60438	0,4396%	7,494%	Filo Acidobacteria; ordem RB41
OTU 7489	0,4382%	7,933%	Filo Chloroflexi; ordem envOPS12
OTU 148849	0,3953%	8,328%	Filo Chioroflexi; ordem envOPS12
OTU 26193	0,3402%	8,668%	Filo Actinobacteria; família Intrasporangliaceae
OTU 70029	0,3208%	8,989%	Filo Proteobacteria; gênero <i>Kaistobacter</i>
OTU 18641	0,3065%	9,295%	Filo Acidobacteria; classe Acidobacteria
OTU 143302	0,3007%	9,596%	Filo Actinobacteria; família Solirubrobacteraceae
OTU 65360	0,2982%	9,894%	Filo Nitrospirae; gênero <i>Nitrospira</i>
OTU 30128	0,2703%	10,16%	Filo Acidobacteria; ordem iii1-15

Para a área de Planaltina, a análise de PCoA (Análise de coordenadas principais) indicou a formação de dois grupos distintos para as amostras obtidas para a rizosfera, com uma variação de 27,64% no eixo 1 e 18,25% no eixo 2 (Figura 22).

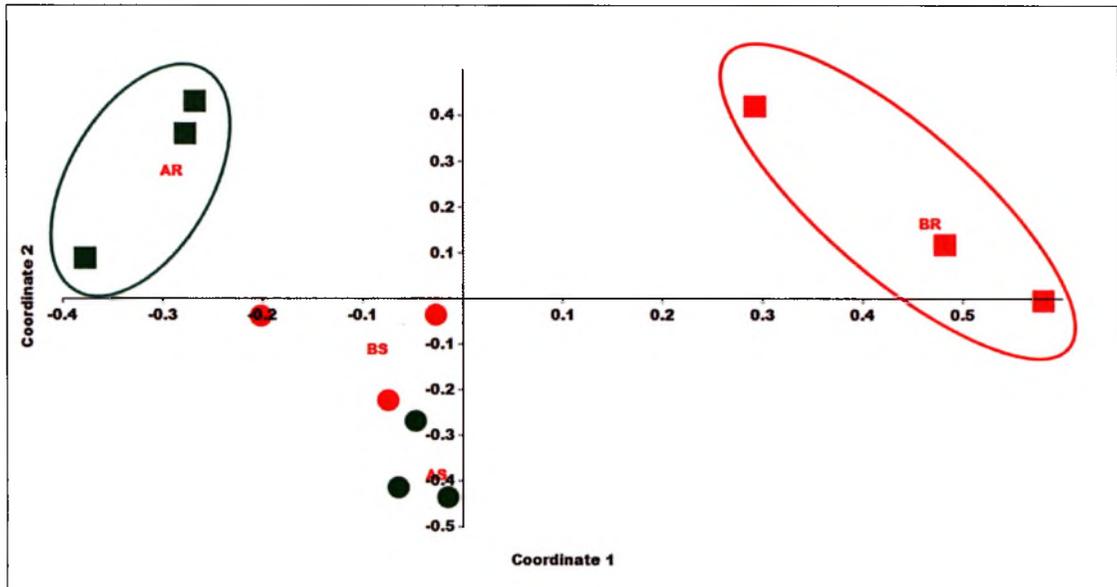


Figura 22 - Análise das Coordenadas Principais (PCoA) da diversidade bacteriana presente na rizosfera (AR e BR - quadrado) e solo (AS e BS - círculo) de cultivo de trigo, coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento (A - verde e B - vermelho) da área localizada em Planaltina/DF.

É possível perceber a formação de dois grupos distintos entre as amostras da rizosfera do primeiro estágio (A) e do segundo estágio (B), assim como observado para a área de Palmital, entretanto com maior porcentagem de dissimilaridade e maior agrupamento de suas amostras. Já as amostras de solo se apresentaram mais similares entre si, formando um agrupamento mais coeso, sendo menor a influência da época de coleta.

De modo geral, as amostras de Brasília diferiram em 56,26% e o teste de SIMPER confirmou a diferença observada no gráfico anterior, onde as amostras da rizosfera da coleta 1 (AR) e 2 (BR) apresentaram a maior divergência entre os grupos bacterianos analisados, com 66,12% de dissimilaridade (tabela 10). A comparação entre a rizosfera da coleta 2 (BR) e o solo da coleta 1 (AS), contribuíram com 59,93% de dissimilaridade, seguidos por 59,35% para as amostras da segunda coleta do solo (BS) e rizosfera (BR). A menor dissimilaridade observada foi indicada para as amostras do solo da segunda (BS) e da primeira coleta (AS) com 46,20%, corroborando com o fato observado na PCoA.

Tabela 10 - Índices de dissimilaridade das estruturas bacterianas do solo (AS e BS) e rizosfera (AR e BR) de trigo de diferentes pontos de amostragem (1 e 2), provenientes de Planaltina/DF.

Amostras	Dissimilaridade (%)
BR x AR	66,12%
BR x AS	59,93%
BS x BR	59,35%
AS x AR	54,86%
BS x AR	51,13%
BS x AS	46,20%

Como nesta área foi observado a formação de dois grupos bem definidos, na tabela 11 são apresentados quinze grupos que contribuíram com mais de 10% da dissimilaridade para as comunidades analisadas. Destas, a maior porcentagem foi classificada como pertencente ao filo Actinobacteria, seguida do filo Proteobacteria. Além disso, a OTU 49149, classificada como pertencente à família Geodermatophilaceae foi o grupo que mais contribuiu com a dissimilaridade observada para a área de Planaltina/DF, indicando uma contribuição de 1,46%. A segunda OTU que mais contribuiu com a dissimilaridade observada entre as amostras, foi *Bacillus flexus* que apresentou 1,154%, e assim por diante.

Tabela 11 - Principais grupos bacterianos responsáveis pela dissimilaridade observada após análise de SIMPER para as amostras de Planaltina/DF

	Contribuição (%)	Contribuição acumulada (%)	Classificação
OTU 49149	1,46%	1,46%	Filo Actinobacteria; família Geodermatophilaceae
OTU 18065	1,154%	2,614%	Filo Firmicutes; espécie <i>Bacillus flexus</i>
OTU 11162	0,9842%	3,5982%	Filo Actinobacteria; família Conexibacteraceae
OTU 421	0,8142%	4,4124%	Filo Actinobacteria; família Streptomycetaceae
OTU 33143	0,5966%	5,0009%	Filo Actinobacteria; gênero Geodermatophilus
OTU 628	0,5688%	5,5778%	Filo Cyanobacteria; família Nostocaceae
OTU15248	0,5557%	6,1335%	Filo Proteobacteria; famí (Continua...)
OTU 58	0,5513%	6,6848%	Filo Actinobacteria; família Galeellaceae
OTU 25818	0,5472%	7,232%	Filo Proteobacteria; família Rhodocyclaceae
OTU 46619	0,5389%	7,7709%	Filo Cyanobacteria; ordem Stramenopiles
OTU 44899	0,5174%	8,2883%	Filo Proteobacteria; gênero <i>Ralstonia</i>
OTU 729	0,4512%	8,7395%	Filo Proteobacteria; família Oxalobacteraceae
OTU 24811	0,4428%	9,1823%	Filo Actinobacteria; família Solirubrobacteraceae
OTU 4780	0,4356%	9,6179%	Filo Firmicutes; gênero <i>Bacillus</i>
OTU 42474	0,4303%	10,0482%	Filo Proteobacteria; família Comamonadaceae

Com relação ao índice PD que calcula a diversidade filogenética obtida para as amostras, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) para a área de Palmital-SP. Sendo que a maior diversidade filogenética foi apresentada pela amostra do solo da segunda coleta (TS2). A mesma tendência foi observada para o índice de CHAO 1 (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias do índice PD, CHAO1 e OTUs observadas para as amostras Palmital-SP, de solo (S) e rizosfera (R) de trigo obtido em duas coletas distintas: primeira coleta (1), segunda coleta (2). Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%.

Amostras	Média do índice PD	Média do índice CHAO1	Média OTUs observadas
TR1	486,67 c	11947,62 c	4439,17 c
TR2	496,11 b	12488,84 b	4577,83 b
TS1	484,41 c	11364,82 d	4404,57 d
TS2	509,62 a	12893,75 a	4729,13 a

Para área de Planaltina-DF a diversidade filogenética obtida através do índice de PD, não apresentou diferença significativa entre as amostras da rizosfera da primeira (AR) e segunda coleta (BR), porém, o solo apresentou diferença significativa de acordo com o momento da coleta (AS x BS). A maior diversidade foi observada na rizosfera de ambos os períodos de amostragem, e a menor diversidade foi indicada pelo solo da primeira coleta (AS). Estes dados divergem dos observados para o índice de CHAO, indicando que a riqueza foi maior no solo (AS e BS) do que na rizosfera (AR e BR) (Tabela 13).

Tabela 13 - Médias do índice PD, CHAO1 e OTUs observadas, obtida para as amostras de Planaltina – DF, do solo (S) e rizosfera (R) de trigo obtido em duas coletas distintas: primeira coleta (A), segunda coleta (B). Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%.

Amostras	Média do índice PD	Média do índice CHAO1	Média OTUs observadas
AR	278,57940 a	5941,37 b	2387,167 c
AS	265,6277 c	6203,876 a	2337,867 d
BR	279,768 a	5910,718 b	2495,167 a
BS	272,60840 b	6164,177 a	2458,467 a

Com relação à composição, as sequências do domínio Bactéria da área de Palmital foram classificadas em quarenta e sete filos, sendo que treze filos

apresentaram frequência relativa maior que 1% para a maioria das amostras, sendo eles: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Fibrobacteres, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, TM7 e Verrucomicrobia (Figura 23A).

Para a área de Planaltina, as amostras foram classificadas em 41 filios, sendo que onze filios apresentaram frequência relativa maior que 1% para os mesmos grupos observados na área de Palmital, exceto para Fibrobacteres, Planctomycetes e TM7, além disso, apresentou o filo AD3 que não foi observado na área de Palmital (Figura 23B). Embora os grupos dominantes sejam os mesmos, as amostras apresentaram variação quanto às porcentagens de frequência relativa.

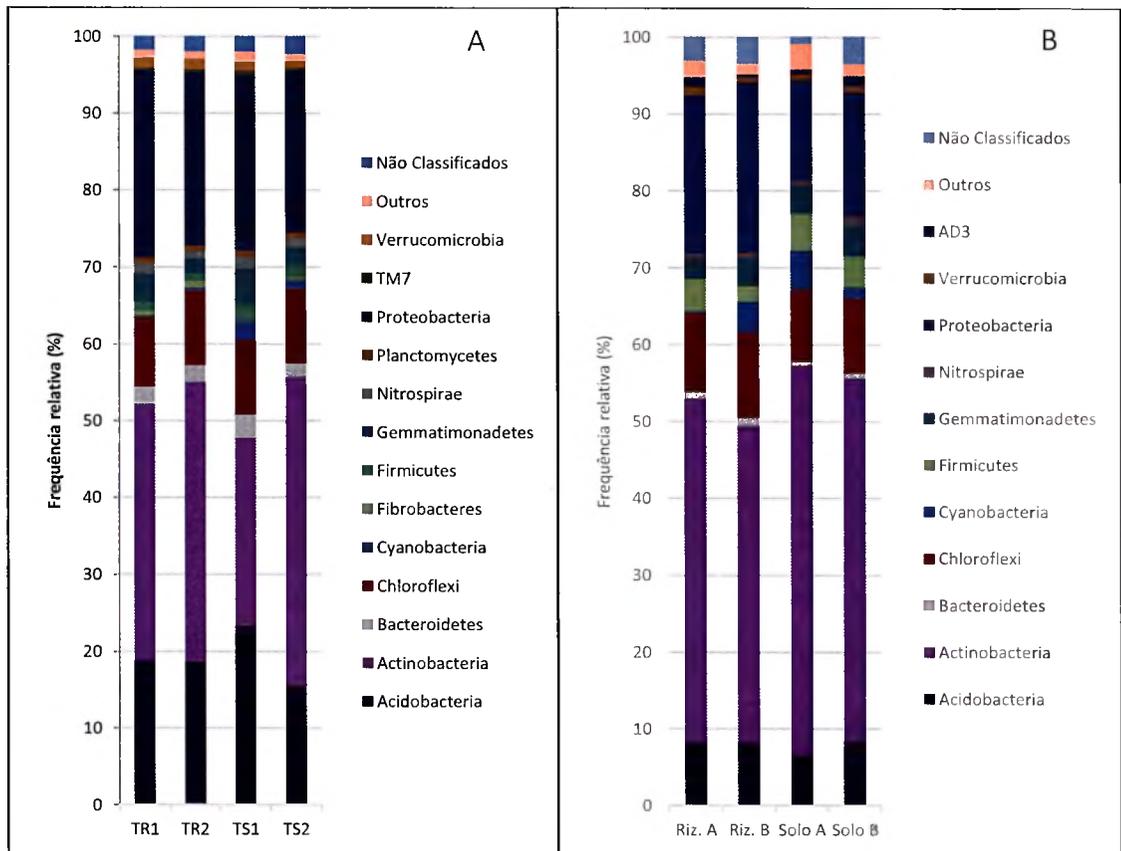


Figura 23 - Filios bacterianos com frequência relativa (%) maior que 1% para as médias (n=3) para a coleta realizada em diferentes estádios vegetativos (1 e 2) em Palmital (SP) provenientes da rizosfera de trigo (TR) e solo de cultivo (TS) (A) e coleta realizada em Planaltina (DF) em diferentes estádios vegetativos (1 e 2), oriundas da rizosfera (Riz.) e solo de áreas de cultivo de trigo (B).

Ambas as áreas apresentaram o filo Actinobacteria como o mais abundante, tanto para solo quanto para rizosfera, este grupo é frequentemente associado com gramíneas (DUNBAR et al., 2002) podendo apresentar diferentes gêneros

(STACKEBRANDT et al., 1977). O filo Proteobacteria foi o segundo grupo mais abundante para os dois locais de amostragem, este filo desempenha papel ativo no ciclo do nitrogênio (PURKHOLD et al., 2003), sendo seus representantes encontrados em solos de cultivo de regiões tropicais (NÜSSLEIN; TIEDJE, 1999), além de solos contendo metais pesados e de pH elevado e até em ambientes marinhos (NOLD et al., 2000; SANDAA et al., 2001; VAL-MORAES, 2008). Desta forma, o filo Proteobacteria desempenha um importante papel em solos cultivados e nos mais diversos ambientes.

O filo Actinobacteria se apresentou mais abundante em Planaltina tanto para o solo quanto para a rizosfera, quando em comparação com os percentuais observados para Palmital. De acordo com Yan et al., (2016), a comunidade microbiana associada com a planta tende a ser selecionada de acordo com a necessidade apresentada pelo vegetal, podendo variar de variedade para variedade e pelas características apresentadas pelo solo de cada região.

Para a área de Palmital o terceiro filo mais abundante foi Acidobacteria, sendo encontrado na rizosfera e no solo. Entretanto, o solo 1 (TS1) demonstrou o maior percentual com 23,3%, seguido por 15,8% para o solo 2 (TS2), enquanto que para a rizosfera (TR1 e TR2) os valores foram respectivamente de 18,8% e 18,6%. Este filo é descrito por conter representantes com capacidade de decomposição, formação de biofilme, participação no ciclo do nitrogênio e na produção de novos compostos antimicrobianos, contribuindo de forma ativa com a estrutura do solo (WARD et al., 2009; CHALLACOMBE et al., 2011). Tais características favorecem o desenvolvimento deste filo em maior quantidade no solo do que na rizosfera (ROCHA et al., 2013). Entretanto, membros deste filo apresentam dificuldades para o cultivo através das técnicas tradicionais, devido às limitações impostas pelas necessidades nutricionais e condições de crescimento necessárias. Desta forma, não foi possível a obtenção deste filo através das técnicas de isolamento utilizadas neste estudo.

Smit et al. (2001) estudando grupos microbianos relacionados às condições de fertilidade do solo, observaram que a presença de Proteobacteria e Acidobacteria pode indicar a condição nutricional do solo, pois tais grupos apresentam melhor crescimento em solos com pH elevado (SANDAA et al., 2001), assim como os observados em solos destinados ao cultivo de diferentes culturas. Os altos valores de pH são resultado do processo de calagem, realizado por agricultores para o melhor

desenvolvimento da cultura (NÜSSLEIN; TIEDJE, 1999). Estas características podem explicar os altos percentuais observados neste estudo, pois a área localizada em Palmital é destinada do cultivo anual de trigo e constantemente submetida a técnicas que visam à manutenção do solo, contribuindo assim com a fertilidade do mesmo e melhor estabilidade da comunidade microbiana.

A área de Planaltina apresentou o grupo Chloroflexi como o terceiro filo mais abundante e este foi observado como o quarto filo mais abundante para o solo e rizosfera de Palmital. Este filo constitui a microbiota do solo e exibe uma ampla gama de atividades metabólicas (YAMADA; SEKIGUCHI, 2009), entretanto com poucos relatos na literatura quanto à aplicação deste filo junto a diferentes patógenos. Tais características podem também ser resultado da dificuldade de cultivo apresentada por este grupo. A busca por novos meios de cultivo na tentativa de isolar grupos antes tidos como de difícil culturabilidade tem sido foco em pesquisas (ZENGLER et al., 2002; STENVENSON et al. 2004; PHAM; KIM 2012). O isolamento e a melhor compreensão deste e de outros filios não detectados, podem vir a apresentar resultados promissores quanto à busca de novas moléculas e compostos.

Os demais filios observados para a área localizada em São Paulo e no Distrito Federal apresentaram frequências relativas com valores menores que 5%, além de ambas áreas apresentarem grupos não classificados.

As oscilações observadas para a composição das comunidades bacterianas da rizosfera e do solo de ambas as áreas destinadas ao cultivo de trigo, podem ser resultado de diferentes fatores. De acordo com Prashar et al., (2014), como já mencionado, a rizosfera tende a moldar a comunidade microbiana associada devido à sinalização química proveniente dos exsudatos radiculares, enquanto que no solo a escassez de recursos pode se apresentar como um fator limitante para o desenvolvimento de comunidades microbianas (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012). Porém, o perfil das comunidades de cada local é formado de acordo com características abióticas apresentadas e a capacidade de crescimento do micro-organismo diante destas. Além disso, a variedade da planta também atua como um modulador específico, passando a apresentar comunidades microbianas específicas (INCEOĞLU; SALLES; VAN ELSAS, 2012). Além disso, de acordo com Rachid et al., (2013) o uso de determinadas práticas agrícolas influencia diretamente na abundância dos filios bacterianos associados à rizosfera e ao solo de determinada área.

Até o presente momento, estudos a respeito da interação dos microorganismos com exsudatos radiculares, relatando a diversidade bacteriana de diferentes variedades ou em diferentes estádios vegetativos do trigo são escassos e o uso de tecnologias e metodologias modernas tendem a ajudar na elucidação de uma série de processos e ciclos metabólicos, além de fornecerem informações preciosas sobre a composição da comunidade microbiana (RADAJEWSKI et al., 2000).

A seguir, serão descritos os filos mais representativos para as duas áreas de coleta.

4.2.1. Filo Actinobacteria

O filo Actinobacteria se apresentou como o mais abundante para ambas as áreas de amostragem, indicando a presença de sete classes para a área de Palmital (Figura 24A) e cinco classes para a área de Planaltina (Figura 24B).

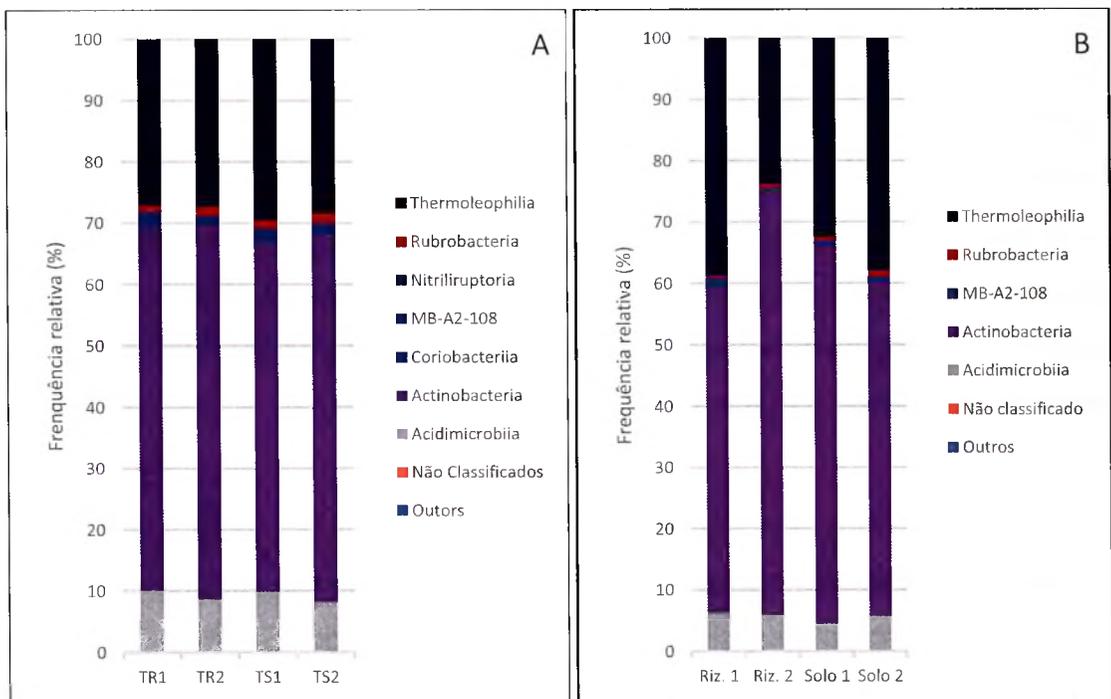


Figura 24 - Frequência relativa maior que 1% das classes pertencentes ao filo Actinobacteria para a coleta realizada em diferentes estádios vegetativos (1 e 2) em Palmital (SP) provenientes da rizosfera de trigo (TR) e solo de cultivo (TS) (A) e coleta realizada em Planaltina (DF) em diferentes estádios vegetativos (1 e 2), oriundas da rizosfera (Riz.) e solo de áreas de cultivo de trigo (B).

O solo proveniente de Palmital apresentou uma maior abundância da classe Actinobacteria, tanto para o solo quanto para a rizosfera. Entretanto, a rizosfera apresentou um percentual de 59,1% (TR1) e 60,8% (TR2) diante de 56,6% (TS1) e 59,9% (TS2), indicando uma maior colonização desta classe de micro-organismos na região das raízes, porém de forma sutil. As actinobactérias podem ser encontradas nos mais variados ambientes distribuídos na natureza, pois podem desenvolver-se nos mais variados substratos, porém o solo e a rizosfera são os habitats que apresentam a maior abundância destes micro-organismos (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983), assim como observado para as áreas de cultivo de trigo. As populações de actinobactérias são importantes componentes da comunidade rizosférica microbiana e tais organismos apresentam características favoráveis como promotores de crescimento vegetal e têm mostrado enorme potencial como agentes de biocontrole contra diferentes patógenos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Esta classe é uma das mais estudadas, apresentando mais de 80% de todas as famílias e gêneros de actinobactérias descritos até então (GAO e GUPTA, 2012). A Família Streptomycetaceae, que inclui actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*, foram os principais micro-organismos obtidos através de técnicas dependentes de cultivo no estudo em questão. Este gênero apresenta grande capacidade de interagir com plantas superiores (PEREIRA et al., 2000) e até mesmo pela interação benéfica com outras rizobactérias (GREGOR; KLUBEK; VARSA, 2003).

A segunda classe mais abundante foi Thermoleophilia com em média 27,2% de frequência relativa para a rizosfera e 28,9% para o solo. A classe Acidimicrobiia apresentou média igual a 9,4% para a rizosfera e 9% para o solo. As demais classes apresentaram frequência relativa menor que 3%.

4.2.2. Filo Proteobacteria

O filo Proteobacteria foi o segundo mais abundante para todas as amostras analisadas de solo e rizosfera. A área de Palmital e a área de Planaltina apresentaram cinco classes (Figura 25A e 25B), sendo a Betaproteobacteria a mais numerosa para ambas as localidades.

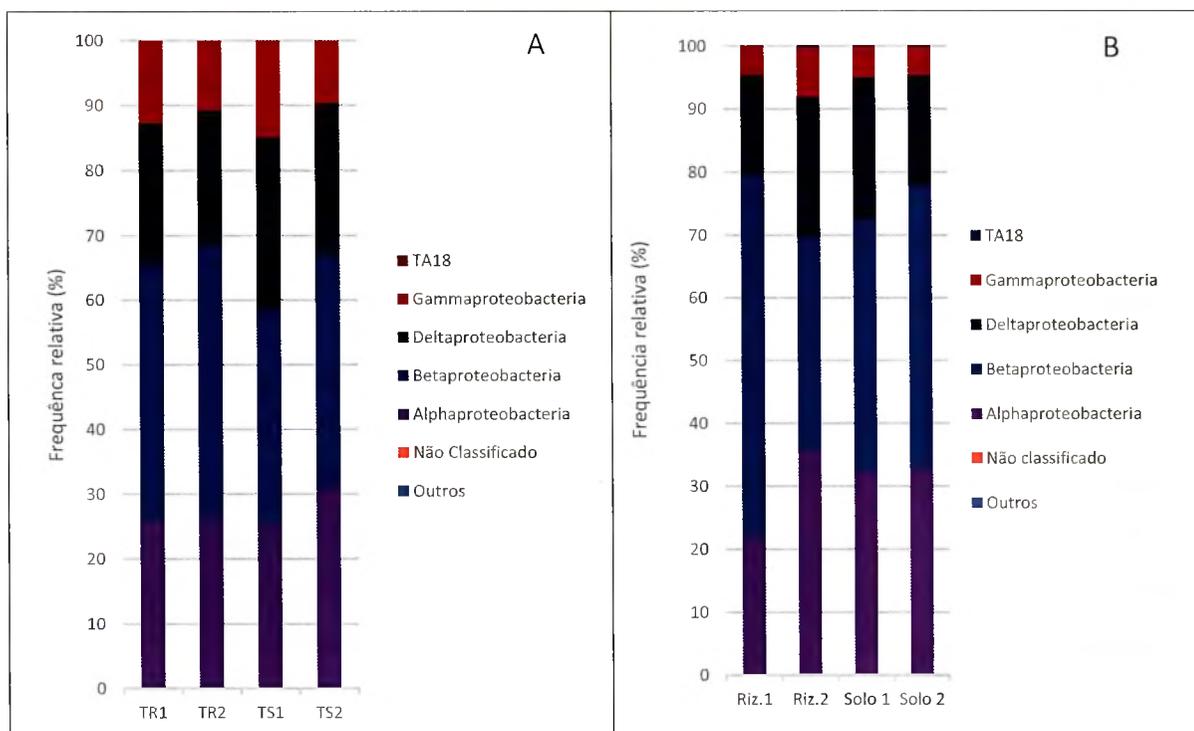


Figura 25 - Frequência relativa maior que 1% das classes pertencentes ao filo Proteobacteria para a coleta realizada em diferentes estádios vegetativos (1 e 2) em Palmital (SP) provenientes da rizosfera de trigo (TR) e solo de cultivo (TS) (A) e coleta realizada em Planaltina (DF) em diferentes estádios vegetativos (1 e 2), oriundas da rizosfera (Riz.) e solo de áreas de cultivo de trigo (B).

Na área de Palmital é observada uma maior frequência relativa da classe Betaproteobacteria para a coleta realizada na rizosfera (TR1 e TR2), quando em comparação com as amostras do solo (TS1 e TS2) da mesma localidade, sendo que a amostra TR2 demonstrou o maior percentual, com o valor de 42,1%. Para a área da Planaltina também é possível observar uma maior frequência desta classe, porém a rizosfera 1 apresentou os maiores percentuais. Esta alta frequência pode ser resultado da época de amostragem e indicar uma maior preferência desta classe pela rizosfera do trigo, entretanto, o estágio de desenvolvimento no qual o vegetal se encontrava variou de acordo com a área de cultivo.

A classe Alphaproteobacteria apresentou-se mais abundante no solo do que na região próxima à raiz, assim como observado para Deltaproteobacteria. Este perfil é observado para ambas localidades amostradas. A classe Gammaproteobacteria foi mais abundante na área de Palmital quando em comparação com Planaltina, sendo mais observada no solo do que aderido às raízes do trigo.

Naz e colaboradores (2014) ao estudar a diversidade da comunidade bacteriana da rizosfera do trigo, observou a presença dos mesmos filos de procaríotos, ocorrendo apenas uma variação na frequência relativa de cada grupo. Sendo que o

filo Proteobacteria foi o mais abundante para diferentes variedades de trigo durante a fase de floração, divergindo dos resultados observados no presente estudo. A divergência entre os resultados pode ser devido aos exsudatos radiculares liberados que apresentam variação de acordo com a cultivar, selecionando desta forma a comunidade microbiana associada, além disso, a frequência de determinadas classes oscila de acordo com o desenvolvimento vegetal (INCEOĞLU; SALLES; VAN ELSAS, 2012).

Nenhum dos organismos pertencentes a esta classe apresentou potencial antagônico frente aos fungos causadores da brusone e da giberela em trigo, mesmo este sendo um dos grupos mais abundantes. Uma alternativa, seria o uso de diferentes genótipos das linhagens fitopatogênicas utilizadas, podendo levar à identificação de isolados bacterianos com capacidade de inibição, porém estudos mais detalhados se fazem necessários.

4.2.3. Filo Firmicutes

O filo Firmicutes não se apresentou como o mais abundante em nenhuma das áreas amostradas, porém micro-organismos com potencial antagônico foram selecionados por apresentarem inibição dos fungos causadores da brusone e da giberela em trigo. Desta forma, uma análise mais detalhada foi realizada visando a melhor observação da frequência apresentada por esta classe (Figura 26A e B).

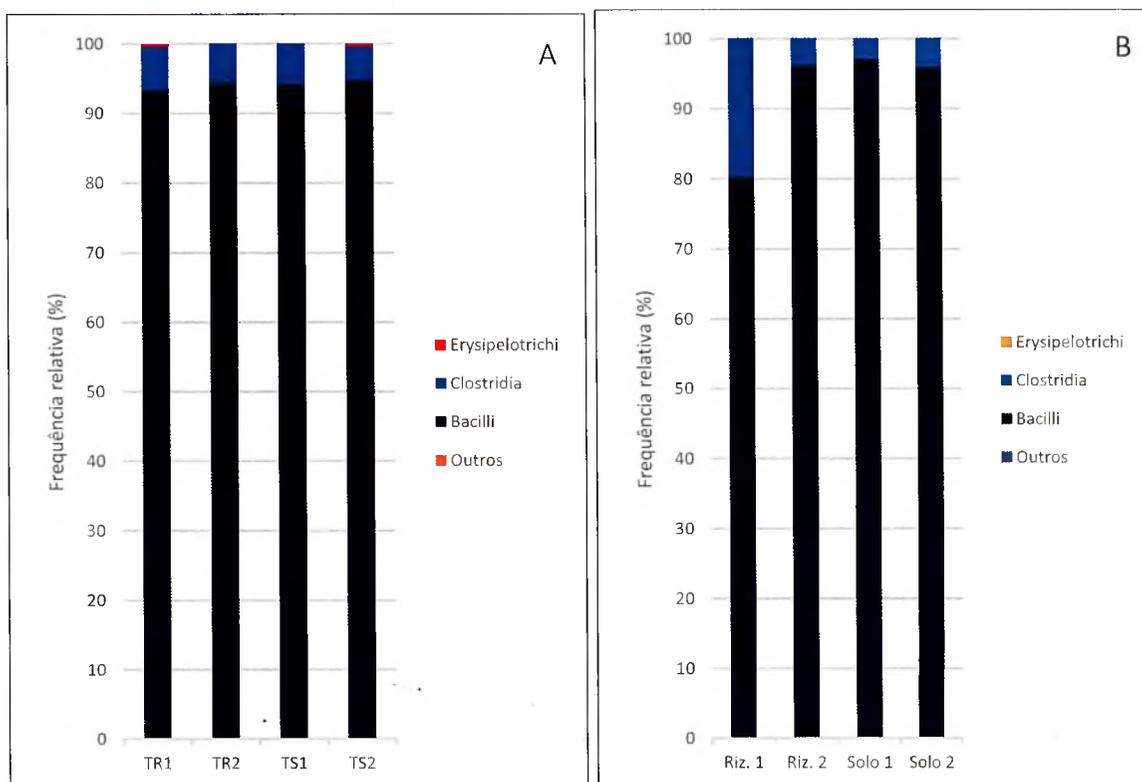


Figura 26 - Frequência relativa maior que 1% das classes pertencentes ao filo Firmicutes para a coleta realizada em diferentes estádios vegetativos (1 e 2) em Palmital (SP) provenientes da rizosfera de trigo (TR) e solo de cultivo (TS) (A) e coleta realizada em Planaltina (DF) em diferentes estádios vegetativos (1 e 2), oriundas da rizosfera (Riz.) e solo de áreas de cultivo de trigo (B).

Em ambas as áreas analisadas foi possível observar a formação de 3 classes pertencentes ao filo Firmicutes, sendo Bacilli a classe mais abundante em todas as amostras, seguido por Clostridia. A frequência relativa da classe Bacilli observada para a rizosfera proveniente de Palmital (TR1 e TR2) não apresentou diferença quando comparada com as amostras de solo e o mesmo é observado para a classe Clostridia. Porém, Palmital indicou a presença da classe Erysipelotrichi, que não foi observado para Planaltina. Na área de Planaltina a Rizosfera 1 apresentou uma frequência menor para a classe Bacilli, quando comparada com as demais. E consequentemente demonstrou um maior percentual para a classe Clostridia. Porém, tal perfil é observado apenas para esta amostra, sendo que as demais indicaram percentuais constantes com valores variando apenas em torno de 1% para cada amostra.

A classe Bacilli apresenta várias espécies com capacidade para desenvolvimento no solo como saprofitos (VILAIN et al., 2006), além do que podem habitar a rizosfera através da formação de biofilme apresentada por várias espécies

desta classe, favorecendo assim o seu desenvolvimento em associação com as raízes de diferentes plantas (LIU et al., 2014). No presente trabalho, bactérias com potencial antagonico foram obtidas através de técnicas de cultivo em placa e estas apresentaram similaridade com os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, ambos pertencentes à classe Bacilli, filo Firmicutes.

A maioria dos trabalhos utilizando isolados do gênero *Bacillus* têm demonstrado o potencial destas linhagens como agentes de biocontrole frente a diferentes fitopatôgenos (BETTIOL, 1991). Além do potencial como agentes de controle biológico, estas linhagens são descritas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (KAVAMURA et al. 2013; HUANG et al., 2015), gerando resultados favoráveis para a agricultura. Tais características podem apresentar resultados promissores na cultura do trigo, podendo fornecer promotores de crescimento e agentes de controle biológico para diferentes patógenos do trigo.

4.2.4. Filo Acidobacteria

O filo Acidobactéria foi o que apresentou a maior divergência entre a comunidade bacteriana das duas áreas analisadas, demonstrando porcentagens diferentes para cada classe (Figura 27A e B). Ambas as áreas exibiram 15 classes, sendo apenas uma discordante entre os dois locais de amostragem.

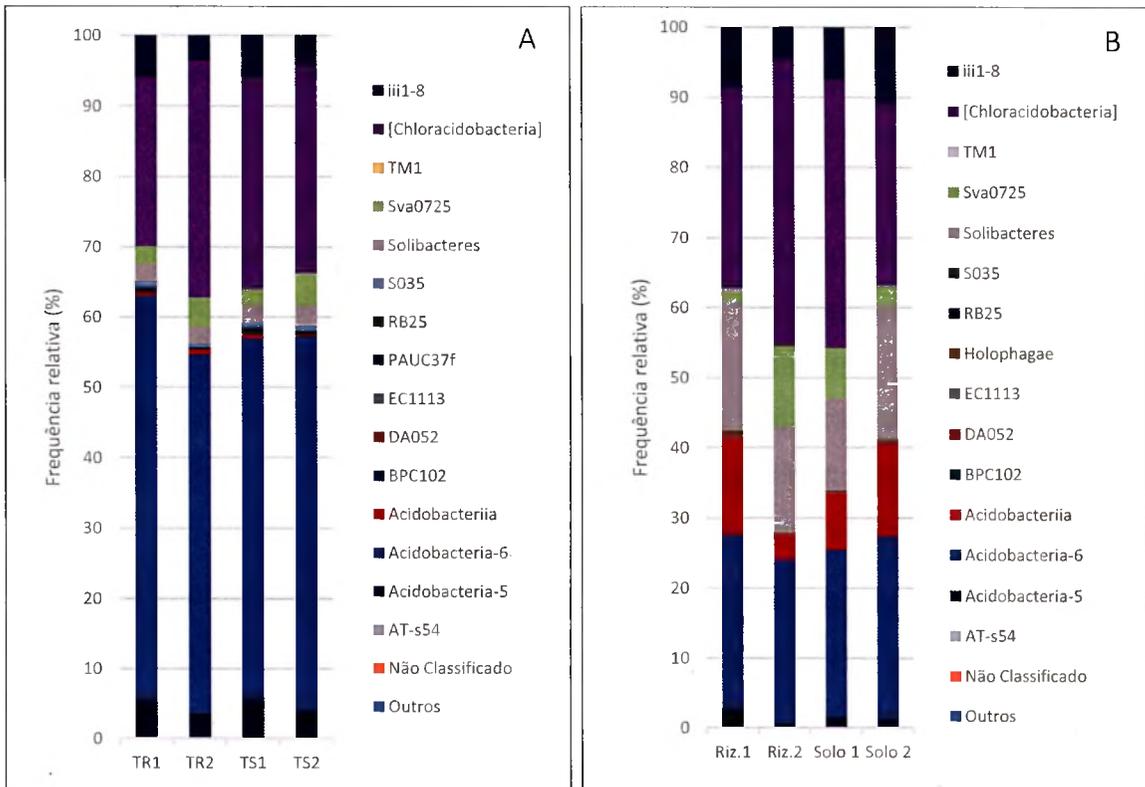


Figura 27 - Frequência relativa maior que 1% das classes pertencentes ao filo Acidobacteria para a coleta realizada em diferentes estádios vegetativos (1 e 2) em Palmital (SP) provenientes da rizosfera de trigo (TR) e solo de cultivo (TS) (A) e coleta realizada em Planaltina (DF) em diferentes estádios vegetativos (1 e 2), oriundas da rizosfera (Riz.) e solo de áreas de cultivo de trigo (B).

O solo e a rizosfera provenientes da cidade de Palmital apresentaram a classe Acidobacteria-6 como a mais abundante, sendo a maior frequência (57,3%) observada na rizosfera da primeira coleta (TR1). A segunda classe mais abundante, para esta área de amostragem, foi identificada como Chloracidobacteria com frequência relativa de 33,6% para a rizosfera da segunda coleta (TR2). As demais porcentagens apresentaram valores abaixo de 5%.

A área de Planaltina indicou uma maior diversidade de micro-organismos pertencentes à classe Chloracidobacteria diferenciando de Palmital, além de apresentar uma distribuição mais diversificada dos grupos microbianos. Chloracidobacteria foi a classe que apresentou maior abundância quando comparada com as demais, porém não houve padrão de distribuição diferente entre o solo de cultivo e a rizosfera do trigo, estes indicaram variações de 40,7% para a rizosfera (TR2) e 25,7% (solo 2) para o solo.

A segunda classe mais abundante foi Acidobacteria-6, que não apresentou diferença entre o solo e a rizosfera desta localidade. Porém, as porcentagens

observadas encontram-se bem abaixo das observadas para Palmital diante do mesmo grupo. Solibacteres foi o terceiro grupo com os índices mais expressivos em relação à abundância, sendo observado em quantidade significativa no solo 2, porém com valores inferiores para os demais pontos amostrados.

Nenhuma bactéria pertencente a este filo apresentou potencial como agentes de biocontrole frente ao fungo *P. grisea* e *F. graminearum*. Este filo bacteriano é um dos mais abundantes no solo de diferentes áreas, entretanto, as linhagens pertencentes a este filo não são fáceis de se obter através de técnicas dependentes de cultivo, desta forma a maior parte dos estudos relata a presença de tais micro-organismos após análises moleculares de diversidade.

Apesar de sua alta abundância e diversidade em diferentes tipos de solo, as informações a respeito deste grupo são restritas, entretanto, mecanismos como a produção de biofilme, produção de novos compostos microbianos e resistência à dessecação, já são descritos para procariotos pertencentes a este filo (CHALLACOMBE et al., 2011). Apesar de ser constantemente descrito pela literatura, o conhecimento do papel destes organismos quando inseridos nos mais diversos ecossistemas ainda é limitado, indicando assim a necessidade de descrições mais detalhadas das características destes micro-organismos. A melhor compreensão deste grupo pode agregar diferentes informações quanto à estrutura da comunidade microbiana e sua aplicação como agentes de biocontrole frente a diferentes patógenos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- O uso de técnicas dependentes de cultivo propiciou a obtenção de linhagens, em sua maioria, *Streptomyces*, capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* em testes *in vitro*. Isto indica a presença de micro-organismos associados às raízes de trigo com potencial para o controle biológico dos fungos causadores da brusone e giberela;
- Uma porcentagem (62,5%) dos micro-organismos antagonicos produziram substâncias antimicrobianas com atividade contra *Pyricularia grisea*, entretanto, estudos mais detalhados são necessários para a elucidação destes compostos e otimização de sua produção;
- Com os resultados obtidos por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi possível identificar que a maioria dos isolados apresentou similaridade acima de 99,5% com diferentes linhagens-tipo de *Streptomyces*. Além disso, quatro linhagens que apresentaram similaridade inferior a 99,4%, podem ser possíveis espécies ainda não descritas do gênero *Streptomyces*, entretanto, uma análise polifásica é necessária para tal confirmação.
- De modo geral, amostras de Palmital-SP apresentaram maior semelhança do que amostras de Brasília-DF, de acordo com os índices de dissimilaridade (45,44% e 56,26%, respectivamente). As amostras de solo e rizosfera de Palmital diferiram principalmente de acordo com o estágio da planta (coletas 1 e 2), assim como as amostras de rizosfera de Brasília (coletas A e B), entretanto as amostras de solo mostraram-se mais similares entre si. A composição das comunidades bacterianas obtidas para as duas áreas amostradas diferiram entre si; tais diferenças podem ser devido à variedade, estágio fenológico e às características do local de amostragem. O filo mais abundante foi Actinobacteria, seguido de Proteobacteria e Acidobacteria, com variações nas

proporções entre as amostras. O filo Acidobacteria foi o que apresentou a maior variação entre as amostras das duas áreas amostradas, quando analisadas as classes;

- Alguns grupos taxonômicos podem ser os responsáveis pelas diferenças entre as amostras, sendo que para a área de Palmital, das 18 OTUs que correspondem a mais de 10% das diferenças entre as amostras, mais de 33% foi classificada pertencente ao filo Acidobacteria, seguida de mais de 22% pertencente ao filo Actinobacteria. Já para a área de Brasília, das 15 OTUs que correspondem a mais de 10% das diferenças entre as amostras, 40% foi classificada como pertencente ao filo Actinobacteria e mais de 33% ao filo Proteobacteria.
- As técnicas de isolamento propiciaram o isolamento de bactérias pertencentes principalmente aos filos Actinobacteria e Firmicutes com capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos de interesse. Embora os filos mais abundantes detectados por meio do sequenciamento de amplicons 16S rRNA tenham sido Actinobacteria, Proteobacteria e Acidobacteria, os meios de cultivo utilizados no estudo em questão não propiciaram o isolamento seletivo de representantes dos dois últimos filos, ou se foram isolados, não foram capazes de inibir os fitopatógenos de interesse. Ambas as técnicas identificaram alta abundância de representantes do filo Actinobacteria, os principais responsáveis pela inibição do micélio dos fitopatógenos causadores da brusone e da giberela em trigo. É interessante usar as técnicas independentes de cultivo para auxiliar na compreensão da estrutura e diversidade de comunidades bacterianas associadas ao trigo, podendo direcionar o isolamento para grupos de interesse. Desta forma, as técnicas dependentes e independentes de cultivo, quando usadas de forma complementar, podem auxiliar na busca por micro-organismos com potencial para o controle biológico.

Em resumo, as estirpes selecionadas neste trabalho apresentam potencial como agentes de biocontrole, porém a confirmação de tais resultados em condições de campo se fazem necessários para o uso destes como agentes de controle biológico. Este é o primeiro trabalho a usar técnicas dependentes e

independentes de cultivo de comunidades bacterianas associadas à *Triticum aestivum* L. de duas áreas de cultivo de trigo no Brasil e analisar o potencial de controle dos isolados obtidos nestas áreas frente aos fungos fitopatógenos *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum*, causadores da brusone e giberela do trigo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, I.P.; GLOVER, R.H.; MONGER, W.A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology**, v.10, n. 4, p. 537-545, 2009.
- AGRIANUAL: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, FNP Consultoria e Comércio.2008. 502p.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. Elsevier Academic Press, New Iork, 2005. p. 594-598.
- AKTUGANOV, G.; MELENTJEV, A.; GALIMZIANOVA, N.; KHALIKOVA, E.; KORPELA, T.; SUSI, P. Wide-range antifungal antagonism of *Paenibacillus ehimensis* IB-Xb and its dependence on chitinase and beta-1,3-glucanase production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 7, p. 577 587, July 2008.
- AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 565-568, 2002.
- ARAÚJO, J.M. (1998) Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (org). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, p. 351-367.
- AWLA, H.K., KADIR, J., OTHMAN, R., RASHID, T.S. WONG, M.-Y. Bioactive Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Isolate UPMRS4 and Antifungal Activity against *Pyricularia oryzae*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 1077-1085, 2016.
- BACALTCHUK, B. Qualidade dos alimentos exigida pelos consumidores no século XXI. **Conferência Brasileira de Pós-Colheita**. Porto Alegre, v. 1, pp 13-22, 1999.
- BAIS, H. P.; PARK, S. W.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in plant science**, v. 9, n.1, p. 26-32, 2004.

BAIS, H. P. et al. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.

BAEK, S.H.; IM, W.T.; OH, H.W.; LEE, J.S.; OH, H.M.; LEE, S.T. *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 2665-2669, 2006.

BHATTACHARYYA, P.N., JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BEDENDO, I.P., PRABHU, A.S. Doenças do arroz (*Oryza Sativa*). In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**, Vol 2: Doenças de Plantas Cultivadas, 4 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, p.79-90, 2005.

BELL, G.D.H. (1987) **The history of wheat cultivation**. In: LUPTON, F.G.H. Wheat breeding. Chapman and Hall. p. 31-50.

BELLO, G. M.; MÓNACO, C.I.; SIMÓN, M.R. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 627-636, 2002.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites, a personal view. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, n.1, p. 1-26, 2005.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v.17, n. 8, p.478-486, 2012.

BETTIOL, W, Controle biológico de doenças do filoplano. In: **Controle biológico de doenças de plantas**. Bettiol, W (Org) Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15)

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

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1991.452 p.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BOTTALICO, A. & PERRONE, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 611-624, 2002.

BRAMMER, S. P.; BARCELLOS, A. L.; MARAES-FERNANDES, M. I. B.; MILACH, S. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias para o melhoramento no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 5-20, 2000.

CAPORASP, J.G.; LAUBER, C.L.; WILLIAN, A.W.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J.N.; SMITH, G.; KNIGHT, A. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, Colorado, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

CHALLACOMBE, J.F.; EICHORST, S.A.; HAUSER, L.; LAND, M.; XIE, G.; KUSKE, C.R. Biological consequences of ancient gene acquisition and duplication in the large

genome of *Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076. **PLOS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

CHALLACOMBE, J.F.; EICHORST, S.A.; HAUSER, L.; LAND, M.; XIE, G.; KUSKE, C.R. Biological consequences of ancient gene acquisition and duplication in the large genome of *Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076. **PLOS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

CHET, I.; BENHAMOU, S.H. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: HARMA, G. E.; KUBICE, C. P. (Ed.). ***Trichoderma & Gliocladium***: enzymes, biological control and comercial applications. London; Taylor & Francis, 1998. V.2, p. 152-153.

CHEN, K.; PACHTER, L. Bioinformatics for wholegenome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS Computational Biology**, v. 1, p. 106–112, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasília, DF). **Acompanhamento de safra brasileira 2014/2015: grãos, primeiro levantamento**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_23_13_46_38_boletim_portugues_outubro_2014.pdf>. Acesso em: 22 Ago. 2015.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; McDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.;

ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335-336, 2010.

COUCH, B.C.; FUDAL, I.; LEBRUN, M.-H.; THARREAU, D.; VALENT, B.; KIM, P.; NOTTÉGHEM, J.-L.; KOHN, L.M. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, v.170, p. 613-630, 2005.

CRUZ, M.F.A., MACIEL, J.L.N., PRESTES, A.M., BOMBONATTO, E.A.S., PEREIRA, J.F., CONSOLI, L. Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* do trigo **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p.393-401. 2009.

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N.; SCHEEREN, P. L. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estágios de planta jovem e de planta adulta. **Tropical Plant Pathology, Brasília**, v. 35, n. 1, p. 24-31. 2010.

CRUZ, M. F. A.; DINIZ, A. P. C.; RODRIGUES, F. A.; BARROS, E. G. Aplicação foliar de produtos na redução da severidade da brusone do trigo. **Tropical Plant Pathology, Brasília**, v. 36, n. 6, p. 424-428, 2011.

CUNHA, G. R. da; SCHEEREN, P. L.; PIRES, J. L. F.; MALUF, J. R. T.; PASINATO, A.; CAIERÃO, E.; SÓ E SILVA, M.; DOTTO, S. R.; CAMPOS, L. A.; C.; FELÍCIO, J. C.; CASTRO, R. L. de; MARCHIORO, V.; RIEDE, C. R.; ROSA FILHO, O.; TONON, V. D.; SVOBODA, L. H. **Regiões de adaptação para trigo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 35p. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online, 20).

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

DAAMEN, R.; WIJNANDS, F.; VILET, G. Epidemics of diseases and pest of winter wheat at different levels of agrochemical input. **Journal of Phytopathology**, v. 125, p. 305–319, 1989.

DANTAS, J.S., SOUZA, A.P., FARIAS, M.F., NOGUEIRA, V.D.F.B. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**. v. 2, p. 213-224, 2011.

DEAN, R.A.; TALBOT, N.J.; EBBOLE, D.J.; FARMAN, M.L.; MITCHELL, T.K.; ORBACH, M.J.; THON, M.; KULKARNI, R.; XU, J.-R.; PAN, H.; READ, N.D.; LEE, Y.-H.; CARBONE, I.; BROWN, D.; OH, Y.Y.; DONOFRIO, N.; JEONG, J.S.; SOANES, D.M.; DJONOVIC, S.; KOLOMIETS, E.; REHMEYER, C.; LI, W.; HARDING, M.; KIM, S.; LEBRUN, M.-H.; BOHNERT, H.; COUGHLAN, S.; BUTLER, J.; CALVO, S.; MA, L.-J.; NICOL, R.; PURCELL, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J.E.; BIRREN, B.W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**, v.434, p.980-986, 2005.

DEL PONTE, E. M., FERNANDES, J.M.C., PIEROBOM, C.R., BERGSTROM, G.C. Giberela do trigo – Aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 587-605, 2004.

DESJARDINS, A. E. *Gibberella* from A (*venaceae*) to Z (*ee*). **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, n. 2, p. 177-198, 2003.

DIAS, A.C.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, São Paulo, v. 98, n. 4, p. 541-551.2010.

DJONOVIC, S.; VITTONI, G.; MENDONZA-HERRERA, A.; KENERLEY, C.M. Enhanced biocontrol activity of *Thichoderma virens* Transformants constitutively co expressing beta-1, 3- and bet-1, 6-glucanase genes. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.8, n.4, p.469-480, 2007.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 227–243, 2012.

DOUMBOU, C. L.; SALOVE, M.K.H.; CRAWFORD, D.L.; BEAULIEU, C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and promote plant growth. **Phytoprotection**. Quebec, v. 82, p. 85-102, 2001.

DUNBAR, J.; BARNS, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3035-3045, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. J. M. **Projeto de brusone do trigo é tema de encontro**. 2009. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/maio/1a-semana/workshop-orienta-projeto-de-Brusone-do-trigo/>. Acesso em: 20 mar. 2014.

FANG, L.Z.; KUN, X.C.; SONG, Z.C.; QIN, X.J.; QIU, H.Y.; QUN, D.C.; HE, M.M. Fungistatic intensity of agricultural soil against fungal agents and phylogenetic analysis on the actinobacteria involved. **Current Microbiology**, New York, v. 62, p. 1152-1159, 2011.

FIGUEIREDO, M.V.B.; SOBRAL, J.K.; STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H.A.; OLVEIRA, J.P.O.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2010. Parte 4, Cap.1, p.387-414.

FILIPPI MC, CORTES C, BECKERMAN J, SWEIGARD J, VALENT B, GONZALEZ C, EBBOLE D (2006) **Novos aspectos da patogenicidade de Magnaporthe grisea**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão- CNPAF (EMBRAPA: CNPAF Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22).

FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

GARCIA JÚNIOR, D., VECHIATO, M. H., MENTEN, J. O.M. Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.3, p.280-283, 2008.

GAO B., GUPTA, R.S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. **Microbiol Mol Biol Ver**, v. 76, p. 66-112, 2012.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual review of microbiology**, v. 37, n. 41, p. 189–216, 1983.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnol**, London, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

GNANIMANICAKAM, S. Biological control of crop diseases. **Springer**. New York, NY. 2002.

GOULART, A.C.P. (2004) **Perdas em trigo causadas pela brusone**. In: Vale FXR (Org.) Anais do I Workshop de epidemiologia de doenças de plantas: quantificação de perdas no manejo de doenças de plantas. Viçosa, MG: UFV/DFP. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/workshop/Resumos/Perdas%20trigo%20brusone.pdf>>. Acesso em: 29 ago de 2015.

GOULART, A.C.P., PAIVA, F.A. Controle de *Pyricularia oryzae* e *Helminthosporium sativum* pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p.1983-1988, 1991.

GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A. Perdas no rendimento de grãos de trigo causadas por *Pyricularia grisea*, nos anos de 1991 e 1992, no Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p.279-282, 2000.

GOULART, A.C.P.; SOUSA, P.G.; URASHIMA, A.S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, 4, p. 358-363, 2007.

GREGOR, A.K.; KLUBEK, B.; VARSA, E.C. Identification and use of actinomucetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 483-491, 2003.

GRIGOLETTI, A.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**. v. 30, p. 155-165, 2000.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.253–260, 2009.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HELBING, J. Biological control of *Botrytis cinérea* Pers. Ex Fr. In strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 1891). **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 149, n. 5, p. 265-273, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and electrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEUPEL, S.; ROSER, B.; KUHN, H.; LEBRUN, M.-H.; VILLALBA, F.; REQUENA, N. Erl1, a novel era-like GTPase from *Magnaporthe oryzae*, is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 1, p. 67-81, 2010.

HOWARD RJ, VALENT B (1996) Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 491-512, 1996.

IGARASHI, S.; BALAN, M.G. Brusone do trigo. **Atualidades Agrícolas Basf**. p.28-31, 2004.

IGARASHI, S.; UTIAMADA, C.M.; IGARASHI, L.C.; KAZUMA, A.H.; LOPES, R.S. *Pyricularia* em trigo. I. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 351-352, 1986.

IGARASHI, S. **Uma análise da ocorrência de “brusone” do trigo no Paraná**. Trabalho apresentado no Seminário sobre Melhoramento para a Resistência a Enfermidades, Passo Fundo, RS. 19p. 1988.

IGNACZAK, J.C.; MORI, C.; GARAGORRY, F.L.; FILHO, H.C. **Dinâmica da produção de trigo no Brasil no período de 1975 a 2003**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 40 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 36).

INCEOĞLU, Ö.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D. Soil and Cultivar Type Shape the Bacterial Community in the Potato Rhizosphere. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 460–470, 2012.

JAVAID, M.; SULTAN, S. “Plant Growth Promotion Traits and Cr (VI) Reduction Potentials of Cr (VI) Resistant Streptomyces Strains.” **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 420–428, 2013.

JOSHI, M.N.; SHARMA, A.; PANDIT, A.S.; PANDYA, R.V.; SAXENA, A.K.; BAGATHARIA, S.B. Draft genome sequence of *Brevibacillus* sp. strain BAB 2500, a strain that might play an important role in agriculture. **Genome Announcements**, Washington, v. 1, n. 1, p. 1-2, Feb. 2013.

KIM, S.; AHN, I.-P.; RHO, H.-S.; LEE, Y.-H. MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. **Molecular Microbiology**, v. 57, n.5, p. 1224-1237, 2005.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; ÁVILA, L.A.; et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiol Res**, v. 168, p. 183–191, 2013.

KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C.E. Evaluation of biological seed treatment for controlling root disease of pea. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p.1087- 1095. 1978.

KUMAR MEENA, M.; GUPTA, S.; DATTA, S. Antifungal Potential of PGPR, their Growth Promoting Activity on Seed Germination and Seedling Growth of Winter Wheat and Genetic Variabilities among Bacterial Isolates. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 5, n. 1, p. 235–243, 2016.

LASCA, C. C.; KRUPPA, P. C.; BARROS, B. C.; SCHIMIDT, J. R.; CHIBA, S. Controle de *Pyricularia grisea* e *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo mediante

tratamento com fungicidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p.55-63, 2001.

LANNA FILHO, R., FERRO, H. M., PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LEITE, B., PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E.W.; ISCHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungo às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.119-157, 2001.

LIMA, M. I. P. M. **Giberela ou brusone**: Orientações para Identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo – CNTP, 2004. (Documentos, 40). Disponível em:http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.htm. Acesso em: 06 set. 2015.

LIU, P.; WANG, X.H.; LI, J.G.; QIN, W.; XIAO, C.Z.; ZHAO, X.; JIANG, H.X.; SUI, J.K.; SA, R.B.; WANG, W.Y.; LIU, X.L. Pyrosequencing reveals fungal communities in the rhizosphere of xinjiang jujube. **BioMed Research International**, Nasr, v. 2015, p. 1-8, 2015.

LUCON, C. M. M.; MELO, I. S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 132-136, 1999.

LUDWING, J., MOURA, A.B., GOMES, C.B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**. v. 38, p. 264-268, 2013.

MACAGNAM, D.; ROMEIRO, R.S.; SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their

antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 122-132, 2006.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAULER-MACHNIK, A. & ZAHN, K. Ear fusariosis in wheat new findings on their epidemiology and control with Folicur (Tebuconazole). **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer**, v. 47, p. 129-155, 1994.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. **Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Micotoxicology**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1984. 328p.

MATEUS, D. M. R. et al. Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controlo por biocidas. **Conservar Património**, v. 17, p. 11–20, 2013.

MCMULLEN, M., JONES, R., GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, v. 81, p. 1340-1348. 1997.

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

MEHTA, Y. R; BAIER, A. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticales e trigo no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 119-125, 1998.

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

MENEZES M, OLIVEIRA M A (1993) **Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 227p.

MESEL, I.; DERYCKE, S.; MOENS, T.; VAN der GUCHT, K.; VINCX, M.; SWINGS, J. Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 733-744, 2004.

MEYER, J. B. et al. Interplay between wheat cultivars, biocontrol pseudomonads, and soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6196–6204, 2010.

MINOTTI, R., HOLLER, W. A., SPADOTTO, C. A. Produção potencial de trigo no Brasil, **Embrapa Gestão Territorial- Nota técnica**, (ALICE), 2014.

MORAES-FERNANDES, M.I.B., ZANATTA, A.C.A., PRESTES, A. M., CAETANO, V.D. R., BARCELLOS, A.L., ANGRA, D.C., PANDOLFI, V. Cytogenetics and immature culture embryo at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Genetics and Molecular Biology**. Riberão Preto, v. 23, n. 4, p. 1051-1062, 2000.

MONTEIRO, F. P.; PACHECO, L. P.; LORENZETTI, E. R.; ARMESTO, C.; SOUZA, P. E.; ABREU, M. S. Exsudatos radiculares de plantas de cobertura no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.

MURRAY, T.D.; Diseases caused by Fungi and Fungi-Like Organisms. In: BOCKUS, W. W.; BOWDWN, R. L.; HUNGER, R. M.; MORRIL, W. L.; MURRAY, T. D.; SMILE, R. W. **Compendium of wheat Diseases and Pests**. 3.ed. Minnesota: The American Phytopathological Society, 2010. **Muriuki, J.G.** (2001) Deoxynivalenol and nivalenol in pathogenesis of *Fusarium* head blight in wheat. Thesis, University of Minnesota.

NAZ, I.; MIRZA, M.; BANO, A. Molecular Characterization of Rhizosphere Bacterial Communities Associated With Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Cultivars At. **JAPS, Journal of Animal and Plant**, v. 24, n. 4, p. 1123–1134, 2014.

NOLD, S.C.; ZHOU, J.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Pacific Northwest marinesediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the subdivision of the Proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4532–4535, 2000.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3622-3626, 1999.

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

OU, S.H. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. **Annual Review of Phytopathology**, v, 18, p. 167-187, 1980.

OU, S. H., Blast. In: **Rice diseases**. 2nd. Ed. Wallingford: CAB International, p. 109-201, 1985.

PAL, K.K., GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. **The plant health instructor**. v. 2, p. 1117-1142, 2006.

PANISSON, E., REIS, E. M. & BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 189-192, 2003.

PARRY, D.W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 207-238, 1995.

PAULITZ, T.C. Fusarium head blight: a re-emerging disease. **Phytoprotection**, v. 80, p. 127-133, 1999.

PHAM, V.H.T.; KIM, J. Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 475-484, 2012.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C.P.; DROZDOWICZ, A. Influência do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana em solos de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1183-1190, 2000.

PERELLÓ, A., ALBERIONE, E., ANNONE, J., CAMPOS, P., CORDO, C.A., FORMENTO, N., GONZÁLEZ, M., KRIPELZ, N., MELEGARI, A., MONTERROSO, L., PÉREZ, B.A., ROMERO, A.M., SAGADIN, M., SISTERNA, M., TRUOL, G., COPIA, P., NOME, S.F. (2011) Enfermidades de *Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*. In: Nome SF, Docampo DM, Conci LR, Pérez BA (Eds.) **Atlas Fitopatológico Argentino**. Córdoba: Argentina 4:1851-8974. Disponível em: <http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=1045>. Acesso em: 07 set de 15.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

PICININI, E.C. FERNANDES, J.M.C. (1995) **Doenças de cereais de inverno: aspectos epidemiológicos e controle**. Passo Fundo: CNPT/EMBRAPA. 85p.

PICININI, E.C. FERNANDES, J.M.C. Efeito da época de pulverização com fungicidas sobre o controle de *Gibberella zeae* em trigo. **Comunicado Técnico**, Embrapa Trigo, Passo Fundo. 2001.

POPPER, L; SCHÄFER, W., FREUND, W. **Future of Flour – A Compendium of Flour Improvement**. Kansas City: Agrimedia, 2006. 325p.

PRABHU, A.S., FILIPPI, M.C.C. (2006) **Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão - CNPAF.

PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 63–77, 2014.

PRAUSER H.; SCHUMANN P.; RAINEY F.A.; KROPPESTEDT R.M.; STACKEBRANDT E. *Terracoccus luteus* gen. nov., sp. nov., an LL diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from Soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 42, n. 4, p. 1218-1224. 1997.

PRESTES, A. M.; ARENDT, P. F.; FERNANDES, J. M. C.; SCHEEREN, P. L. Resistance to *Magnaporthe grisea* among Brazilian wheat genotypes. In: BUCK, H. T.; NISI, J. E.; SALOMÓN, N. (Ed.). **Wheat production in stressed environments**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 119-123.

PURCHIO-MUCHOVEJ A, MUCHOVEJ JJ (1994) **O gênero Pyricularia e seus teleomorfos**. In: LUZ, W.C., FERNANDES, J.M., PRESTES, A.M., PICININI, E.C. (Eds.) RAPP-Revisão Anual de Patologia de Plantas vol 2. Rio Grande do Sul: Passo Fundo p. 175-208.

PURKHOLD, U.; WAGNER, M.; TIMMERMANN, G.; POMMERENING-ROSER, A.; KOOPS, H.P. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. **Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v. 53, n.5, p. 1485-1494, 2003.

QUECINE, M.C.; ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; GAI, C.S.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANIKLEINER, A.A. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 47, n. 6, p. 486-491, Dec. 2008.

RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F..C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59342, 2013.

RADAJEWSKI, S.; INESON, P.; PAREKH, N.R.; MURRELL, J.C. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. **Letters to Nature**, London, v. 403, p. 646-649, 2000.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 576-590, 2008.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.

RANA, S.; SALAM, M.D. Antimicrobial potencial of actinomycetes isolated from soil samples of Punjab, India. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v.1, n. 2, p. 1-6, 2014.

REIS, E.M.; FERNANDEZ, J.M.C.; PICININI, E.C. Estratégias para o controle de doenças do trigo. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1988. 50p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 7).

REIS, E. M. **Doenças do trigo III – Fusariose**. 2.ed. São Paulo: Merck Sharp & Dohme, 1988. 12p.

REIS, E.M. (2004) **Previsão de doenças de plantas**. Passo Fundo: UPF 316p.

REIS, E.M.; BLUM, M.M.C.; FORCELINI, C.A. Sobrevivência de *Pyricularia oryzae* associada a sementes de trigo. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.43-44, 1995.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; MEDEIRA, C. A. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. Londrina: ES Comunicação, 2001. 96p.

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

RIBOT, C., HIRSCH, J., BALZERGUE, S., THARREAU, D., NOTTEGHEM, J.L., LEBRUN, M.H., MOREL, J.B. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p.114-124, 2008.

RIEDE, C. R. Trigo- Alerta do Paraná. **Cultivar – Grandes Culturas**, Pelotas- RS, v. 65, p. 13-13, 2004.

ROCHA, U.N. da; PLUGGE, C.M.; GEORGE, I.; ELSAS, J.D. van; OVERBEEK, L.S. van. The rhizosphere selects for particular groups of acidobacteria and verrucomicrobia. **PLOS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-10, Dec. 2013.

ROMAN, E. S. **Tecnologias de produção para a cultura do trigo/Bayer CropScience**. Passo Fundo: Plantio Direto Eventos, 2005.

SACCARO, P. A. **Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum**. London: Ann Arbor Mich, 1882. 223p.

SANDAA, R-A.; TORVISK, V.; ENGER, Ø. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 287-295, 2001.

SANGUIN, H.; SARNIGUET, A.; GAZENGEL, K.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; GRUNDMANN, G.L. Rhizosphere bacterial communities associated with disease

suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. **New Phytologist**, v. 184, p. 694-707, 2009.

SANTANA FM, CHAVES MS (2009) **Sistema de produção de trigo**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Trigo/CultivodeTrigo/doencas.htm>>. Acesso 04 ago de 15.

SANTOS, S.N.; OLIVEIRA, L.K.X.; MELO, I.S.; VELOZO, E.S.; ROQUE, M.R.A. Antifungal activity of bacterial strains from the rhizosphere of *Stachytarpheta crassifolia*. **Africa Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 10, p. 4996-5000, 2001.

SANTOS, S. N.; OLIVEIRA, L.K.X.; MELO, I. S.; VELOZO, E. S.; ROQUE, M. R. A. Antifungal activity of bacterial strains from the rhizosphere of *Stachytarpheta crassifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 4996-5000, 2011.

SANTOS, S. N., GACESA, R., TAKETANI, R. G., LONG, P. F., MELO, I. S. Genome sequence of *Streptomyces caatingaensis* CMAA 1322, a new abiotic stress-tolerant actinomycete isolated from dried lake bed sediment in the Brazilian Caatinga biome. **Genome announcements**, v. 3, n. 5, e01020-15, 2015.

SCHEEREN, P. L. **Informações sobre o trigo (*Triticum spp*)**. Passo Fundo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa do trigo, 1986. 34p.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A. W.; BAKKER, P. A. H. M. Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, n. 1, p. 339–358, 1987.

SENEVIRATNE, G.; WEERASEKARA, M.L.M.A.W.; ZAVAHIR, J.S. Microbial biofilms: How effective in *Rhizobium*-legume symbiosis? In: SAGHIR KHAN, M.; ZAIDI, A.;

MUSARRAT, J. **Microbes for legume improvement**. Pondicherry: Springer, 2010. chap. 6, p. 123-136.

SESMA, A., OSBOURN, A. E. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. **Nature**, v. 431, n. 7008, p. 582-586, 2004.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; KOMAGATA, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 46, n. 4, p. 939-946, 1996.

SILVA, F.de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, H. S. A.; TOZZI, João Paulo L; TERRASAN, C. R. F. ; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms isolated from coffee leaves, roots and branches as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 78, p. 193-196, 2012.

SILVA, J. L. DA; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agroambiente online**, v.6, p. 47-52, 2012.

SILVA, C. P., NOMURA, E., FREITAS, E. G, et al. Eficiência de tratamentos alternativos no controle de *Pyricularia grisea* em sementes de trigo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 127-131, 2009.

SILVA, F.S.P. et al. *Streptomyces atlanticus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from marine sponge *Aplysina fulva* (Pallas, 1766). **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-8, 2016.

SINGH, G. P.; CHAUDHARY, H. B. Selection parameters and enhancement of wheat (*Triticum aestivum* L.) under different moisture stress conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 5, n.5, p. 894-898, 2006.

SNIJDERS, C. H. A. The inheritance of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 50, n. 1, p. 11-18, 1990.

SOARES, E. C. L.; COSTA, E. P.; SILVA, L. C. N. Isolamento , Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* sp . UFPEDA 968. **Sientia Plena**, v. 8, p. 1-7, 2012.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **PNAS**, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 47, p. 479-491, 1977.

STEVENSON, B. S., EICHORST, S. A., WERTZ, J. T., SCHMIDT, T. M., BREZNAK, J. A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 70, v. 8, p. 4748-4755, 2004.

SU'UDI, M.; KIM, J.; PARK, J.-M.; BAE, S.-C.; KIM, D.; KIM, Y.-H.; AHN, I.-P. Quantification of rice blast disease progressions through Taqman real-time PCR. **Molecular Biotechnology**, v. 55, p. 43-48, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**; Tradução: SANTAREM ET AL., 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

TALBOT, N.J. On the trail of a cereal Killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Rev. Microbiology**, v. 57, p. 177-202, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TOLEDO, J. Enfermedades. In: DÍAZ, O.; GUZMÁN, E.; TOLEDO, J.; FRANCO, P.; TERRAZAS, D.; ANTEZANA, A. **Guía de recomendaciones técnicas del cultivo de trigo**. Santa Cruz- Bolívia. 2004. 73p.

TOLEDO, J.; ESCOBAR, R. Piricularia o bruzone del trigo. **CIAT**. Santa Cruz, Bolívia. CIAT, 2002. 20p.

TORRES, G.A.M., SANTANA, F.M., FERNANDES, J.M.C., SILVA, M. (2009) Doenças da espiga causam perda de rendimento em trigo nos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, em 2009. Passo Fundo: Embrapa Trigo - CNPT p10 (**EMBRAPA - CNPT Comunicado Técnico online, 255**).

TOUMATIA, O. et al. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 234–239, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foreign Agricultural Service**: world agricultural production: office of global analyses. 2013. (Circular Series WAP). Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/>. Acesso em: 02 set. 2015.

URASHIMA, A.S.; LAVORENTI, N.A.; GOULART, A.C.P.; MEHTA, Y.R. Resistance spectra of wheat cultivars and virulence diversity of *Magnaporthe grisea* isolates in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.511-518, 2004.

URASHIMA, A.S., LEITE, S.F., GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 275-279, 2007.

URASHIMA, A.S. (2010) Wheat Blast: a potential threat to global wheat production. Resumos IV-O-105. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/622505005thInternationalRiceBlastConference/program-for-web-0809.pdf>. Acesso em: 27 ago de 2015.

VAL-MORAES, S.P. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo**: avaliação por microarranjo de DNA. 2008. 171p. Tese (Doutorado na área de Microbiologia Agropecuária) - Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

VILAIN, S.; LUO, Y.; HILDRETH, M.B.; BRÖZEL, V.S. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4970-4977, July 2006.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.1; DEBOY, R.T.; DETTER, C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROISOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; AFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WEID, I. von der; ARTURSSON, V.; SELDIN, L.; JANSSON, J.K. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasiliensis* PB177. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 12, p. 1591-1597, 2005.

WANG, C., WANG, Z., QIAO, X., LI, Z., LI, F., CHEN, M., WANG, Y., HUANG, Y., CUI, H. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. **FEMS Microbiol Lett**, v. 341, p. 45–51, 2013.

WEINERT, N. et al. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: Many common and few cultivar-dependent taxa. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 3, p. 497–506, 2011.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.** v. 26, p. 379-407, 1988.

WHIPPS, J.M. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WILSON, M., HIRANO, S.S., LINDOW, S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.1435-1443, 1999.

XU, M.; SCHNORR, J.; KEIBLE, B.; SIMON, H.M. Comparative analysis of 16S rRNA and *amoA* genes from Archaea selected with organic and inorganic amendments in enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 7, p. 2137-2146, Jan. 2012.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y. Cultivation of uncultured chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured chloroflexi "subphylum i" with natural and biotechnological relevance. **Microbes and environments / JSME**, v. 24, n. 3, p. 205–216, 2009.

YAN, Y. et al. Functional traits dominate the diversity-related selection of bacterial communities in the rhizosphere. **Nature Publishing Group**, p. 1–11, 2016.

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; GAN, Y. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **International Scholarly Research Network - Ecology**, v. 1, p. 1-8, 2011.

YANG, B.; XUE, Q.; CHEN, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, Y.; GUO, Z. Effects of microwave irradiation on isolation of soil actinomycetes. *Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology/Zhongguo sheng tai xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban*, v. 19, n. 5, p. 1091, 2008. [artigo em chinês]

YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. EFFECT OF FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.39, p.323-328, 2006.

YUAN, W. M.; CRAWFORD, D. L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 3119–3128, 1995.

ZADOKS, J.C., CHANG, T.T., KONZAC, C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPÉ, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E.J.; KELLER, M. Cultivating the uncultured, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15681-15686, 2002.

ZHAO, S.; DU, C.M.; TIAN, C.Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 28, n. 9, p. 2919-2927, Sept. 2012.