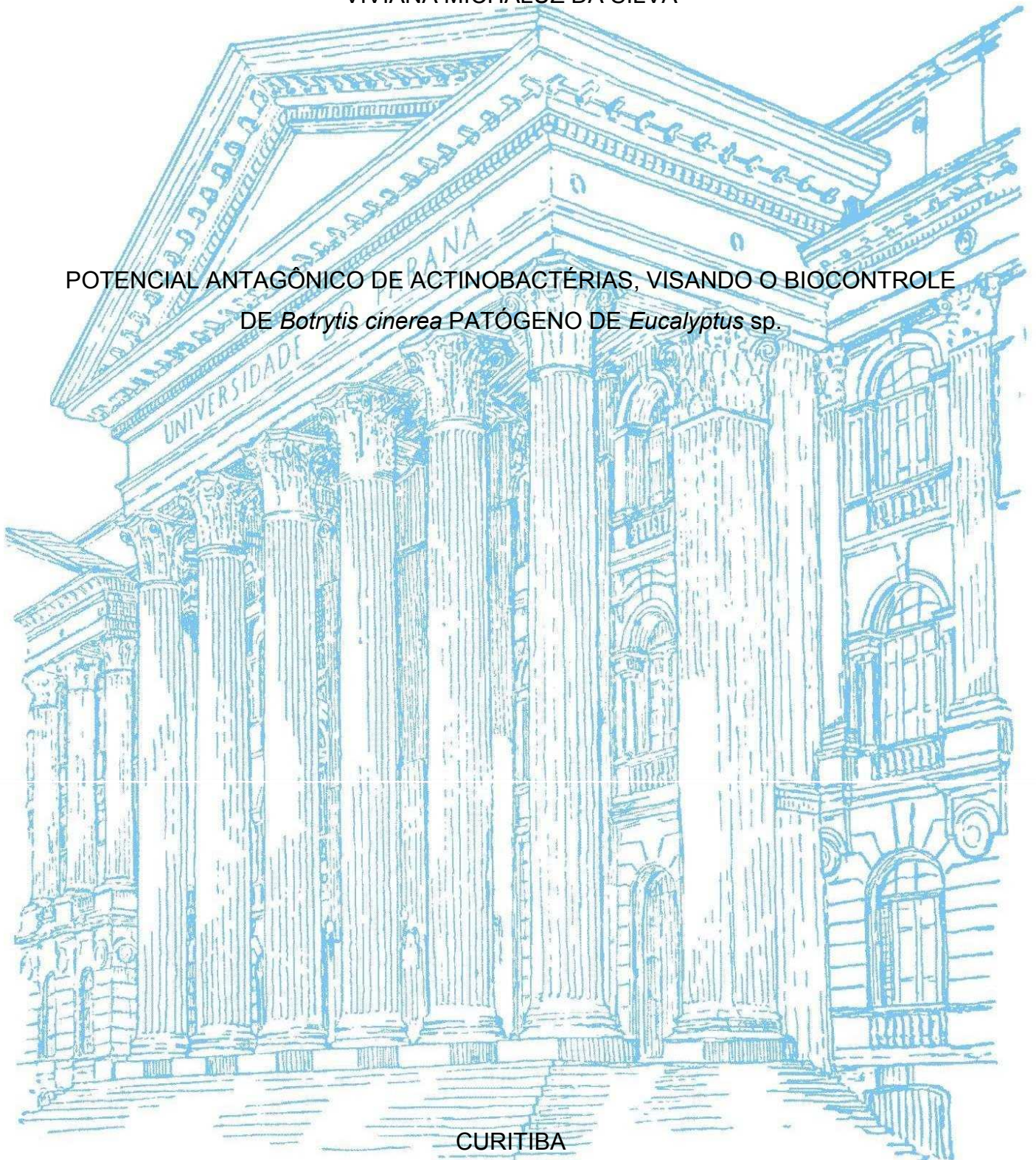


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIANA MICHALUZ DA SILVA

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ACTINOBACTÉRIAS, VISANDO O BIOCONTROLE  
DE *Botrytis cinerea* PATÓGENO DE *Eucalyptus* sp.



CURITIBA

2016

VIVIANA MICHALUZ DA SILVA

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ACTINOBACTÉRIAS, VISANDO O BIOCONTROLE  
DE *Botrytis cinerea* PATÓGENO DE *Eucalyptus* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ida Chapaval Pimentel  
Co- orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia do Rocio Dalzoto e Prof. Dr. Celso Garcia Auer

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Silva, Viviana Michaluz da  
Potencial antagonico de actinobactérias, visando o biocontrole de  
*Botrytis cinerea* patógeno de *Eucalyptus sp.* / Viviana Michaluz da Silva. –  
Curitiba, 2016.  
62 p.: il.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel.  
Coorientadores: Patrícia do Rocio Dalzoto e Celso Garcia Auer.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

1. Eucalipto. 2. Mofo (Botânica). 3. Pragas – Controle biológico. I.  
Título. II. Pimentel, Ida Chapaval. III. Dalzoto, Patricia do Rocio, 1972. IV.  
Auer, Celso Garcia. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia.

CDD (22. ed.) 583.766



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“Potencial antagonico de actinobactérias visando o biocontrole  
de *Botrytis cinerea*, patógeno de *Eucalyptus* sp.”**


por

**Viviana Michaluz da Silva**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos  
professores:**

  
**Prof.ª. Dr.ª. Ida Chapaval Pimentel – Presidente**

  
**Prof.ª. Dr.ª. Lucimeris Ruaro**

  
**Dr. Alvaro Figueredo dos Santos**

**Curitiba, 24 de março de 2016.**

Vocês deixaram seus sonhos para que eu sonhasse.

Derramaram lágrimas para que eu fosse feliz.

Perderam noites de sono para que eu dormisse tranquila.

Acreditaram em mim, apesar dos meus erros.

Eu vos levarei para sempre, um pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser.

Aos meus pais,  
Floriano Michaluz

e

Catarina do Carmo Costa Michaluz  
Com todo amor e gratidão, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade, respaldo e zelo durante esse tempo. Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

A professora Ida Chapaval Pimentel, que se mostrou mais do que uma orientadora. Que sempre consegue ver o lado positivo das coisas. Obrigada pelo apoio durante as fases difíceis e pela amizade. Pela alegria de trabalharmos juntas.

Ao pesquisador Dr. Celso Garcia Auer por ter me recebido na EMBRAPA, pela grande ajuda na condução dos ensaios, dicas e empenho em buscar mudas para realizar nossos ensaios.

A professora Patrícia do Rocio Dalzoto, por ter desde a graduação, me apoiado e acolhido nesta jornada na microbiologia.

A todos os professores da PPMPP, pelos valiosos conhecimentos transmitidos neste período.

A EMBRAPA Florestas pelo suporte a pesquisa realizada.

A todos os colegas do LabMicro. Em especial, Mari Porsani, Carol e Alex, pela parceria na realização dos experimentos.

Aos amigos de turma, Giane, PC, Cristiano, Edson e Maiara, pela parceria nos desesperos das matérias.

Aos meus grandes tesouros desses dois anos: Are, Lê, Lu e Madson. Os almoços sempre foram os melhores com vocês.

Agradeço aos meus amores: Meu pai Floriano, ao Teo, ao Nardo e a Catarina. Sem vocês nada disso teria sentido.

E a todas as pessoas que amo, obrigada!

"QUANDO O HOMEM APRENDER A RESPEITAR ATÉ O MENOR SER DA CRIAÇÃO,  
SEJA ANIMAL OU VEGETAL, NINGUÉM PRECISARÁ ENSINÁ-LO A AMAR SEU SEMELHANTE "  
Albert Schweitzer (Nobel da Paz de 1952)

## RESUMO

O gênero *Eucalyptus* se destaca pela sua importância econômica na produção florestal de madeira para os mais diversos fins. Na produção de mudas de *Eucalyptus* sp., uma das principais doenças ocorrentes em viveiros é o mofo-cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*. O uso de fungicidas no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos, além de ter um alto custo, ocasiona problemas ao meio ambiente e ao homem, determinando graves danos à biota natural do solo, além de contribuir através de seleção genética para o desenvolvimento da resistência microbiana. Uma das alternativas para o controle dessa doença é o controle biológico por actinobactérias ou utilizando seus metabólitos secundários. O objetivo da pesquisa foi avaliar a atividade antagônica de isolados de actinobactérias no controle do fungo *B. cinerea* isolado de *Eucalyptus dunnii*. Os testes foram realizados em duas etapas: *in vitro* e *in vivo*. Na primeira etapa o experimento foi realizado por meio do teste de inibição. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 20 tratamentos e 5 repetições. O isolado AS G34 3B 18 – *Streptomyces variabilis* destacou-se significativamente inibindo o crescimento micelial de *B. cinerea*. Posteriormente, foram realizados testes de folha destacada, que confirmaram a presença de *S. variabilis* em folha de eucalipto até 28 dias após pulverizações seguidas do fitopatógeno. Também foram realizadas testes nos quais constatou-se ausência de actinobactéria em microbiota de *Eucalyptus dunnii*. Os testes *in vivo* apontaram que *S. variabilis* apresentou melhores condições de controle da doença, quando em maiores quantidades de pulverizações. As avaliações de biomassa seca demonstraram que as mudas submetidas aos tratamentos com pulverizações de *S. variabilis* exibiram valores significativamente maiores de biomassa seca do que as tratadas com iprodione.

Palavras-chave: Eucalipto. mofo-cinzento. Controle Biológico. *Streptomyces variabilis*.

## ABSTRACT

The Eucalyptus stands out for its economic importance in forest production of wood for various purposes. In the production of seedlings of *Eucalyptus* sp., one of the main diseases occurring in nurseries is gray mold, caused by the fungus *Botrytis cinerea*. The use of fungicides to control diseases caused by phytopathogenic fungi, besides having a high cost, causes problems to the environment and to humans, causing serious damage to the natural soil biota and contribute by genetic selection for the development of microbial resistance. One of the alternatives for the control of this disease is the biological control by actinomycetes or using their secondary metabolites. The objective of the research was to evaluate the antagonistic activity of actinomycetes isolates in the control of the fungus *B. cinerea* isolated Eucalyptus *dunni*. The tests were performed in two stages: in vitro and in vivo. In the first stage the experiment was carried out through the inhibition test. The experimental design was completely randomized, with 20 treatments and 5 repetitions. The Isolated AS G34 3B 18 - *Streptomyces variabilis* stood out significantly inhibiting the mycelial growth of *B. cinerea*. Later, detached leaf tests were performed, which confirmed the presence of *S. variabilis* in eucalyptus leaf up to 28 days after spraying. Also were conducted tests that found no actinobacterias in microbiota of *Eucalyptus dunni*. *In vivo* tests showed that *S. variabilis* showed better disease control conditions, when in larger amounts of spray. The dry biomass assessments showed that the seedlings submitted to treatments with *S. variabilis* sprays exhibited significantly higher values of dry biomass than those treated with iprodione.

Keywords: Eucalyptus. gray mold. Biological Control. *Streptomyces variabilis*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1	<i>Eucalyptus</i> sp. ....	14
3.2	MOFO-CINZENTO OU <i>Botrytis cinerea</i> .....	15
3.3	CONTROLE BIOLÓGICO .....	18
3.4	ACTINOBACTÉRIAS .....	20
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	23
4.2	TESTE DE INIBIÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>B. cinerea</i> .....	24
4.3	TESTE DE SOBREVIVÊNCIA DE ACTINOBACTÉRIA EM FOLHAS DE <i>E. dunni</i> .....	25
4.4	ISOLAMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS EM FOLHAS DE MUDAS DE <i>E. dunni</i> .....	26
4.5	TESTE DE PATOGÊNCIDADE COM ACTINOBACTÉRIA EM MUDAS DE <i>E. dunni</i> .....	26
4.6	TESTE DE ANTAGONISMO <i>IN VIVO</i> DE ACTINOBACTÉRIA EM MUDAS DE <i>E. dunni</i> .....	27
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
5.1	TESTE DE INIBIÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>B. cinerea</i> .....	31
5.2	TESTE DE SOBREVIVÊNCIA DE ACTINOBACTÉRIA EM FOLHAS DE <i>E. dunni</i> .....	35
5.3	TESTE DE PATOGENICIDADE COM <i>S. variabilis</i> EM MUDAS DE <i>E. dunni</i> .....	39
5.4	AVALIAÇÃO DO CONTROLE – <i>S. variabilis</i> x <i>B. cinerea</i> .....	40
5.5	BIOMASSA SECA .....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSOES</b> .....	50
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
	<b>ANEXOS - 1 MEIO DE CULTURA UTILIZADOS</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário mundial por possuir um excelente desempenho no setor florestal e ser um dos líderes no *ranking* de exportadores do mercado internacional de produtos florestais. A área de árvores plantadas para fins industriais no Brasil totalizou 7,8 milhões de hectares em 2015, deste, 5,6 milhões de hectares são plantios de *Eucalyptus*. Em 2014, o Produto Interno Bruto (PIB) do setor brasileiro de árvores plantadas foi de R\$ 69,1 bilhões reais, gerando cerca de 640 mil empregos de forma direta. Números que tornam incontestável a importância econômica e socioambiental do setor de florestas plantadas para o país (IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores, 2016).

As espécies de eucalipto comercialmente cultivadas estão sujeitas a uma série de doenças fúngicas. Em viveiros florestais, em função da umidade, juvenildade e proximidade das mudas, existem condições favoráveis ao desenvolvimento de várias doenças, como tombamento de mudas, mofo-cinza, oídio, podridão de estacas, ferrugem e manchas foliares (GRIGOLETTI JUNIOR; FIGUEIREDO; AUER 2001).

Dentre as doenças que afetam o eucalipto, especialmente na fase juvenil de viveiros, destaca-se o mofo cinza, causado por *Botrytis cinerea*. Essa doença caracteriza-se pela morte das mudas em reboleiras ou distribuída aleatoriamente nos canteiros, com abundante esporulação de coloração cinza sobre as estacas e miniestacas mortas, folhas e brotações. Os esporos produzidos sobre as lesões constituem importante fonte de inóculo em epidemias, os quais são facilmente disseminados pelo vento e pela água de irrigação (KRUGNER; AUER, 2005).

O controle das doenças de mudas de eucaliptos em viveiros é feito basicamente pelo uso de controle químico, manejo cultural e utilização de genótipos resistentes. Inúmeras são as desvantagens no uso de agrotóxicos, dentre elas: o alto custo, o impacto ambiental na fauna e na flora, a destruição dos lençóis freáticos, a seleção de microrganismos resistentes, a baixa eficiência e o impacto na saúde humana. Dentro deste cenário, o investimento no controle biológico é ferramenta promissora na resolução desses problemas (PAZ, 2009).

As actinobactérias são microrganismos amplamente utilizados no controle biológico contra os mais diversos tipos de patógenos, nos mais variados

hospedeiros. A ação antagônica de alguns desses microrganismos, capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, indica-os como uma alternativa a ser pesquisada para a obtenção de produtos agrícolas isentos de doenças. As actinobactérias são responsáveis pela produção de aproximadamente 4.600 antibióticos, sendo as do grupo *Streptomyces* é o maior produtor de antibióticos (LIMA *et al.*, 2001). Entre as substâncias produzidas por *Streptomyces* com ação inibidora contra fungos, destacam-se: streptomina, clorotetraciclina e terramicina (CHARTER, 2006).

Desta forma neste estudo, a investigação do potencial inibitório de actinobactérias isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR sobre *Botrytis cinerea* agente etiológico do mofo-cinzento em *Eucalyptus dunni* pode contribuir com o controle deste importante fitopatógeno.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial de controle biológico de actinobactérias, isoladas da região entre-marés de Paranaguá, PR; contra *Botrytis cinerea* *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de actinobactérias no controle do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* *in vitro*;
- Avaliar a progressão e inibição da doença causada por *Botrytis cinerea* frente à actinobactéria em mudas de *Eucalyptus dunnii*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Eucalyptus* sp.

O eucalipto pertence à família das Mirtáceas, nativa da Austrália, do Timor, da Indonésia, das Filipinas e de Nova Guiné, considerada umas das árvores mais plantadas do mundo (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011). Existem mais de 600 espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* (L'Herit), e, entre as principais espécies plantadas para fins comerciais, estão o *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. deglupta*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. paniculata* e *E. robusta*. (DEL QUIQUI; MARTINS; SHIMIZU, 2001).

O cultivo do eucalipto fora da Austrália iniciou-se há mais de 200 anos. Atualmente tem sido cultivado em vários países em razão da grande diversidade de espécies e de usos, elevada taxa de crescimento, capacidade de regenerar-se por brotação e ser manejado em várias rotações. A sua adaptabilidade em várias regiões bioclimáticas e geração de matéria-prima, atende a vários setores da cadeia produtiva da madeira (SCHULTZ, 2012).

A demanda por madeira e a competição de mercados estimulam a busca de alternativas para o aumento da produtividade dos plantios de *Eucalyptus* sp. (CUNHA *et al.*, 2006). Sendo utilizada para fins de produção de papel e celulose, energia, madeira para serraria, tecido sintético, óleo essencial usado em produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e remédios (BERTOLA, 2004).

O Brasil é um dos líderes na exportação do mercado internacional de produtos florestais, conquistando posição e ganhando competitividade de países tradicionais no ramo da celulose, como Finlândia e Suécia (VALVERDE *et al.*, 2004). A produtividade do eucalipto no Brasil cresceu por volta de 0,3% ao ano, entre 2008 e 2014. Mantendo a liderança frente à países como: Estados Unidos, África do Sul, Chile, Austrália e China (IBÁ, 2015).

Apesar do rápido crescimento e da alta produtividade de várias espécies de eucaliptos, existem custos ecológicos que devem ser considerados. Algumas espécies de eucaliptos são vulneráveis ao surgimento rápido de pragas, ocorrendo nos mais variados locais e épocas do ano. Ocasionalmente por diversos patógenos,

principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. (GRIGOLETTI JUNIOR; AUER; SANTOS, 2001).

### 3.2 MOFO- CINZENTO OU *Botrytis cinerea*

Os fungos de gênero *Botrytis* são pleomórficos, caracterizados por apresentar fase teleomórfica denominada *Botryotinia fuckeliana* e anamórfica *Botrytis cinerea* (ACERO *et al.*, 2006). Como regra geral, a taxonomia recomenda o uso do nome correspondente ao estado sexual como nome científico. Neste caso o agente etiológico do mofo-cinzento deveria ser *Botryotinia fuckeliana*. No entanto, em 1992, no “X *International Botrytis Symposium*” realizado na Grécia, devido à designação *B. cinerea* ser amplamente reconhecida e por raras vezes ser possível encontrar o estágio telemorfo na natureza, os cientistas decidiram manter o uso do nome do estágio anamorfo, *Botrytis cinerea* (VALLEJO *et al.*, 2002).

*Botrytis cinerea*, portanto é um ascomiceto e sua posição taxonômica de acordo com o *Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries* (2014) pertence ao Reino Fungi, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Leotiomycetes*, ordem *Helotiales*, família *Sclerotiniaceae*, gênero *Botryotinia*, espécie *Botrytis cinerea*.

Os fitopatógenos do gênero *Botrytis* são os causadores da doença conhecida como “mofo-cinzento”. Provavelmente é a doença mais comum e mais amplamente distribuída em culturas agrícolas, ornamentais e frutíferas pelo mundo, além de ser a doença mais importante em cultivos protegidos por estufas (AGRIOS, 1988). É um patógeno facultativo que vive saprofiticamente no solo e sobrevive na forma de esclerócios ou micélio dormente. Sua disseminação dá-se principalmente pelo transporte dos conídios pelo vento e por insetos (KRUGNER; AUER, 2005; FURTADO *et al.*, 2009). Epidemias de mofo-cinzento são esporádicas, no sudoeste da China, em 1992, *B. cinerea* causou a morte de cerca de um milhão de propágulos, incluindo plântulas, estacas e explantes, em viveiros de eucalipto (BROWN; FERREIRA, 2000).

*B. cinerea* apresenta crescimento e esporulação abundantes em temperaturas moderadas (15°C até 25°C) e elevada umidade, sendo ativo desde 0°C, tornando-se um patógeno importante durante o armazenamento de produtos e um desafio para o manejo da doença. (ELAD; STEWART, 2007). Esse fungo produz

abundante crescimento acinzentado sobre os tecidos afetados, composto por hifas e conidióforos ramificados que possuem no ápice conídios unicelulares, ovóides, incolores ou acinzentados. Também produz escleródios negros, duros e irregulares em tecidos infectados ou mortos pela doença. Os escleródios podem produzir conídios e hifas infectivas que podem penetrar diretamente no hospedeiro (TOFOLI *et al.*, 2011).

O ciclo de vida inicia-se com a germinação de escleródios ou dos conídios depositados diretamente na superfície da planta hospedeira, inicialmente desenvolve-se um micélio saprofito superficial, mas em seguida, pode invadir os tecidos suscetíveis (CIAMPI; GONZALEZ; SCHNETTELER, 1993). Após a penetração, o patógeno coloniza rapidamente os tecidos e apresenta ampla esporulação dando origem a outros ciclos da doença. Normalmente *B. cinerea* coloniza primeiramente tecidos mortos, senescentes ou enfraquecidos, que servem como uma fonte exógena de energia para que o patógeno possa se estabelecer, reproduzir e assim iniciar a colonização de tecidos sadios (TOFOLI *et al.*, 2011).

Seu crescimento é rápido, ocorre nos mais diversos tipos solos e possui a flexibilidade de crescer em diferentes fontes de nutrientes (MOORMAN, 2014). *Botrytis cinerea* pode infectar mais de 235 espécies diferentes de plantas, dentre elas, uma enorme variedade de plantas ornamentais, culturas de frutas e legumes e vegetais. As estruturas danificadas são variadas, e dependem do hospedeiro e do órgão afetado, podendo ser folhas, pecíolos, caule, botões florais e pétalas. Apesar dos sintomas do mofo-cinzento variar em função do hospedeiro e do órgão afetado, estes são quase sempre caracterizados pela descoloração dos tecidos, aspecto úmido e necrótico das lesões e presença de um crescimento cotonoso acinzentado (conídios e conidióforos) sobre as áreas afetadas. O mofo-cinzento causa prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos, tornando o controle difícil em condições onde se observa falta de rigor técnico na condução do cultivo e em condições meteorológicas favoráveis à doença (TOFOLI *et al.*, 2011).

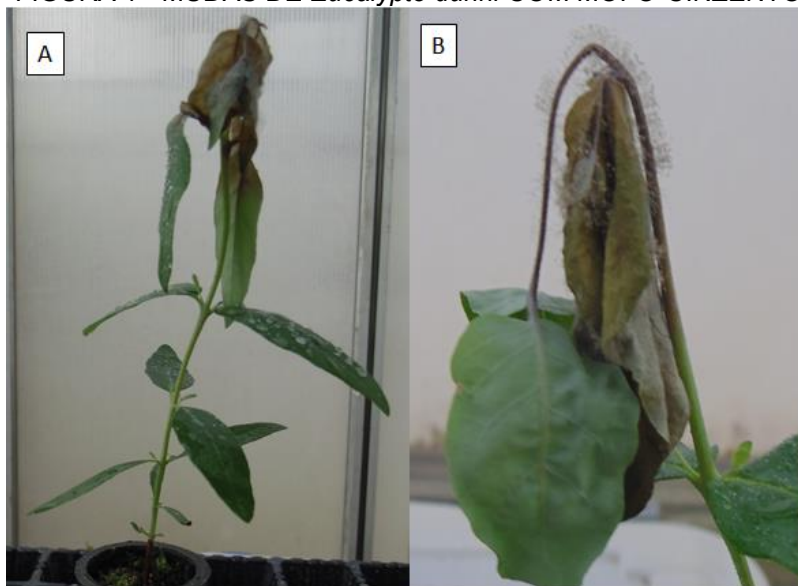
O mofo-cinzento é uma das principais doenças em viveiros florestais e casas de vegetação de eucalipto na região Sul do Brasil (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 2001), causa o tombamento de plântulas e mudas (ALFENAS *et al.*, 2009), e também pode atacar árvores jovens (FURTADO *et al.*, 2009). A doença tem sido mais frequente em viveiros localizados nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio

Grande do Sul, principalmente no inverno, ocasionando perdas que podem chegar de 8 a 17% (SANFUENTES; FERREIRA, 1997).

O tombamento de mudas é uma doença de importância limitada a viveiros de eucalipto e outras essências florestais. Em sementeiras para produção de mudas, que serão repicadas para recipientes, a ocorrência de ataques severos é maior que em mudas formadas pela semeadura direta em recipientes. Como a doença, invariavelmente resulta na morte das mudas, os prejuízos se traduzem na redução do 'stand' de mudas plantáveis, podendo causar atrasos no programa de plantio pela falta de mudas e exigir mobilização de maior área de canteiros para atender às necessidades de plantio (FERREIRA, 1989).

Os ataques mais severos ocorrem em canteiros com alta densidade de mudas em condições de alta umidade do ar e temperaturas amenas. A doença afeta tecidos jovens da parte aérea das mudas, causando a morte do ápice ou até mesmo da muda toda, especialmente de mudas jovens. Os sintomas iniciam-se por um enrolamento das folhas seguido de seca e queda das mesmas. Comumente, cobrindo as partes afetadas da planta aparece um crescimento acinzentado formado por micélio, conidióforos e massa de conídios do fungo (KRUGNER; AUER, 2005) (FIGURA 1). O fungo sobrevive nas folhas secas e nos restos da cultura infectados deixados no solo. Igualmente, pode sobreviver em qualquer resíduo vegetal das diferentes plantas hospedeiras do patógeno (AGROFIT, 2015).

FIGURA 1 - MUDAS DE *Eucalypto dunnii* COM MOFO-CINZENTO



NOTA: A) estágio avançado da doença. B) detalhe da esporulação de *B. cinerea*. FONTE: O autor (2015).

As perdas na produção de mudas de *Eucalyptus* sp. causadas por patógenos giram em torno de 1% ao mês, quando não ocorrem surtos epidêmicos que podem levar a perdas de até 100% do material propagativo (ALFENAS *et al.*, 2009).

Em 1992, no sul da China na província de Guangxi, *B. cinerea* causou a perda de aproximadamente um milhão de mudas de eucaliptos em viveiro. No inverno de 1990 e 1991, a doença causou severas perdas na província de Yaunnan (KEANE *et al.*, 2000 *apud* ZHOU DEQUN; SUTHERLAND, 1991). Segundo Gonçalves e Poggiani (1996), a produção de mudas florestais deve preconizar a quantidade e qualidade, já que é uma das fases mais importantes para o estabelecimento de povoamentos florestais, com grande repercussão sobre a produtividade.

### 3.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico foi definido por Baker e Cook (1974) como:

A redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocado por um patógeno ou parasita, nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1974, p. 43).

Basicamente, o controle biológico pode ser definido como a regulação de uma espécie dentro de certos limites e por um período de tempo, por qualquer combinação de fatores naturais bióticos ou abióticos (DIEHL; FERLA; JOHANN 2012).

O controle de *Botrytis* sp. não é fácil por várias razões, dentre elas: ser capaz de infectar culturas vegetais em qualquer estágio de desenvolvimento, incluindo a pós-colheita; capacidade de infectar qualquer órgão da planta; crescer em temperaturas muito baixas e; é geneticamente e morfológicamente heterogêneo (PERRYMAN; FITT; HAROLD, 2002). O controle é feito através do manejo, como redução da densidade das mudas no viveiro, dosagem correta de adubos nitrogenados e a retirada das folhas infectadas das plantas e as caídas no solo. Além do manejo, o controle químico pode ser feito com pulverizações com

fungicidas protetores, como thiram, maneb, captan, acetato de trifenil estanho, iprodione ou vinclozilin (AGROFIT, 2015).

Um dos grandes problemas do uso de defensivos em casas de vegetação é o manuseio diário dos viveristas para produção de mudas de eucalipto. Com isso, há uma grande preocupação e uma demanda do setor florestal por produtos que sejam menos tóxicos aos trabalhadores, ambiente e ao mesmo tempo eficiente no controle dos fitopatógenos (SILVA *et al*, 2016). O uso de produtos químicos no combate as doenças causadas por fungos fitopatógenos como *Botrytis*, além de ter um alto custo, ocasiona problemas ao meio ambiente e ao homem, determinando graves danos à biota natural do solo, atingindo e contaminando águas superficiais e subterrâneas, além de contribuir para o desenvolvimento da resistência microbiana. Segundo Guerra (1997), a contaminação das águas superficiais por fertilizantes e agrotóxicos que são usados para gerenciar as plantações de eucaliptos é em média de 200 kg/hectare.

O uso exacerbado de agrotóxicos além de prejudicar o ambiente, favorece o aparecimento de linhagens de patógenos resistentes aos elementos ativos destes produtos (CAPIEAU; STENLIND; STENSTRÖM, 2004). No Brasil, muitos pesquisadores observaram a resistência de *B. cinerea* em estudos feitos com morango, eucalipto, rosa, berinjela, crisântemo, batata, violeta, begônia, pimenta, maçã e uva (PINOTTI; SANTOS, 2013 *apud* GHINI; KIMATI, 2002). Silva e Coelho (2003) constataram a resistência desse patógeno aos fungicidas sistêmicos benomil, procimidone e thiabendazole. Também foi comprovada a resistência de *B. cinerea* frente aos fungicidas a base de Piraclostrobina, Tiofanato-metilico, Fenehexamida e Boscalide (AMIRI *et al.*, 2014).

A pressão da sociedade por produtos livres de agroquímicos tem exigido dos pesquisadores e da indústria, maior empenho em programas de controle biológico. Práticas de manejo que favoreçam o desenvolvimento de antagonistas nativos, bem como a introdução de microrganismos selecionados, são estratégias que podem ser utilizadas no controle biológico de fitopatógenos (CHOUDHURY, 2001).

Neste contexto, o manejo de doenças de plantas por meio do controle biológico é uma alternativa agroecológica que contribuíram para a substituição do uso de fungicidas químicos tradicionalmente utilizados (GUIMARÃES; DAL SOGLIO, 2007). O controle biológico, por meio do uso de microrganismos antagonistas, vem sendo amplamente investigado visando melhorar a eficiência de controle do mofo-

cinzento, causado por *B. cinerea* em frutas, vegetais e plantas ornamentais (YOHALEM, 2004; SUTTON *et al.*, 1997), além de ser uma forma de controle que evita os riscos ocupacionais associados à exposição dos trabalhadores aos fungicidas e de resíduos destes nos produtos colhidos e no ambiente (SUTTON *et al.*, 1997).

A diversidade de microrganismos, bem como suas relações antagônicas, surgem como ferramentas importantes para o controle biológico (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Entre os microrganismos com potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos, destacam-se o grupo das actinobactérias, reconhecidos como os principais produtores de inúmeros metabólitos secundários, principalmente os antibióticos, com seu amplo espectro de ação em relação à célula alvo e atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais (ZAGO; DE-POLLI; RUMJANEK, 2000; MIYAUCHI, 2012; ROMEIRO, 2007). Muitos estudos apontam o uso de microorganismos no controle biológico para inibir o desenvolvimento de *B. cinerea*, mas apenas alguns produtos biológicos, tais como Serenade (AgraQuest Inc., Davis, CA) e Trichodex 20P (Makhteshim Ltd., Be'er Sheva, Israel) tem atingido o mercado, e nenhum deles baseiam-se em estirpes de actinobactérias (PAULITZ; BÉLANGER, 2001). Bettioli e colaboradores (2012) realizaram um levantamento e disponibilizaram a comunidade uma relação de produtos biológicos comercializados em algumas regiões do mundo. Entre os produtos biológicos baseados em Actinobactérias, foram citados Actinovate (Natural Industries, Texas, EUA) e Mycostop (Verdera Oy, Espoo, Finlândia), sendo o primeiro recomendado para o uso no controle biológico de mofo-cinzento causado por *B. cinerea*.

### 3.4 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias, também denominadas actinomicetos, eram classificadas como fungo, por compartilharem algumas características com esse grupo, tais como formação de hifas e esporos de disseminação. Contudo, a ausência de núcleo, a presença de flagelo, a falta de esteróis na parede celular, a sensibilidade a antibióticos antibacterianos, dentre outras características, as reclassificaram como pertencentes ao domínio Bacteria (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967).

Actinobactérias são bactérias filamentosas gram-positivas pertencentes ao filo Actinobacteria com 6 classes, 5 subclasses, 25 ordens, 14 subordens, 52 famílias e 232 gêneros. É um dos maiores grupos taxonômicos entre as 18 linhagens conhecidas dentro do domínio bacteriana (STACKEBRANST; SCHUMANN, 2000). Sua posição taxonômica de acordo com o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2005), pertence ao Domínio Bactéria, filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*.

As actinobactérias estão amplamente distribuídas em diferentes ecossistemas e podem colonizar diversos substratos (ARAÚJO, 1998). São uma classe heterogênea de bactérias, superficialmente sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos, pois formam hifas multinucleadas que se ramificam formando um micélio. Também são capazes de produzir cadeias de esporos semelhantes aos conídios. Possuem um alto teor de G+C no seu DNA, chegando até 70% em algumas espécies (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (LACAZ *et.al.*, 2002).

De distribuição mundial, são encontradas nos mais variados ecossistemas, principalmente no solo. Vivem em sua maioria como saprófitos, exercendo um importante papel biológico como o da reciclagem de biomateriais, enquanto outras estão em relação mutualística ou parasita com plantas (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Cerca de 70% a 80% dos antibióticos descobertos na chamada “Era de ouro” nos anos 50 e 60, foram isolados de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Até o final de 2002 mais de 22.000 compostos bioativos foram obtidos de microrganismos, destes 45% foram produzidos por actinobactérias (BÉRDY, 2005). Esses metabólitos secundários são de interesse biotecnológico, dentre eles: amilases, celulasas, lipases, pectinases, quitinases, xilanasas, peroxidases, vitaminas do complexo B, fitormônios, agentes antitumorais e agentes imunodepressivos (MIYAUCHI, 2012). Ainda, como produto do metabolismo secundário destes procaríotos, ocorre a produção de antibióticos que podem atuar no controle de fitopatógenos (ZAGO; DE-POLLI; RUMJANEK, 2000). A produção dessas substâncias pelas actinobactérias tornam-as fortes candidatas a agentes no biocontrole de fitopatógenos em plantas. Existem vários produtos utilizados comercialmente no controle de pragas, feitos a partir de actinobactérias (KIM; LEE; YUN, 2015).

A literatura apresenta uma vasta gama de agentes patogênicos controlados por actinobactérias incluindo *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Plectosporium tabacinum oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* e *Colletotrichum orbiculare* (KRECHEL *et al.*, 2002). Conn, Walker e Franco (2008) inocularam em sementes de *Arabidopsis thaliana*, duas estirpes de *Streptomyces*, e observaram um aumento da resistência nas folhas da planta contra os agentes patogênicos *Erwinia carotovora* e *Fusarium oxysporum*.

Estudos promissores realizados por El-Tarabily e Nassar (2009), demonstraram que actinobactérias endofíticas foram capazes de colonizar raízes de pepino por oito semanas e suprimir a atividade fitopatogênica de *Pythium aphanidermatum*. Legitimando como actinobactérias, podem apresentar um eficiente controle sobre fitopatógenos, podendo até substituir fungicidas químicos. Também em estudos realizados por Miyauchi (2012), actinobactérias foram eficazes no biocontrole da atividade do fungo *Fusarium* sp., reduzindo a mortalidade de plântulas de *Pinus* spp. em cerca de 25%. Porsani *et al* (2013) isolaram 116 actinobactérias do gênero *Nocardia* e *Streptomyces* da região entre-marés da Ilha do Mel, PR e destas 79 apresentaram a capacidade antimicrobiana contra as cepas patogênicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Chamberlian e Crawford (1999) atestaram a capacidade de dois isolados do gênero *Streptomyces*, no antagonismo de vários agentes fitopatogênicos de gramíneas, dentre eles: *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Gaeumannomyces graminis* e *Microdochium nivale*.

Devido aos múltiplos metabólitos produzidos pelas actinobactérias e variados mecanismos de controle, esses microrganismos podem inibir ou causar a morte de patógenos resistentes a defensivos químicos, e ainda limitar a habilidade dos patógenos desenvolverem resistência (ROBERTS; CRAWFORD, 2000). Com base nesses pressupostos, neste trabalho, avaliou-se *in vitro* e *in vivo* a atividade inibitória de actinobactérias isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, sobre o fungo *Botrytis cinerea* isolado de mudas de *Eucalyptus dunni*, no intuito de atestar a capacidade de biocontrole de actinobactérias frente ao agente causal do mofo-cinzento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no período de março de 2014 a novembro de 2015, no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Universidade Federal do Paraná e em casa de vegetação da Embrapa Florestas, localizados nas cidades de Curitiba e Colombo, PR, respectivamente.

O trabalho foi dividido em duas partes: *in vitro* e *in vivo*. Nos experimentos *in vitro*, buscou-se selecionar a actinobactéria de melhor desempenho em relação à porcentagem de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*. Então, elucidar se a actinobactéria eleita seria capaz de se manter na microbiota da folha de eucalipto. Já nos experimentos *in vivo*, as avaliações seguiram conforme a escala de severidade, avaliação da porcentagem de controle e biomassa seca.

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O isolado do fitopatógeno *Botrytis cinerea* (acesso Genbank: KU291996), foi proveniente de mudas doentes de *Eucalyptus dunnii* da empresa Golden Tree Reflorestadora LTDA, localizada na cidade de Guarapuava - PR.

Os isolados de actinobactérias, obtidos anteriormente por Porsani *et al.*, (2013), da região entre-marés da Ilha do Mel - PR, são provenientes do banco biológico Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UFPR (LabMicro), localizado na cidade de Curitiba-PR. Foram utilizados 20 isolados de actinobactérias selecionados, os quais apresentaram atividade antimicrobiana já relatada (PORSANI *et al.*, 2013) (TABELA.1).

TABELA 1 – ACTINOBACÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR  
(continua)

Isolado	Identificação molecular	Acesso Genbank
AS G31 5A 43	<i>Streptomyces bacillaris</i>	JX997140
AS G34 3B 18	<i>Streptomyces variabilis</i>	JX997143
AS 3A 26	<i>Streptomyces cavourensis</i>	JX997143
AD G27 12B 83	<i>Streptomyces parvus</i>	JX997139
AD 11B 76	<i>Streptomyces cavourensis</i>	X997147
AD G32 11A 60	<i>Streptomyces seoulensis</i>	JX997141
AD 3B 17	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	JX997148
AD G34 12B 82	<i>Streptomyces malachitospinus</i>	JX997142
AD G35 3B 14	<i>Streptomyces puniceus</i>	KJ155505

TABELA 1 – ACTINOBACÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR  
(conclusão)

Isolado	Identificação molecular	Acesso Genbank
AD G35 3A 29	<i>Streptomyces puniceus</i>	KJ155506
AD 3A 26	<i>Streptomyces aureus</i>	KJ155507
AD G31 3A 69	<i>Streptomyces globisporus globisporus</i>	KJ155508
AS G32 3A 74	não identificado	----
AD G35 13A 15	não identificado	----
AD G31 3A 19	não identificado	----
AD G32 4A 29	não identificado	----
AD G33 2A 16	não identificado	----
AD G 35 3A 90	não identificado	----
AD G35 3A 40	não identificado	----
AD G35 3A 41	não identificado	----

FONTE: O autor (2015).

#### 4.2 TESTE DE INIBIÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *B. cinerea*

Para avaliar a inibição de *B. cinerea* pelas actinobactérias, foi realizado teste de inibição, adaptado de Beux (2004). Foram utilizados 20 isolados de actinobactérias, obtidos por Porsani *et al.* (2013), da região entre-marés da Ilha do Mel, PR. Para cada isolado foi feita uma suspensão salina contendo  $3 \times 10^8$  células/mL<sup>-1</sup> de actinobactéria, padronizadas de acordo com a escala McFarland nº 1, cultivadas em meio Sabouraud (ANEXO 1.1) durante 5 dias à 27 °C, sem fotoperíodo. Foram espalhadas em uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro, também em meio Sabouraud, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, foi retirado um bloco de 6 mm de diâmetro do centro da placa, e inserido outro bloco contendo uma cultura de *Botrytis cinerea* crescida por 5 dias em seu lugar. Após esse procedimento, a cultura foi incubada por 14 dias à 25 °C em BOD, fotoperíodo de 12 horas.

O controle consistiu em um bloco de 6 mm de diâmetro de *B. cinerea* no centro da placa contendo meio Sabouraud. As placas foram mantidas em câmara BOD à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram feitas com 7 e 14 dias de incubação, determinando o diâmetro do crescimento do patógeno, por meio de uma régua milimetrada.

Para definir a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno, mediu-se o diâmetro das colônias, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial e calculada de acordo com Edginton *et al.*, (1971), pela fórmula:

$$(PI\%) = \frac{(Dc-Dt)}{Dc} \cdot 100, \text{ onde:}$$

PI% = porcentagem de inibição;

Dc = diâmetro médio da colônia de controle de *B. cinerea*;

Dt = diâmetro médio da colônia de *B. cinerea* crescida na placa contendo actinobactéria.

#### 4.3 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA DE ACTINOACTÉRIA EM FOLHAS DE *E. dunni*

O objetivo desse experimento foi verificar a capacidade da actinobactéria em sobreviver no tecido foliar de *E. dunni*, sem nenhuma fonte de nutriente adicional, este teste foi adaptado de Ronseaux, Clément e Barka (2013). O teste foi realizado em placas de Petri contendo um disco de papel filtro, ambos previamente esterilizados. Sobre a folha de papel filtro, colocaram-se duas folhas jovens de *E. dunni*, coletadas do ápice de mudas produzidas em casa de vegetação, com três meses de idade. O pecíolo foi envolto por algodão umedecido com água esterilizada. As folhas não passaram por nenhum processo de desinfestações ou desinfecções, apenas foram lavadas superficialmente com água destilada autoclavada. Foram estabelecidas cinco repetições por tratamento.

A suspensão de actinobactéria foi pulverizada com 1 mL de solução  $0,2 \times 10^8$  células/mL<sup>-1</sup> por placa, ou seja, 1 mL para cada duas folhas em ambas as faces das folhas de *E. dunni*. O controle consistiu na pulverização de 1 mL de água destilada autoclavada. As folhas permaneceram em BOD na temperatura de 25°C por até 28 dias, fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi dividido em três grupos:

Grupo 1: Uma pulverização no primeiro dia. Avaliações realizadas com 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a primeira pulverização.

Grupo 2: Duas pulverizações, uma no primeiro e a segunda com 7 dias. Avaliações realizadas com 14, 21 e 28 dias após a primeira pulverização.

Grupo 3: Três pulverizações, uma no primeiro, a segunda com 7 dias e a terceira com 14 dias. As avaliações foram realizadas com 21 e 28 dias após a primeira pulverização.

Para todos os testes foram feitos grupos controles, os quais foram pulverizados 1 mL de água destilada por placa.

As avaliações dos testes consistiam em retirada de dois discos foliares de cada folha e inseridos em uma placa contendo meio Czapeck Dox (ANEXO 1.2). Após quatro dias fez-se a avaliação para a determinação do crescimento de actinobactéria e caso o crescimento se apresentasse positivo, foi realizado o isolamento e a identificação da actinobactéria por coloração de Gram (GRAM, 1884).

#### 4.4 ISOLAMENTO DE ACTINOACTÉRIAS EM FOLHAS DE MUDAS DE *E. dunnii*

Foram coletadas aleatoriamente folhas e fragmentos do caule de 8 mudas sadias de *E. dunnii*, com três meses de idade. A desinfestação foi feita superficialmente com água destilada autoclavada. Os fragmentos foram inoculados em meio seletivos para actinobactérias, ACA e ISP-2 (ANEXOS 1.4 e 1.5). Para evitar o crescimento de fungos no meio, foram adicionados 100 µg/ml de cicloheximina e nistatina aos meios seletivos. As placas foram cultivadas a 28 °C por até 30 dias. O plaqueamento foi realizado em triplicata. À medida que as colônias de endofíticas e/ou epifíticas surgiram nos fragmentos das folhas, essas foram sendo transferidas para novas placas contendo os mesmos meios e posteriormente submetidas à coloração de Gram, a fim de visualizar a microestrutura.

#### 4.5 TESTE DE PATOGÊCIDADE COM ACTINOACTÉRIA EM MUDAS DE *E. dunnii*

Para este ensaio foram utilizadas dez mudas sadias, com três meses de idade, vigorosas e uniformes em altura e número de folhas, que foram distribuídas em caixas plásticas (40 x 60 x 35 cm). Uma camada aproximada de 10 cm de vermiculita expandida de granulometria fina (entre 1 e 2 mm) umedecida, foi colocada no fundo das caixas para separar as dez mudas e mantê-las em posição vertical, para assim facilitar a formação da câmara úmida. Dez mudas foram reservadas para o grupo controle, as quais foram pulverizadas com água destilada autoclavada.

Quatro folhas dos primeiros pares foliares de cada muda foram lesionadas com quatro pequenos furos. Cada muda foi pulverizada com 1 mL de solução de *Streptomyces variabilis* (acesso Genbank: JX997143) contendo  $0,2 \times 10^8$  células/mL. O grupo controle as mudas foram pulverizadas com 1 mL de água destilada autoclavada. As mudas foram acondicionadas na casa de vegetação sem controle

de temperatura. A avaliação da patogenicidade foi feita 30 dias após a inoculação de *S. variabilis*, verificando-se a presença de sintomas e comparado às diferenças entre o grupo que recebeu o tratamento com *S. variabilis* e o grupo que recebeu pulverização de água.

#### 4.6 TESTE DE ANTAGONISMO *IN VIVO* DE ACTINOBACTÉRIA EM MUDAS DE *E. dunnii*

Para cada tratamento foram utilizadas dez mudas sadias de *E. dunnii*, com três meses de idade, vigorosas e uniformes em altura e número de folhas, que foram distribuídas em caixa. A metodologia para formação de câmara úmida seguiu como descrito no item 4.5.

O ensaio foi delineado experimentalmente como fatorial 4 x 3, sendo de até três aplicações preventivas de suspensões de células de actinobactéria e uma aplicação de fungicida, em três tempos de inoculação diferentes (7 dias, 14 dias e 21 dias), com dois tratamentos adicionais servindo como testemunhas, como segue:

a) Testemunha água: Aplicação de 1 mL de água destilada autoclavada por muda.

b) Testemunha *Botrytis cinerea*: Depósito de dois discos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Os discos foram depositados nos primeiros pares foliares.

c) Actinobactéria (1): Uma aplicação de 1 mL suspensão salina (8,5 g de NaCl em 1 L de água destilada) contendo  $0,2 \times 10^8$  células/mL<sup>-1</sup> por muda, no primeiro dia do experimento. No segundo dia foram depositados dois disco de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Sendo os discos depositados nos primeiros pares foliares.

d) Actinobactéria (2): Aplicação de 1 mL suspensão salina (8,5 g de NaCl em 1 L de água destilada) contendo  $0,2 \times 10^8$  células/mL<sup>-1</sup> por muda, no primeiro dia do experimento e a segunda aplicação com sete dias. No oitavo dia foram depositados dois disco de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Sendo os discos depositados nos primeiros pares foliares.

e) Actinobactéria (3): Aplicação de 1 mL suspensão salina (8,5 g de NaCl em 1 L de água destilada) contendo  $0,2 \times 10^8$  células/mL<sup>-1</sup> por muda, no primeiro dia do

experimento, segunda aplicação com sete dias e a terceira aplicação com 14 dias. No décimo quinto dia foram depositados dois discos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Sendo os discos depositados nos primeiros pares foliares.

f) Fungicida iprodione (1): Uma aplicação do fungicida Rovral 50 WP (Rhone-Poulenc - Agrochimie) a uma dose de 2,4 mL para um litro de água, conforme descrito em Alfenas *et al.* (2009), no primeiro dia. No segundo dia foram depositados dois disco de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Sendo os discos depositados nos primeiros pares foliares.

g) Fungicida iprodione (2): Uma aplicação do fungicida Rovral 50 WP (Rhone-Poulenc - Agrochimie) a uma dose de 2,4 mL para um litro de água, no primeiro dia e a segunda aplicação com sete dias. No oitavo dia foram depositados dois disco de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Sendo os discos depositados nos primeiros pares foliares.

h) Fungicida iprodione (3): Uma aplicação do fungicida Rovral 50 WP (Iprodiona - Rhone-Poulenc - Agrochimie) a uma dose de 2,4 mL para um litro de água, no primeiro dia, a segunda aplicação com sete dias e a terceira aplicação com 14 dias. No décimo quinto dia foram depositados dois discos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro, retirado de culturas com sete dias de crescimento de *B. cinerea*. Sendo os discos depositados nos primeiros pares foliares.

Portanto nesse trabalho, cada pulverização representou um tratamento diferente, assim foram testados seis tratamentos: *S. variabilis* (1)- uma pulverização de *S. variabilis*; *S. variabilis* (2) - duas pulverizações de *S. variabilis* com intervalo de 7 dias; *S. variabilis* (3) – três pulverizações de *S. variabilis* com intervalos de 7 dias entres as pulverizações; Iprodione (1) – uma pulverização de Iprodione; Iprodione (2) – duas pulverizações de Iprodione com intervalo de 7 dias; Iprodione (3) – três pulverizações de Iprodione com intervalos de 7 dias entres as pulverizações.

Convém ressaltar que a escolha do fungicida iprodione deu-se por ser intensivamente aplicado no controle *B. cinerea*, além de muitos estudos evidenciarem a ausência de resistência deste patógeno frente ao iprodione (AMIRI *et al.*, 2014; CALDARI JUNIOR, 1998; GRIFFITHS; DANCER; HARWOOD , 1998).

Todas as mudas receberam as aplicações de tratamento com o auxílio de um microatomizador Sagyma SW776 (10 lp.pol<sup>-1</sup>). Antes do depósito dos discos de micélio-ágar, os quatro dos primeiros pares foliares de todas as mudas foram lesionados com quatro pequenos furos.

As avaliações foram realizadas a partir do momento da inoculação com o disco de micélio-ágar. Foram realizadas três avaliações, a primeira, com sete dias após o depósito do disco de micélio-ágar, a segunda aos 14 dias, e a última, aos 21 dias depois do depósito do disco de micélio-ágar. O método de avaliação, foi baseado em uma escala de notas para avaliação da severidade do mofo cinzento em *Eucalyptus* sp., elaborada por Bizzi (2006) descrita a seguir (FIGURA 2):

0 = ausência de sintomas;

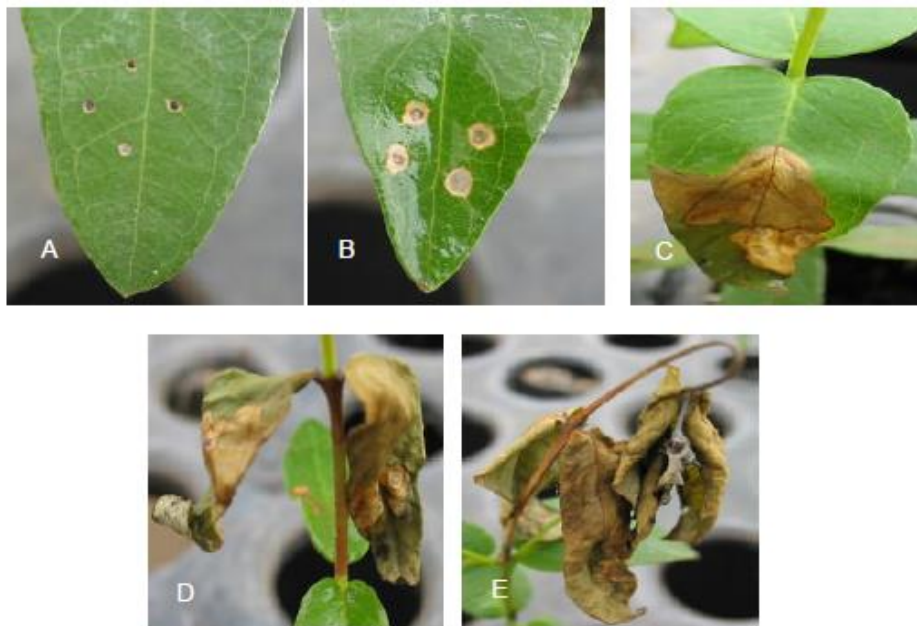
1 = infecção leve (lesão restrita ao ferimento, sem coalescência de lesões);

2 = infecção média (lesões coalescentes na folha, sem atingir o caule da muda);

3 = infecção severa (lesões coalescentes na folha, atingindo o caule da muda);

4 = infecção muito severa (progressão da doença até o ponteiro da muda).

FIGURA 2 – ESCALA DE AVALIAÇÃO DE SEVERIDADE DE MOFO- CINZENTO EUCALIPTO



NOTA: (A) Ausência de sintomas; (B) Infecção leve; (C) Infecção média; (D) Infecção severa; (E) Infecção muito severa. FONTE: BIZZI (2006).

A porcentagem de controle da doença foi obtida por meio da fórmula descrita por Bizi (2006):

$$\text{Controle (\%)} = (\text{Sev. Test.} - \text{Sev. Trat.} / \text{Sev. Test.}) \times 100$$

Onde, Sev. Test. representa a severidade da testemunha e Sev. Trat a severidade do tratamento.

Ao final do experimento *in vivo*, todas as mudas foram cortadas rente ao tubete e acondicionadas individualmente em sacolas de papelão, para obtenção da biomassa seca. Não foi considerada a pesagem do sistema radicular, apenas a parte aérea das mudas. Posteriormente, a massa vegetal úmida foi colocada para desidratar em estufa á 60 °C, por 72 horas.

Determinou-se a biomassa seca de cada muda em balança de precisão. Após o período de secagem, as sacolas de papelão contendo as mudas foram pesadas individualmente, e depois retirado o conteúdo e pesado somente a sacola de papelão. O valor do peso da sacola de papelão foi descontado do valor da primeira pesagem, para assim determinar com precisão o valor da biomassa seca de cada muda.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos experimentos *in vitro* foram transformados para  $\log(x+2)$  e foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) a 1% de probabilidade. Quando necessário, foi empregado o teste de Scott- Knott 5% de probabilidade para comparação de médias.

Os dados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados por estatística não paramétrica, tendo em conta que esses não apresentaram distribuição normal. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal- Wallis.

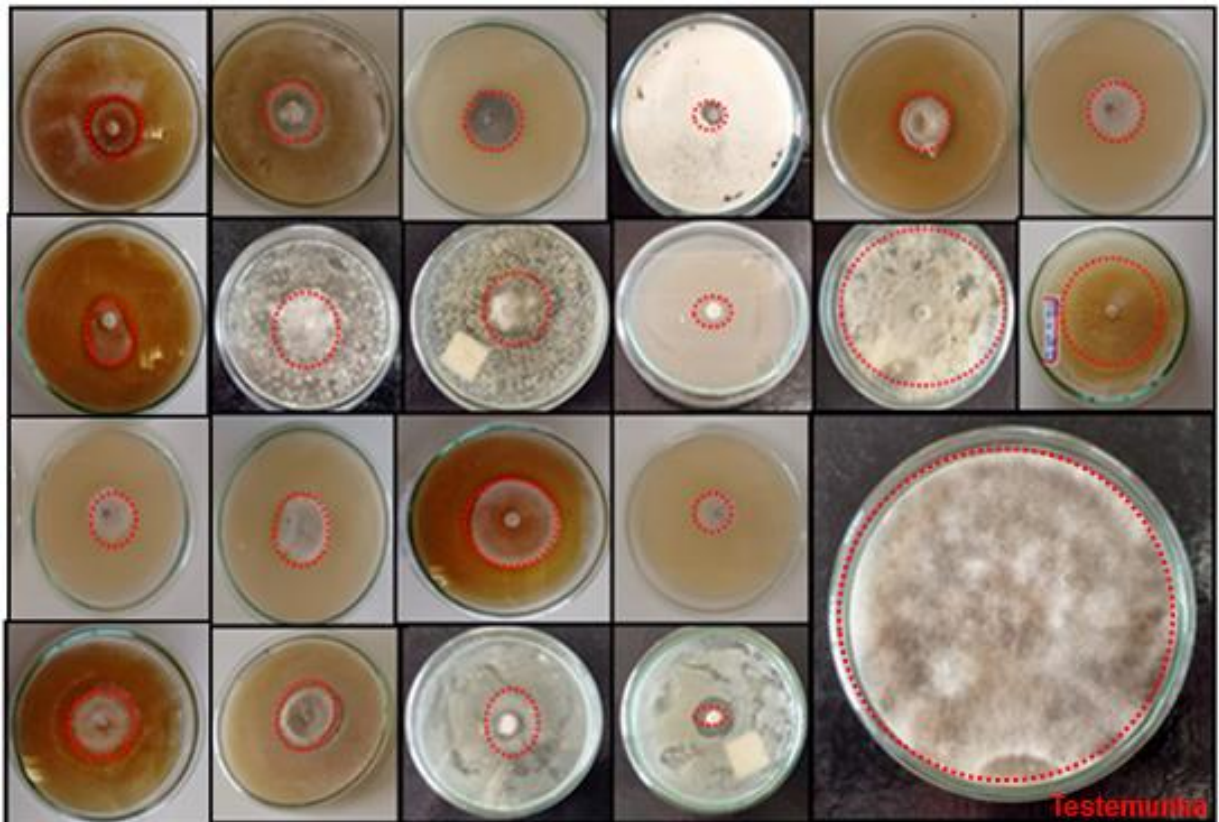
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software ASSISTAT 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DE INIBIÇÃO IN VITRO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *B. cinerea*

O controle biológico parte de uma seleção *in vitro* de microrganismos com potencial antagonista contra determinados patógenos (BAKER; COOK, 1974). Neste trabalho, todas as vinte actinobactérias testadas contra o *B. cinerea* apresentaram medidas de crescimento micelial do patógeno inferiores em relação ao controle, tanto nas avaliações de sete dias como nas avaliações de 14 dias de crescimento (FIGURA 3).

FIGURA 3 – TESTE DE INIBIÇÃO IN VITRO DE ACTINOBACTÉRIAS X *B. cinerea*



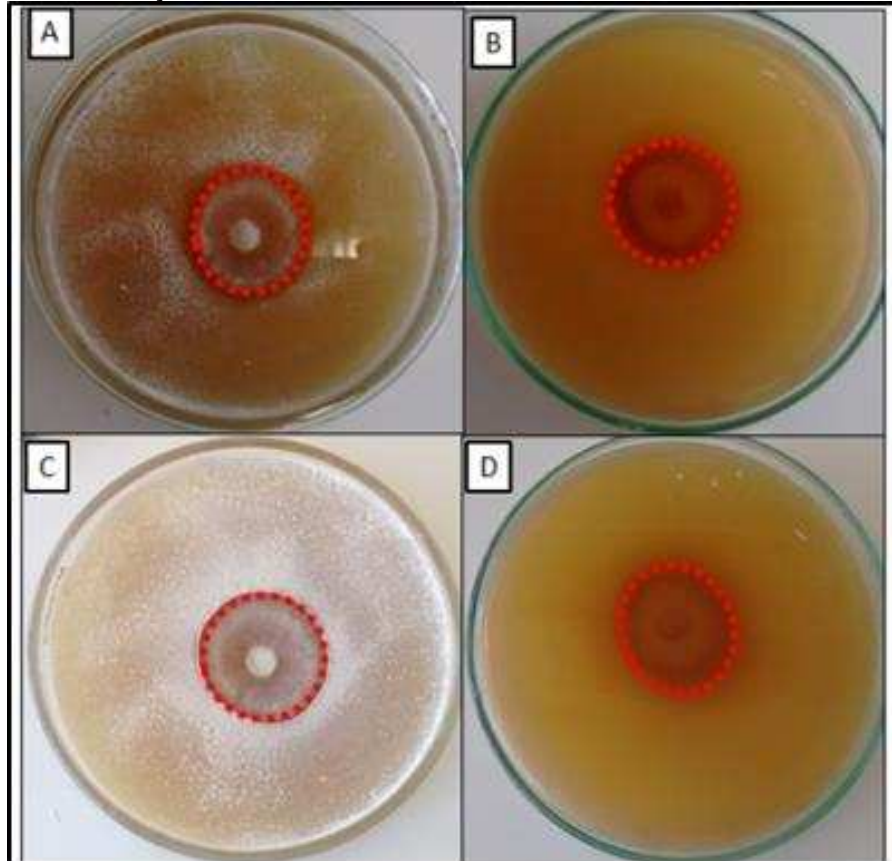
NOTA: O crescimento do patógeno está delimitado em vermelho. FONTE: O autor (2015).

Os diâmetros médios das colônias de *B. cinerea*, quando pareados com actinobactérias, diferiram estatisticamente da testemunha ( $p < 0,05$ ). Apenas *Streptomyces parvus* não apresentou diferença em relação ao controle, na avaliação de 14 dias (TABELA 2).

Dos 20 isolados de actinobactérias, selecionados e testados, *Streptomyces variabilis* apresentou o melhor potencial de inibição frente ao *B. cinerea*.

Evidenciando que há diferença entre o crescimento micelial de *B. cinerea* na testemunha e nos tratamentos. De acordo com o teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade, realizado com as avaliações de sete e 14 dias, o isolado *Streptomyces variabilis* foi o que apresentou o menor valor crescimento micelial de *B. cinerea* (FIGURA 4).

FIGURA 4 – INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *B. cinerea* POR *S. variabilis*



NOTA: Após sete dias de incubação (A) verso e (B) reverso da placa, e após 14 dias de incubação (C) verso e (D) reverso da placa. O crescimento do fungo está delimitado em vermelho. FONTE: O autor (2015).

Comparando as porcentagens de inibição obtidas através do método de formulado por Edginton *et al.*, (1971), observou-se que o isolado *Streptomyces variabilis* apresentou valores de inibição de 82,38% com sete dias e 77,62% com 14 dias (TABELA 2).

TABELA 2 – DIAMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS (mm) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Botrytis cinerea*, APÓS TESTE DE ANTAGÔNISMO COM ACTINOBACTÉRIAS

Tratamentos	Crescimento micelial (mm)		% de inibição	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
<i>B. cinerea</i> x <i>S. variabilis</i> (AS G34 3B 18)	14,8 f	18,8 g	82,38	77,62
<i>B. cinerea</i> x AS G 35 3A 40	24,8 d	26,9 f	70,48	67,98
<i>B. cinerea</i> x <i>S. cavourensis</i> (AS 3A 26)	20 e	28,2 f	76,19	66,43
<i>B. cinerea</i> x AS G32 3A 74	22,4 e	28,3 f	73,33	66,31
<i>B. cinerea</i> x AS G35 3A 41	21,3 e	28,5 f	74,64	66,07
<i>B. cinerea</i> x <i>S. cavourensis</i> (AD 11B 76)	20,6 e	31,5 e	75,48	62,50
<i>B. cinerea</i> x AD G 35 3A 90	24,8 d	31,8 e	70,48	62,14
<i>B. cinerea</i> x <i>S. aureus</i> (AD 3A 26)	25,9 d	32 e	70,36	61,90
<i>B. cinerea</i> x AD G33 2A 16	20 e	32,6 e	76,19	61,19
<i>B. cinerea</i> x <i>S. longwoodensis</i> (AD 3B 17)	25,1 d	35,6 d	70,12	57,62
<i>B. cinerea</i> x AD G35 13A 15	29,9 c	36,5 d	64,40	56,55
<i>B. cinerea</i> x <i>S. seoulensis</i> (AD G32 11A 60)	30,1 c	37,5 d	64,17	55,36
<i>B. cinerea</i> x AD G31 3A 19	33,5 c	38 d	60,12	54,76
<i>B. cinerea</i> x AD G32 4A 29	30,6 c	38,2 d	63,57	54,52
<i>B. cinerea</i> x <i>S. bacillaris</i> (AS G31 5A 43)	31,9 c	38,5 d	62,02	54,17
<i>B. cinerea</i> x <i>S. globisporus globisporus</i> (AD G31 3A 69)	33,3 c	45,9 c	60,36	45,36
<i>B. cinerea</i> x <i>S. puniceus</i> (AD G35 3B 14)	34,6 c	47,9 c	58,81	42,98
<i>B. cinerea</i> x <i>S. puniceus</i> (AD G35 3A 29)	47,2 b	63,1 b	43,81	24,88
<i>B. cinerea</i> x <i>S. malachitospinus</i> (AD G34 12B 82)	45,9 b	69,7 b	45,36	17,02
<i>B. cinerea</i> x <i>S. parvus</i> (AD G27 12B 83)	48,9 b	82,4 a	41,79	1,90
<i>B. cinerea</i>	84 a	84 a	0,00	0,00

NOTA: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, ao nível de 5% de significância. FONTE: O autor (2015).

Todos os isolados de actinobactérias avaliados neste trabalho, previamente obtidos por Porsani *et al.* (2013) haviam apresentado atividade inibitória contra organismos patogênicos. Os autores isolaram 116 actinobactérias da região entre marés da Ilha do Mel, Paraná, Brasil. Dentre estas, 68% apresentaram atividade contra organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas por seu potencial antimicrobiano e seus metabólitos secundários. Vários estudos evidenciaram a atividade inibitória de actinobactérias em relação ao *B. cinerea* e a outros microorganismos. Oliveira (2004) avaliou a atividade antagônica de actinobactérias frente a dois isolados *B. cinerea* isolados de videiras. Das 63 linhagens de

actinobactérias testadas, 19 apresentaram atividade antifúngica. Loqman *et al.* (2009), também trabalharam com videiras, esses autores isolaram 142 actinobactérias da rizosfera de *Vitis vinifera* L. no Marrocos e as testaram contra cinco fitopatógenos, dentre eles o *B. cinerea*. Nove isolados foram capazes de inibir todos os patógenos, e também capazes de proteger mudas de videiras em testes *in vivo*. Seis destes isolados pertenciam ao gênero *Streptomyces* e três ao gênero *Micromonospora*. Estes resultados indicaram o potencial de actinobactérias para o controle biológico de *Botrytis cinerea*.

Em relação a fungos fitopatogênicos, Melo (2009) isolou 60 linhagens de actinobactérias de plantas sadias de milho, cultivadas em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Dessas, 71% foram capazes de inibir o desenvolvimento de fungos como *Pythium aphanidermatum* e *Fusarium moliforme*, 56% foram capazes de inibir bactérias gram positivas como *Bacillus megaterium* e *Staphylococcus aureus* e 49% foram capazes de inibir bactérias gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella*.

Em tomateiros, Soares, Sousa e Garrido (2009), encontraram atividade antifúngica em isolados de *Streptomyces* sobre os fitopatógenos *Cladosporium fulvum* Cooke e *Fusarium oxysporum*, inibindo até 94,1% o crescimento desses patógenos. Carrer Filho *et al.* (2009), também avaliaram o potencial de actinobactérias frente a patógenos do tomateiro. Os autores utilizaram um isolado pertencente ao gênero *Nocardia*, que foi hábil em reduzir a severidade de *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Corynespora cassiicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Em condições de campo, quando a actinobactéria foi pulverizada semanalmente por atomização a severidade das doenças foi reduzida em comparação com o controle.

Esses e vários outros estudos comprovam a capacidade de actinobactérias em inibir o crescimento de organismos patogênicos (SILVA *et al.*, 2013; SOARES; SOUSA; GARRIDO, 2009; EL-ABYAD *et al.*, 1993). Dentre todas as actinobactérias testadas nesse trabalho *Streptomyces variabilis* apresentou os maiores valores de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*. Tendo em vista o seu desempenho teste de inibição *in vitro*, *Streptomyces variabilis*, foi selecionado para as etapas subsequentes.

## 5.2 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA DE ACTINOBACTÉRIA EM FOLHAS DE *E. dunni*

Em todos os grupos que receberam pelo menos uma pulverização com *S. variabilis* foi possível verificar o crescimento da mesma em todas as avaliações nos discos foliares. Já nos grupos controles, onde houve a pulverização de água destilada autoclavada, não apresentaram crescimento de actinobactérias (TABELA 3).

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA/ AUSÊNCIA DE ACTINOBACTÉRIAS EM DISCOS FOLIARES DE *E. dunni*

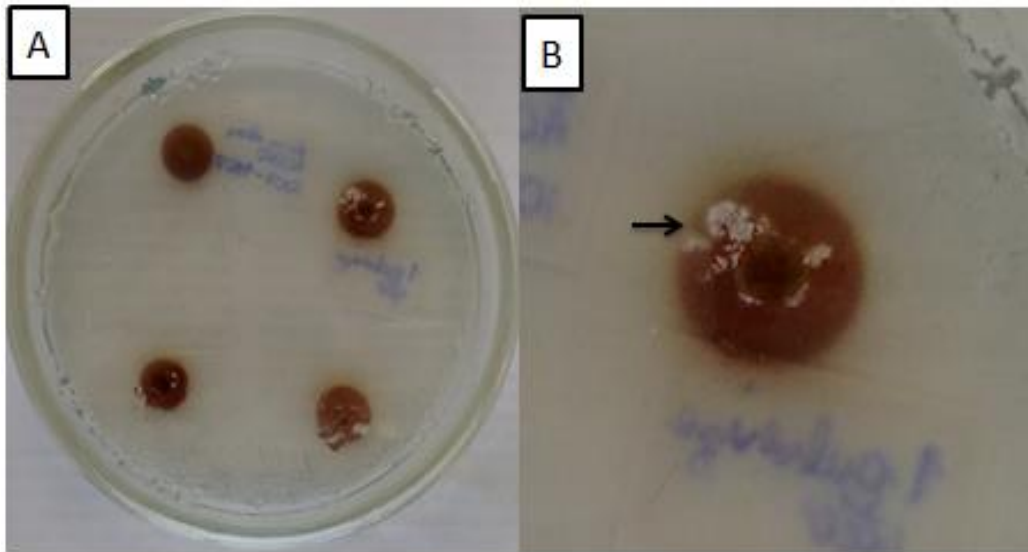
Tratamento	Tempo (dias)					
	0	3	7	14	21	28
<i>Streptomyces variabilis</i> - 1 pulverização		+	+	+	+	+
<i>Streptomyces variabilis</i> - 2 pulverizações				+	+	+
<i>Streptomyces variabilis</i> - 3 pulverizações					+	+
Testemunha - 1 pulverização		-	-	-	-	-
Testemunha - 3 pulverizações				-	-	-
Testemunha - 2 pulverizações					-	-

Legenda	
	Pulverização dos tratamentos
+	Presença de <i>S. variabilis</i>
-	Ausência de <i>S. variabilis</i>

NOTA: *Streptomyces variabilis*: folhas receberam pulverização com *S. variabilis*. Grupo testemunha: folhas receberam pulverização de água destilada autoclavada. 1 pulverização: pulverização no primeiro dia. 2 pulverizações: pulverização no primeiro dia e com 7 dias. 3 pulverizações: pulverizações no primeiro dia, 7 e 14 dias. Em 3 dias não houve pulverizações e avaliações. FONTE: O autor (2015).

Ao redor dos discos foliares houve crescimento de fungos e leveduras endofíticos e/ou epifíticos, mas, devido a macromorfologia da actinobactéria ser distinta, houve facilidade na identificação para isolamento e purificação. Foram selecionadas apenas colônias de coloração branca e que se desenvolviam morfológicamente em forma de giz (em pó) (PORSANI *et al.*, 2013). Esses isolados foram transferidos para uma nova placa de Petri, contendo meio Czapeck Dox, e mantidos á temperatura de 28 °C em BOD, fotoperíodo de 12 horas por até 7 dias. Em todos os grupos controle, não houve crescimento de actinobactérias, somente crescimento de fungos e leveduras endofíticos e/ou epifíticos (FIGURA 6).

FIGURA 6 – CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO EM DISCOS FOLIARES DE *E. dunnii*

NOTA: Crescimento de microrganismos em placas de 1 pulverização e avaliação de 21 dias. A) Placa com tratamento de actinobactéria e B) detalhe do crescimento da actinobactéria, colônias brancas e opacas. FONTE: O autor (2015).

Os resultados na avaliação com 28 dias após uma pulverização evidenciaram a presença do crescimento de *S. variabilis* nos discos foliares, indicando a capacidade *S. variabilis* em sobreviver em folhas de *E. dunnii*. O isolado foi capaz de se manter na microbiota da folha mesmo após o período de 28 dias sem nenhuma outra fonte de nutriente. Ortega Morales (2010) ressaltou em seu trabalho, as particularidades de actinobactérias que estão presentes em regiões entre-marés. As condições da região entre-marés são extremas, devido aos ciclos de maré, resultando em diferentes gradientes de umidade, temperatura, a ação das ondas, a radiação UV, nutrientes e salinidade. Tais condições favorecem o desenvolvimento e a disseminação de determinados microrganismos com processos fisiológicos e metabólitos particulares.

No grupo controle não houve crescimento de actinobactérias em nenhum dos testes de pulverização e em nenhuma das avaliações (FIGURA 5). Houve apenas crescimento de microrganismos presentes previamente nas folhas, o que sugere que as actinobactérias presentes nos testes com pulverizações, provieram do próprio tratamento.

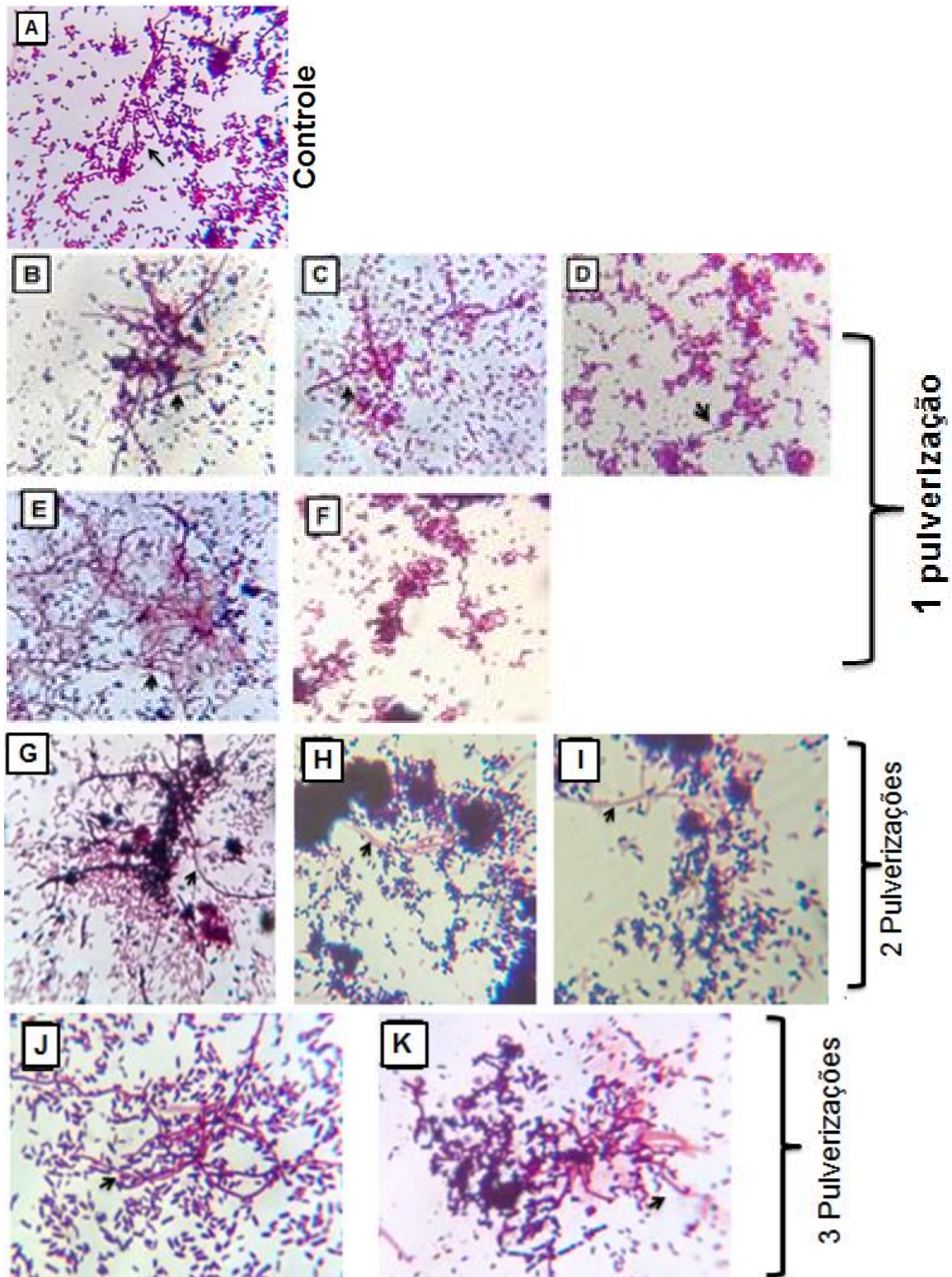
Muitos autores trabalharam com isolamento de bactérias em *Eucalyptus* sp.. Paz (2009) isolou bactérias endofíticas, sendo que nenhuma delas pertenciam ao grupo de actinobactérias. As espécies obtidas da microbiota do eucalipto nesse trabalho foram *Bacillus subtillis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis* e

*Pseudomonas* sp.. Procópio *et al.* (2009), isolaram várias bactérias endofíticas do caule de *Eucalyptus* sp. de três anos de idade e não verificaram a presença de actinobactérias. Trabalhando com rizoplano, Kaewkla e Franco (2010), isolaram nove actinobacterias *Eucalyptus microcarpa*, sendo um que umas das cepas isoladas foi proposta como sendo uma nova espécie denominada de *Flindersiella endophytica* sp., e evidenciando a característica desses microrganismos em habitar naturalmente o solo (WILLIAMS; SHARPLES, 1973). Em 2008, Ferreira *et al.*, prospectaram bactérias endofíticas de mudas e sementes de várias espécies de *Eucalyptus*. Os autores não reportaram presença de actinobactérias em mudas, apenas em sementes a presença do gênero *Frankiaceae*.

Esses estudos indicam a presença de actinobacterias em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de *Eucalyptus* sp., mas ainda não há relatos de presença de actinobactérias em folhas de mudas. Neste trabalho ficou evidente que a actinobactéria isolada dos discos foliares de eucalipto, foi proveniente do tratamento em que as mudas foram submetidas.

A fim de comprovar que as actinobactérias isoladas dos discos foliares provieram do tratamento, essas foram submetidas à coloração de Gram (FIGURA 7). Foi possível observar na micromorfologia a formação de longas cadeias de esporos, que se fragmentam em formas bacilares e esféricas, formando um emaranhado de finos filamentos ramificados com aspecto granular, características do gênero *Streptomyces*, o qual o isolado foi inicialmente identificado. Essas descrições, segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2004), estão de acordo com aquelas descritas para este gênero.

FIGURA 7 – COLORAÇÃO DE GRAM DAS ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO TESTE DE FOLHA DESTACADA DE *E. dunni*



NOTA: Micromorfologia visualizada no aumento de 1000x. As setas indicam longas hifas ramificadas. **A)** Actinobactéria controle pertencente ao Banco biológico Labmicro. **B, C, D, E e F,** Actinobactérias isoladas do grupo de uma pulverização. Sendo respectivamente, os discos foliares retirados com: **B)** 3, **C)** 7, **D)** 14, **E)** 21 e **F)** 28 dias. **G, H e I,** Actinobactérias isoladas do grupo de duas pulverizações. Sendo respectivamente, os discos foliares retirados com **G)** 14, **H)** 21 e **I)** 28 dias. **J e K,** Actinobactéria isoladas do grupo de três pulverizações. Sendo respectivamente, os discos foliares retirados com **J)** 21 e **K)** 28 dias.

Para evidenciar que as actinobactérias isoladas dos discos foliares provinham do tratamento, foi realizado um teste com mudas sem contato com *S. variabilis*, em meio seletivo para actinobactérias. Durante avaliações diárias por até 30 dias, nenhum fragmento de muda demonstrou a presença actinobactérias.

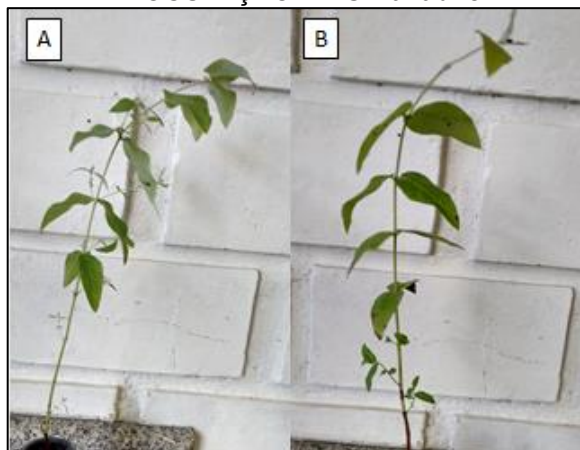
### 5.3 TESTE DE PATOGENICIDADE COM *S. variabilis* EM MUDAS DE *E. dunnii*

A partir dos resultados obtidos por *S. variabilis* nos testes *in vitro*, esse foi selecionado para o ensaio de patogenicidade. O teste teve como objetivo, detectar se *S. variabilis* poderia causar alterações que levassem a perdas no vigor de desenvolvimento da planta.

A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo. Dentre esses sintomas estão, colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, produção de proteínas solúveis, deposição de lignina e etc (FERNANDES *et al*, 2009). Nesse sentido buscou-se verificar alterações nas mudas que receberam tratamento com *S. variabilis*.

Em comparação ao grupo controle às mudas tratadas com *S. variabilis*, não apresentaram alterações morfológicas visíveis. Constatou-se a ausência de lesões foliares, demonstrando que este isolado não foi patogênico em *Eucalyptus dunnii* na avaliação feita 30 dias após a inoculação de *S. variabilis* (FIGURA 8).

FIGURA 8 – TESTE DE PATOGENICIDADE EM MUDAS DE *E. dunnii*, APÓS 30 DIAS DE INOCULAÇÃO DE *S. variabilis*



NOTA: A) muda submetida ao tratamento de *S. variabilis*. B) Muda controle, pulverizada com água.  
Fonte: O autor (2015).

Segundo Agrios (1988), doença é o estado ou condição resultante de processos fisiológicos anormais, que se manifesta visualmente através do aparecimento de sintomas, levando em consideração uma série de acontecimentos que propiciam seu desenvolvimento. Assim ficou comprovado que, as mudas tratadas com *S. variabilis*, não apresentaram alterações como: clorose, necrose ou queda foliar, sintomas responsáveis pela redução da fotossíntese que conseqüentemente causam desvantagem á planta (MAIA; MARTOS; BARRELLA, 2001).

Não foram encontrados relatos de testes de patogenicidade com actinobactérias em mudas de eucalipto na literatura consultada. Em um estudo realizado em culturas de alface por Patekoski e Pires-Zottarelli (2010), constataram que um produto para biocontrole de *Pythium aphanidermatum*, elaborado a partir de *Trichoderma*, foi patogênico às plantas quando aplicado na ausência do patógeno. A aplicação do produto nos tratamentos controle ocasionou redução significativa do comprimento das radículas. Porém, quando aplicado na presença do patógeno, o produto promoveu aumento significativo do comprimento das radículas das variedades.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO CONTROLE – *S. variabilis* x *B. cinerea*

Verificou-se que todos os tratamentos testados apresentaram valores de severidade inferiores ao controle positivo (TABELA 3). Nas avaliações de sete dias os melhores resultados foram os tratamentos submetidos a pulverizações de iprodione. O melhor resultado foi tratamento de uma pulverização de iprodione, apresentando o valor médio de severidade de 0,8, representando controle de 76,47% da doença. Ainda comparando os resultados de sete dias, o tratamento com três pulverizações de *S. variabilis*, foi o que mais se aproximou significativamente dos resultados obtidos com os tratamentos do fungicida. O valor médio de severidade foi de 2, representando controle de 41,17% da doença.

Nas avaliações feitas aos quatorzes dias, todos os tratamentos demonstraram evolução da doença. O fungicida se manteve com melhores resultados. Este foi obtido pelo tratamento de duas pulverizações de iprodione, apresentando o valor médio de severidade de 1,5, representando controle de 62,5% da doença. Nessa avaliação percebe-se uma mudança, já que na avaliação de sete

dias o melhor tratamento foi o com uma pulverização de iprodione. O tratamento de três pulverizações de *S. variabilis*, se manteve sendo o tratamento que mais se aproximou significativamente dos tratamentos de iprodione. O valor médio de severidade foi de 2,3, representando controle de 42,5% da doença.

Na última avaliação, feita aos 21 dias, novamente houve progresso da doença em relação a avaliação de 14 dias. Do mesmo modo, os tratamentos com fungicida exibiram os melhores resultados de controle. O tratamento de duas pulverizações de iprodione apresentou o valor médio de severidade de 1,8, representando controle de 55% da doença. O tratamento de três pulverizações de *S. variabilis*, novamente foi o que mais se aproximou significativamente dos tratamentos de iprodione. Tendo como valor médio de severidade de 2,4, com a porcentagem de controle da doença na casa dos 40%.

Os resultados demonstram que o número maior de pulverizações com *S. variabilis*, resultou em um controle mais eficiente, dentre os tratamentos submetidos a actinobactéria. Tratamentos com uma e duas pulverizações de *S. variabilis*, não apresentaram valores expressivos no controle da doença. Observou-se que há um aumento gradativo no controle do *B. cinerea* conforme a quantidade de pulverizações de *S. variabilis*. O que não aconteceu com os tratamentos submetidos ao fungicida, já que em relação ao progresso da doença o que apresentou o melhor controle, foi o tratamento com duas pulverizações de iprodione (TABELA 3).

TABELA 3 – SEVERIDADE MÉDIA E CONTROLE (%) DE MOFO-CINZENTO EM MUDAS DE *E. dunnii* TRATADAS PREVENTIVAMENTE COM *S. variabilis*.

Tratamentos	Avaliações (Dias após a inoculação de <i>S. variabilis</i> )					
	7 dias		14 dias		21 dias	
	Severidade Média	% Controle	Severidade Média	% Controle	Severidade Média	% Controle
<i>B. cinerea</i>	3,4 d	-	4 c	-	4 c	-
<i>S. variabilis</i> (1) *	2,4 cd	29,41	3,4 bc	15	3,7 bc	7,5
<i>S. variabilis</i> (2)**	2,3 bcd	32,35	2,8 abc	30	3,3 abc	17,5
<i>S. variabilis</i> (3)***	2 abcd	41,17	2,3 ab	42,5	2,4 ab	40
Iprodione (1)*	0,8 a	76,47	1,9 a	52,5	2,1 a	47,5
Iprodione (2)**	1,1 ab	67,65	1,5 a	62,5	1,8 a	55
Iprodione (3)***	1,5 abc	55,88	1,7 a	57,5	2 a	50

NOTA: Severidade baseada em escala diagramática (BIZZI *et al.*, 2006); \* Tratamentos com uma pulverização; \*\* Tratamentos com duas pulverizações; \*\*\* Tratamentos com três pulverizações. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para severidade; Análise com 7 dias: H= 46,26 - p valor < 0,01; Análise com 14 dias: H= 49,91 - p valor < 0,01; Análise com 21 dias: H= 39,66 - p valor < 0,01; Os valores mais próximos de zero correspondem a uma maior eficiência de controle do patógeno. FONTE: O autor (2015).

De forma geral, esses resultados corroboram com relatos na literatura, que evidenciam o uso actinobactérias no controle de *B. cinerea in vivo*. Em um estudo recente, Kim, Lee e Yun (2015) identificaram *Streptomyces hygrosopicus* como um potente na atividade antifúngica de *B. cinerea* em morangos, com uma eficácia de 58% de controle da doença. Em culturas de tomate, *Streptomyces hygrosopicus* foi eficaz no controle de *B. cinerea*. Após cinco dias, plantas sob tratamento preventivo com a actinobactéria apresentaram uma redução acentuada na biomassa fúngica e ausência de sintomas, enquanto as plantas que não receberam tratamento apresentaram sintomas graves da doença (GE *et al.*, 2015).

Trabalhando com controle biológico em cultura de pepino, Parck *et al.* (2008), purificaram um metabólito secundário a partir de uma estirpe de *Streptomyces*, que se mostrou eficiente no controle do mofo-cinza em testes realizados *in vitro* e em *in vivo*. Também utilizando metabólitos secundários, extraídos de *Streptomyces araujoniae*, Silva *et al.* (2014) atestaram a capacidade deste em controlar o crescimento de *B. cinerea*.

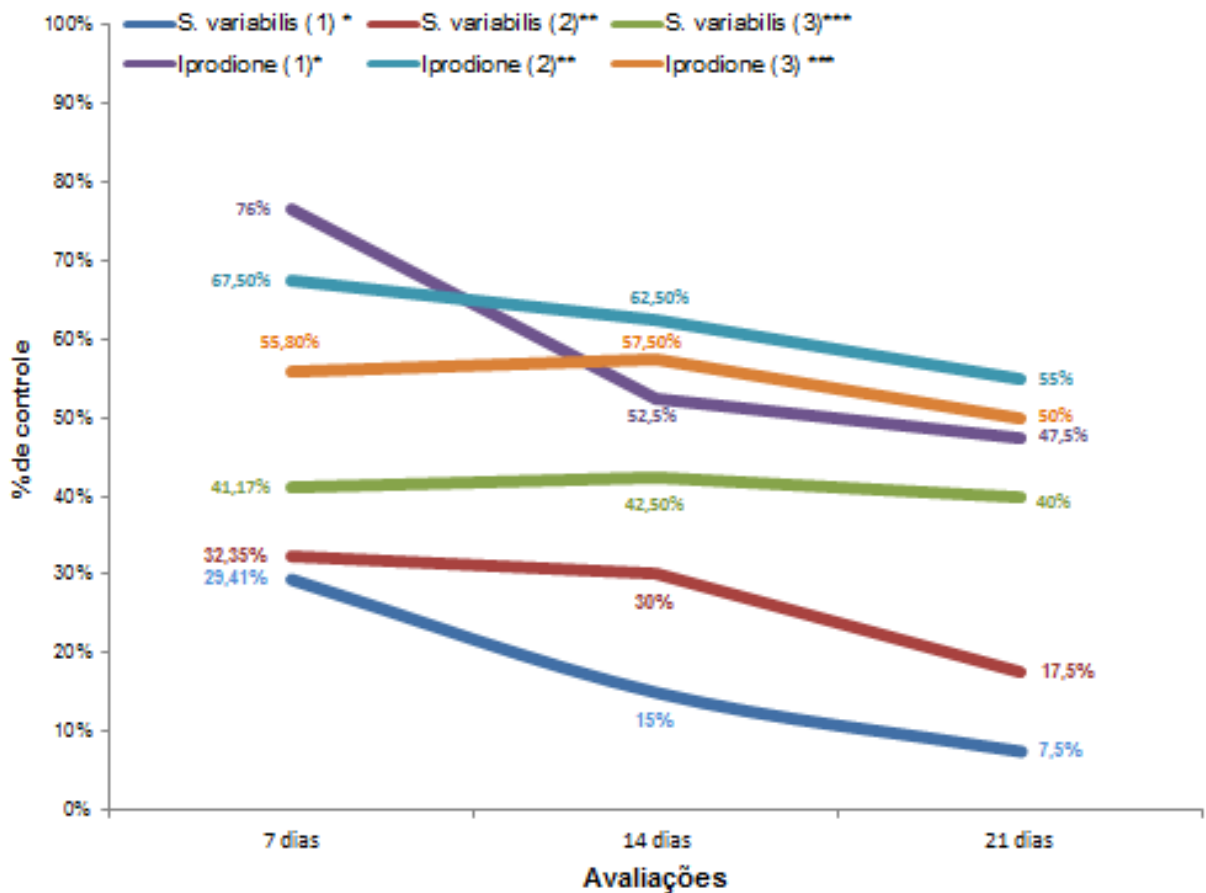
O biocontrole de actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*, no controle de *B. cinerea*, tem sido relatado em diferentes culturas vegetais (WHITE; LINFIELD; LAHDENPERA, 1990; KIM; YANG; KIM, 2003; NING *et al.*, 2012). No entanto, na bibliografia consultada não foram encontrados trabalhos relatando a utilização do gênero *Streptomyces* no controle de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus dunni*.

Analisando os valores de porcentagem de controle de iprodione, ao final do período de 21 dias, o tratamento com duas pulverizações obteve o melhor resultado, controlando 55% da doença. Seguido pelo tratamento de três pulverizações, controlando 50% da doença. E finalmente, o tratamento de uma pulverização de iprodione, controlando 47,5% da doença. Em relação a perda da porcentagem de controle do *B. cinerea*, verificou-se que o tratamento de três pulverizações de iprodione, apresentou a menor variação. Exibindo o valor de 7,5% na perda do controle da primeira até a última avaliação. O tratamento de duas pulverizações apresentou uma perda controle de 12, 65%, ao final das avaliações. Por fim, o tratamento de uma pulverização de iprodione, apresentou a maior perda na porcentagem de controle ao final do período, de 28,97% (GRAFICO 1).

Iprodione é um fungicida de contato com ação protetora e curativa. Pertence ao grupo químico das dicarboximidas, estes fungicidas interferem com respiração

bloqueando a atividade da enzima NADH citocromo-c-redutase no processo respiratório. As dicarboximidas também apresentam alguma interação com o núcleo celular. A citocromo-c-redutase e mais algumas enzimas são inibidas, provocando uma peroxidação de lipídios. As membranas internas da mitocôndria são especialmente sensíveis, prova velmente devido a seu alto conteúdo de ácidos graxos insaturados. As dicarboximidas inibem a germinação de conídios. Se houver essa germinação, os tubos germinativos ficam pequenos e entumecidos, podendo se romper. Nas hifas os compostos são rapidamente ligados à parede celular, bem como alteram a fração de triglicéridos. Podem provocar extravasamento do citoplasma. O micélio tem seu crescimento interrompido. Nas hifas já desenvolvidas a membrana só é alterada no ápice, onde ainda há crescimento (EHR; KEMMIT, 2002).

GRAFICO 1 – CONTROLE (%) DE MOFO-CIZENTO EM MUDAS *E. dunni* TRATADAS COM *S. variabilis*



FONTE: O autor (2015).

Ao final do período de 21 dias, o tratamento de três pulverizações de *S. variabilis* controlou a doença em 40%. O tratamento de duas pulverizações apresentou um valor de 17,5% e o de uma pulverização 7,5% no controle. Em relação aos valores de perda porcentagem de controle, as mudas submetidas á três pulverizações, exibiram uma perda de controle de apenas 2,5% ao final do período de avaliações. O tratamento de duas pulverizações apresentou uma perda no controle de 14,85%. Por fim, o tratamento de uma pulverização apresentou a maior perda de controle, no valor de 21,91%. (GRAFICO 1).

A maior perda de controle da doença, ao final das avaliações, ocorreu nos tratamentos submetido a uma pulverização, seguido por duas pulverizações e três pulverizações. Esse padrão verifica-se tanto com os tratados com iprodione, quando os tratados com *S. variabilis*. Demonstrando a característica do patógeno de ser de difícil controle. Pois este possui uma variedade de modos de ataque no hospedeiro, conseguindo utilizar diferentes fontes de nutrientes, podendo sobreviver através de micélio dormente, conídios ou por períodos prolongados através de escleródios em restos de culturas (WILLIANSO *et al.*, 2007). Esses resultados demonstram a importância da realização de pulverizações periódicas de tratamento, para que se sustente o controle da doença.

É necessário ressaltar que o método de inoculação do patógeno, utilizando o disco de micélio é considerado agressivo. Na literatura em geral, a inoculação do patógeno se faz por meio de pulverizações de solução de esporos, e não pela utilização de discos de micélio (BIZZI, 2006; LISBOA *et al.*, 2007; SBRAVATTI JUNIOR *et al.*, 2013; SALLA; ASTARITA; SANTARÉM 2016). Verificaram-se nesses estudos, valores altos de controle do mofo-cinzento nos tratamentos com o fungicida. Contrariando resultados apresentados neste trabalho, os quais demonstram que aos 21 dias, o melhor valor de controle do iprodione foi de apenas 55%.

Elad *et al.* (1993), utilizando o método de inoculação da doença através de pulverizações, encontrou valores de até 85% de controle utilizando iprodione em plantas de pepino. Utilizando o mesmo método, Bizi (2006) testou iprodione no controle do mofo-cinzento em mudas de *Eucalyptus dunnii*, encontrando valor de severidade de 0,48 e o controle 77,25% do mofo cinzento. Resultados de até 95,83% de controle da doença foram encontrados por Sbravatti Junior *et al.* (2013), no controle de *B. cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. Diferentemente, no estudo

realizado por Ribeira, Cotoras e Zuniga (2008), foi utilizada a metodologia do disco de micélio de *B. cinerea* em tomateiro. Esses autores verificaram um baixo desempenho do iprodione frente ao patógeno, mantendo um controle de apenas 40%.

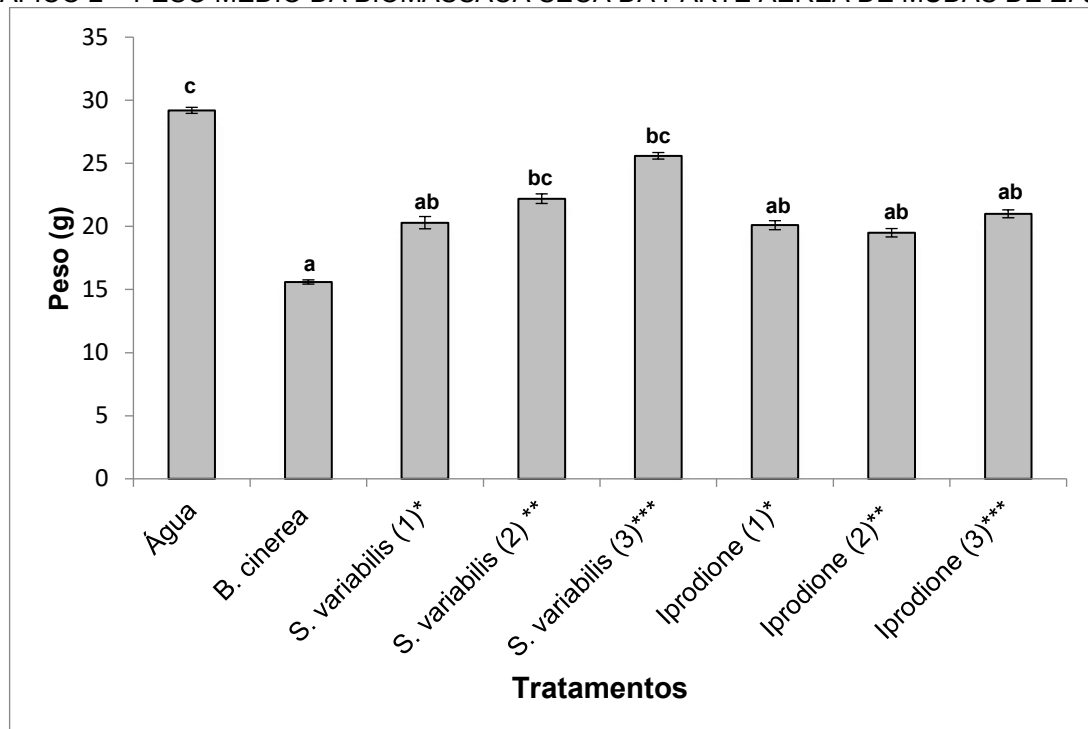
Vários fatores podem interferir nesses diferentes métodos. A metodologia de disco de micélio, por exemplo, garante uma grande carga de patógeno sobre os ferimentos previamente realizados. O micélio é ativo e já está apto para adentrar no tecido foliar. Já na metodologia de pulverização de esporos, muitos desses se perdem no próprio procedimento, durante a pulverização. Há um tempo maior para penetração no tecido foliar, pois isso depende da germinação dos esporos.

Devido a todos esses fatores considera-se esse experimento uma condição extrema. Além do estresse causado pela inserção dos discos miceliais do patógeno, a qualidade das mudas é afetada, dentre outros fatores, pelo tempo de permanência no viveiro. Isso porque, ao ultrapassarem o período ideal de rotação no viveiro, as mudas tendem a apresentar enovelamento do sistema radicular, imposto pela restrição de espaço explorável de substrato, aliado a um baixovigor vegetativo, redução de área foliar, maior predisposição a determinadas doenças etc. (ALFENAS *et al.*, 2009).

## 5.5 BIOMASSA SECA

As plantas podem estar submetidas a estresses, caracterizados por condições externas que adversamente afetam o crescimento, o desenvolvimento e/ou a produtividade (BONATO, 2007). Assim, conduziu-se este trabalho para obter um panorama geral e verificar o impacto e possível estresse que cada tratamento pode exercer sobre crescimento das mudas, utilizando a técnica que visa a pesagem da biomassa seca.

Verificou-se que todos os tratamentos em comparação ao controle, no qual as mudas receberam somente pulverização de água, apresentaram uma diminuição na biomassa seca. Os tratamentos que mais se aproximaram dos valores do tratamento água, foram os tratamentos de duas pulverizações de *S. variabilis* e três pulverizações de *S. variabilis*. Já o tratamento no qual as mudas receberam uma pulverização de *S. variabilis* se igualaram significativamente em relação aos diferentes tratamentos de iprodione (GRAFICO 2).

GRAFICO 2 – PESO MÉDIO DA BIOMASSACA SECA DA PARTE AÉREA DE MUDAS DE *E. dunni*

NOTA: \* Tratamentos com uma pulverização; \*\* Tratamentos com duas pulverizações; \*\*\* Tratamentos com três pulverizações. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para biomassa seca:  $H = 61,81$  -  $p$  valor  $< 0,01$ . Fonte: O autor (2015).

A biomassa menor nos tratamentos indica que as plantas não se devolveram de maneira plena em relação às mudas controle, as quais não foram submetidas a nenhum tratamento e por consequente nenhum estresse. Sendo esse um fator externo, considerado uma reação desfavorável ao crescimento vegetal (ALFENAS *et al.*, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2012). Fatores bióticos e abióticos que se expressam numa planta doente acarretam desequilíbrio na auto-regulação ou, no mínimo, um distúrbio fisiológico. Esses fatores podem causar desde a alteração da expressão gênica e do metabolismo celular à alteração da taxa de crescimento e da produtividade, dependendo da espécie, do genótipo e da idade de desenvolvimento da planta (BONATO, 2007).

A biomassa seca das mudas que receberam tratamento com fungicida iprodione apresentaram pouca variação, cerca de 0,04 g de variação média, em relação a quantidade de pulverizações. Portanto não houve relação entre a quantidade de pulverizações de iprodione a um aumento ou diminuição significativo do peso das mudas entres os tratamentos. Também constatou-se que esses tratamentos não diferenciaram significativamente do controle positivo, no qual as mudas tiveram contato apenas com o patógeno. O Iprodione não opera como um

promotor de crescimento vegetal, mas atua na inibição do crescimento micelial mais do que a germinação de esporos do *B. cinerea* (PAPPAS; FISHER, 1979).

De maneira geral, os resultados sugerem um crescimento gradativo da biomassa seca em relação a quantidade de pulverizações de *S. variabilis*. Em média, houve uma variação de 0,23 g. Mesmo essas plantas em contato com dois microorganismos diferentes, não naturais de sua biota (*S. variabilis* e posteriormente *B. cinerea*), apresentaram valores maiores de biomassa seca da parte aérea. O que sugere que *S. variabilis* pode estar fornecendo alguma vantagem às mudas, para superar o estresse causado pelo patógeno.

Alguns microorganismos, além de controlar doenças de plantas, têm a capacidade de atuar como agentes promotores de crescimento de plantas (SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2009). Os modos de atuação desses microorganismos como promotores de crescimento vegetal e biocontroladores de fitopatógenos ocorrem por diferentes mecanismos que operam em ação conjunta ou isoladamente (CORRÊA; BETTIOL, 2009). São capazes de estimular o crescimento de plantas, aumentando a produção de biomassa, reduzindo os danos causados por fitopatógenos e minimizando o estresse causado por fatores bióticos e abióticos (WELBAUM *et al.*, 2004). Esses microorganismos fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem também ser utilizados para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (MARIANO *et al.*, 2004).

Recentemente, as actinobactérias têm atraído o interesse dos pesquisadores por causa não só pelo seu significativo papel no biocontrole, mas também na promoção de crescimento de plantas (VIJAYABHARATHI; SATHYA; GOPALAKRISHNAN, 2016). O gênero *Streptomyces* além de ser conhecido pela sua capacidade de controlar as doenças mostra-se eficiente na indução de respostas de defesa nas plantas colonizadas (SCHREY; TARKKA, 2008). Produtos já registrados como Actinovate (Natural Industries, Texas, EUA), elaborado a partir de *Streptomyces lydicus* WYEC 108, além atuarem no biocontrole de fitopatógenos através da competição, antibiose, produção de sideróforos e enzimas extracelulares (quitinases), também atuam na promoção do crescimento vegetal (BETTIOL, 2012). Sadeghi *et al.* (2006), observaram que um isolado do gênero *Streptomyces*, produziu

um composto com atividade fitormonal, elucidado como ácido indol- 3-acético foi capaz de promover incrementos significativos na altura e massa fresca de brotos, massa fresca e seca de raízes de trigo, além de aumentar a absorção de N, Fe, P e Mn. Salla, Astarita e Santarém (2016), utilizaram isolados rizobacterianos do gênero *Streptomyces* em *Eucalyptus grandis* e *E. globulus*. Esses autores comprovaram que *Streptomyces* sp. PM9 induziu a proliferação de raízes adventícias, bem como modulou o metabolismo secundário das plantas. Também observaram um atraso no estabelecimento da doença mofo-cinza em *E. grandis*, sugerindo que as plantas eliciadas com *Streptomyces* sp. foram sensibilizadas ao possível ataque por fitopatógenos. Errakhi *et al.* (2007) trabalhando com *Beta vulgaris* L. (beterraba), constaram que um isolado de *Streptomyces*, denominado de J-2, inibiu significativamente o desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*, causador do tombamento de plântulas. Este mesmo isolado aumentou significativamente a biomassa fresca das plântulas de beterraba quando comparado com plantas sem qualquer tratamento.

Muitos estudos utilizam actinobactérias inoculadas e incubadas em substratos orgânicos de produção de plantas, e promovem um aumento na disponibilização de nutriente e maior crescimento vegetal (SOUZA; SOARES; GARRIDO 2009). Santos (2013), constaram um aumento na produção de biomassa e no teor de fosfato em plantas de *Dioscorea spp.* (Inhame), utilizando isolados de *Streptomyces sp.* em adubos orgânicos.

A interação entre *Streptomyces*, plantas e outros microrganismos não está completamente elucidada. Seu modo de ação pode ser através de metabólitos secundários, promovendo o suprimindo crescimento microbiano. Gerando defesas induzidas na planta que incluem mudanças na composição da parede celular e alterações nas expressões de genes relacionados com a defesa (SCHEREY; TARKKA, 2008).

Com base nesses resultados, pode-se sugerir que os três tratamentos com fungicida em relação ao aspecto de biomassa, apresentaram menor eficácia do que os tratamentos de duas pulverizações de *S. variabilis* e três pulverizações de *S. variabilis*. Já que esses tratamentos obtiveram uma menor perda de biomassa, em relação ao controle negativo. Existe a perspectiva de que *S. variabilis*, além de atuar no biocontrole de *B. cinerea* esteja atuando como uma bactéria promotora de crescimento. Isso implica inferir que aumentando o número de pulverizações,

combinado com pulverizações prévias de *S. variabilis*, seja possível uma perda menor de biomassa seca, já que *S. variabilis* teria um maior tempo para se estabelecer na microbiota da planta.

## 6 CONCLUSOES

- *Streptomyces variabilis* apresentou melhor potencial inibitório no controle do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, dentre as 20 actinobactérias avaliadas *in vitro*.
- Foi comprovada a presença *S. variabilis* nos testes de folha destacada, até 28 dias após a pulverização da mesma.
- Mudanças submetidas inoculadas com *S. variabilis*, não apresentaram sinais de patogenicidade em relação ao grupo controle.
- Dentre os tratamentos com *S. variabilis*, as mudas submetidas a maiores quantidades de pulverizações apresentaram menor grau de severidade e porcentagem da doença.
- Mudanças submetidas a maiores quantidades de pulverizações de *S. variabilis*, apresentaram menor perda de biomassa seca.

## REFERÊNCIAS

- ACERO, F. J. F.; JORGE, I.; CALVO, E.; VALLEJO, I.; CARBÚ, M.; CAMAFEITA, E.; LÓPEZ, J. A.; CANTORAL, J. M.; JORRÍN, J. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Proteomics**. v. 6. p. 88-96, abr. 2006
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego; Academic Press, 1988.
- AGROATLAS - Interative Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Disponível em: < <http://www.agroatlas.ru/en/>>. Acesso em: 23 jun. 2014.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2009.
- ALMAS, J. F. S. C. **Actinobactérias e adubação orgânica no manejo de *Scutellonema bradys*, no crescimento e nutrição de plantas de inhame**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Setor de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2013.
- AMIRI, A.; ZUNIGA, A. I.; MERTELY, J.; PERES, N. A. First Report on Resistance to Pyraclostrobin, Thiophanate-methyl, Fenhexamid and Boscalid in *Botrytis cinerea* from *Eucalyptus* Seedlings in Florida Greenhouses. **Plant disease**. v. 98, p. 851-2, jun. 2014.
- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 351-367.
- BAKER., K.F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: American Phytopathological Society, 1974.
- BÉRDY, J. **Bioactive microbial metabolites**. Tokio: J Antibiot.v. 58, p. 1–26, jan. 2005.
- BERTOLA, A. *Eucalipto - 100 anos de Brasil: "Falem mal, mas continuem falando de mim!"*. Disponível em: <[http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto\\_100%20anos%20de%20Brasil\\_Alexandre\\_Bertola.pdf](http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto_100%20anos%20de%20Brasil_Alexandre_Bertola.pdf)> Acesso em: 13 mai. 2014.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; JÚNIOR, T.J.de P.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.de C.do B.; BEZERRA, J.L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012.
- BEUX, M. R. **Café – Estudo da biodiversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ochratoxina A**. (Doutorado

em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BIZI, R. M. **Alternativas de controle de Mofo-cinzeno e Oídio em mudas de Eucalipto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BIZI, R.M.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C.G.; MAY DE MIO, L. L. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. **Summa Phytopathologica**. v.34, n.2, p.144-148, abr./jun. 2008.

BONATO, C. M. Homeopatia em modelos vegetais. **Cultura Homeopática**. n. 21, p. 24-28, out./dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit 2015**: sistema de informação. Brasília, 2002. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 18 out. 2015.

BROWN, B. N.; FERREIRA, F. A. Diseases during propagation of eucalypts. In: KEANE, P. J.; KILE, G. A.; PODGER, F. D.; BROWN, B. N. (Ed). **Diseases and pathogens of Eucalypts**. Collingwood: CSIRO Publish. 2000 p. 119-151.

BUTIN, H., PERENO, H. **Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile**. Berlín: J. Cramer, 1988.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CAPIEAU, K.; STENLIND, J.; STENSTRÖM, E. Potential for Biological Control of *Botrytis cinerea* in *Pinus sylvestris* Seedlings. *Scandial Journal of Forest Research* , v.19, p.312-319, 2004.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; AMARAL, L.S.; GARCIA, F. A.O. **Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças**. *Horticultura Brasileira*. vol.27, n.3, p.340-344, Set. 2009.

CIFLORESTAS – Centro de Inteligência de Florestas. Disponível: <<http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>> Acesso em: 23 jun.2014.

CHAMBERLAIN, K., CRAWFORD, D. L. In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygrosopicus* strains YCED9 and WYE53. **Journal of Industrial of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 641-6, jul.1999.

CHARTER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 361, p.761-798, mai. 2006.

CIAMPI, L., GONZALEZ, S. y SCHNETTELER, E. Enfermedades de arbustos frutales menores. In: BARRIGA, P.; NEIRA, M. (Ed). **Cultivos no tradicionales**. Valdivia: Serie Avances de producción y Sanidad vegetal. 1993. P. 39-62.

CHOUDHURY, M. M. **Uva de mesa: Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2001.

CONN, V. M.; WALKER, A. R.; FRANCO, C. M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 21, n. 2, p.208–218, fev. 2008.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2009. p. 224-237.

CUNHA, J. F.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Efeito “in vitro” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* sp. **Revista Árvore**, Viçosa. v.30. n. 6. Nov/Dec. 2006.

DEL QUIQUI, E. M.; MARTINS, S. S.; SHIMIZU, J. Y. Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* para o Noroeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1173-1177, 2001.

DIEHL, M.; FERLA, N. J.; JOHANN, L.. Plantas associadas à videiras: uma estratégia para o controle biológico no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 79, n. 4, p. 579-586, mai. 2012.

EHR, R.J. & KEMMITT, G. Periodic table of the fungicides. **Dow Agrosciences**, Indianópolis: v. 1. 2002.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 7, p. 42 - 44, jan.1971

EL-ABYAD, M.S.; EL-SAYED, M.A.; SHANSHOURY, A. R., SABBAGH, S.M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.149, n.2, p.185-195, fev.1993.

ELAD, Y.; STEWART, A. Microbial control of *Botrytis* spp. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. (Ed). **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht: Springer. 2007. p. 223- 41.

ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**. v. 42, n. 3, p. 324–332, jun. 1993.

EL-TARABILY, K.A., NASSAR, A.H. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n. 5, p. 1765-1766, nov. 2009.

ERRAKHI, R.; BOUTEAU, F.; LEBRIHI, A.; BARAKATE, M. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 1503-1509, nov.2007.

FERNANDES, C. F. F.; VIERA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Porto Velho: Documento 133. EMBRAPA. 2009.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal, principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1989.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVAL, P. T.; ODA, S.; A, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**. v.287, n.1, p. 8-14. 2008.

FURTADO, E. L.; DIAS, D. C.; OHTO, C. T.; ROSA, D. D. **Doenças do Eucalipto no Brasil**. Botucatu: UNESP. 2009.

GARRITY, G.M.; BERNNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer. 2005.

GE, B.B.; CHENG, Y.; LIU, B. H.; ZHANG, K. C. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants using *Streptomyces ahysroscopicus* strain CK-15. **Letters in Applied Microbiology**, v.61, n. 6, p. 596- 602, dez. 2015.

GUERRA, C. B. Environment and work in the *Eucalyptus* world: a case study from the Piracicaba River region, in Minas Gerais, Brazil. **Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos**. Salvador, p. 17-24. 1997.

GONÇALVES, J.L.M.; POGGIANI, F. Substrato para produção de mudas florestais. In: SOLO-SUELO- CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13, 1996. Águas de Lindóia. **Resumos expandidos...** Águas de Lindóia: SLCS: SBSCS: ESALQ/USP: CEA-ESALQ/USP: SBM, 1996.

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

GRAM, C. **Ueber die isolirte Fibrung der. Schizomyceten iu Schnitt-und Trockenpreparaten**. Fortschitte der Medicin, 1884.

GRIFFITHS, R. G.; DANCER, J.; HARWOOD, J. L. The effects of Iprodione on the lipid metabolism of *Botrytis cinerea*. **Biochemical Society Transactions**. v. 26, n.2, p. S155. 1998.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; FIGUEIREDO, A. S.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 155-165, jun./dez. 2000.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. **Estratégia de manejo de doenças em viveiros florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001.

GUIMARÃES, A. M.; DAL SOGLIO, F. Desenvolvimento participativo de controle biológico da mancha preta dos Citros na Região *do Vale do Caí*, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, 2007.

IBÁ – INDUSTRÍA BRASILEIRA DE ÁRVORES: Relatório IBÁ 2015. Disponível em: < <http://iba.org/pt/biblioteca-iba/publicacoes> > Acesso em: 20 mar. 2016.

KAEWKLA, O.; FRANCO, C. M. *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface sterilized stem of a Grey Box tree. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 2818- 2822, dez. 2010.

KAEWKLA, O.; FRANCO, C. M. *Pseudonocardia eucalypti* sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from the surface-sterilized root of a native Australian eucalyptus tree. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 61. p. 742- 746, abr. 2011.

KEANE, P. J.; KILE, G. A.; PODGER, F. D.; BROWN, B. N. **Diseases and pathogens of eucalypts**. Australia: CSIRO. 2000.

KIM, Y. S.; LEE, K., YUN, B. S. Antagonistic Effect of *Streptomyces* sp. BS062 against *Botrytis* Diseases. **Mycobiology**. v. 43, n. 3, p. 339-342, set. 2015.

KIM, K. J.; YANG, Y. J.; KIM, J.G. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 2, p. 185-189. 2003.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Journal of Microbiology**, Canadian, v. 48, n. 9, p. 772–786, set. 2002.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 4. ed, v. 2, p. 319-332, 2005.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

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, 2010.

- LAU, D.; GRIGOLETTI JUNIOR A. Patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* em espécies de *Ilex* e *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 22., p. 274, 1997.
- LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of Actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 21, p. 71-100, 1967.
- LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control**. v. 61, n. 2, p. 113- 120, mai. 2012.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- LISBOA, B. B.; BOCHESI, C. C.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, J. R. P.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A. M. R. *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5. 2007.
- LOQMAN, S.; BARKA, E. A.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** .v. 25. n. 1, p. 81-91, jan. 2009.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; LEITE, F. P., SOUZA, F. L. Variáveis climáticas associadas à incidência de mofo-cinzento em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. v.31, n. 2, p.152-157, abr. 2006.
- MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: EDUC, 2001.
- MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. C.; SENA, K. X. F. R. Controle biológico de bactérias fitopatogênicas pelo uso de actinomicetos. **Cadernos Omega**, Série Agronômica, Recife, v. 4, p. 19-27, 1993.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M.P.; GOMES, A. M.A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para a agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.
- MELO, F. M. P. **Bioprospecção de actinobactérias rizosféricas de milho (*Zea mays* L.) com atividade antifúngica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP)/ Instituto Butantã / Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) , São Paulo, 2009.
- MIYAUCHI, M. Y. H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria Angustifolia***. Tese. (Doutorado em Ciências:

Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, 2012.

MOORMAN, G. W. Botrytis Or Gray Mold. **Penn State** – College of Agricultural Sciences. Disponível em: <<http://extension.psu.edu/pests/plant-diseases/all-fact-sheets/botrytis-or-gray-mold>> Acesso em: 22 jan. 2014.

NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. **Actinomicetos no solo**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa , 2008.

OLIVEIRA, S. R. **Atividade antagonística de actinomicetos contra *Botrytis cinerea*, patógeno da videira (*Vitis sp.*)** Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M. J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 346–352, mar. 2010.

PAINE, T. D.; STEINBAUER, M. J.; LAWSON, S. A. Native and exotic pests of Eucalyptus: A worldwide perspective. **Annual Review of Entomology**. v. 56, p. 181-201, ago. 2011.

PAPPAS, A.C.; FISHER, D. J. A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. **Pesticide Science**. v. 10, p. 239 -246, jun. 1979.

PARCK, C.N.; LEE, J. M.; LEE, D.; KIM, B. S. Antifungal activity of valinomycin, a peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. Strain M10 antagonistic to *Botrytis cinerea*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.18, n. 8, p.880-884, mai. 2008.

PATEKOSKI, K. S.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. Patogenicidade de *Pythium aphanidermatum* a alface cultivada em hidroponia e seu biocontrole com *Trichoderma*. **Pesquisa agropecuária. brasileira**, Brasília, v.45, n.8, p.805-810, ago. 2010.

PAULITZ, T. C., BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**. v. 39, p.103-133, set. 2001.

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. Tese (Doutorado em fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PERRYMAN. S.; FITT, B.; HAROLD, J. Fatores que afetam o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em linhaça (*Linum usitatissimum*) brotos, flores e cápsulas. **Biol. Applied Anual**. v. 140, p.1-12. 2002.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. The ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural**, v.43, n.10, p. 1797-1803, out. 2013

PORSANI, M. V. **Variabilidade Espacial de Fungos da Região Entre-Marés da Ilha do Mel –Paraná**. Monografia de graduação em Ciências Biológicas – Centro de Estudos do Mar. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PORSANI, M. V. A., **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PORSANI, M. V.; AMATUZZI, R. F.; OLIVEIRA, B. H.; BARATTO, L. C.; DALITZ, C. A.; BOZZA, A.; MARANGONI, P. R.; DALZOTO, P. R.; KOLM, H. E.; PIMENTEL, I. C. Antimicrobial potential of fungi and actinobacteria isolated from sandy sediments of intertidal regions. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, p. 899-913, 2013.

PROCÓPIO, R.E.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR, W.; AZEVEDO, J.L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and Molecular Research**. v.24, n. 8, p. 1408-1422, nov. 2009.

QUECINE, M. C.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol, **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, n.6, p. 486-491, dez. 2008.

RIBEIRA, A.; COTORAS, M.; ZUNIGA, G. E. Effect of extracts from in vitro-grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. On *Botrytis cinerea* Pers. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.8, p1802- 1822, abr. 2008.

ROBERTS, M. A.; CRAWFORD, D. L. Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus-and strains-specific *Streptomyces* DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2555 – 2564, jun. 2000.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos**. Viçosa: UFV, 2007.

RONSEAU, S., CLÉMENT, C. BARKA, E. Interaction of *Ulocladium atrum*, a Potential Biological Control Agent, with *Botrytis cinerea* and Grapevine Plantlets. **Agronomy**. v. 3 p. 632-647, set. 2013.

SADEGHI, A., KARIMI, E., DAHAZI, P.A., JAVID, M.G., DALVAND, Y., ASKARI, H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil condition. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.28, n. 4, p. 1503–1509, nov. 2012.

SALLA, T. D.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Defense responses in plants of *Eucalyptus* elicited by *Streptomyces* and challenged with *Botrytis cinerea*. **Planta**. v.243, n.4, p. 1055-1070, abr. 2016.

SANFUENTES, E.A.; FERREIRA, F.A. Seleção de fungos para o biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 21, p.147-153. 1997

SANFUENTES, E.A, ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & SILVEIRA, S.F. Comparison of baits to quantify inoculum density of *Rhizoctonia* spp. in *Eucalyptus* clonal garden soils. **Australasian Plant Pathology** v.31, n. 2, p. 177-173, jun. 2002.

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: EMBRAPA, 2001. Circular Técnica 45.

SANTOS, J. F. **Actinobactérias e adubação verde no manejo de *Scutellonema bradys*, no crescimento e nutrição de plantas de inhame**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias: Área de Concentração em Fitotecnia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

SBRAVATTI JUNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, A. F.; SCHULTZ, B. Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, v. 43, n. 1, p. 145 -152, jan. /mar. 2013.

SCHREY, S. D.; TARKKA, M. T. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. **Antonie Van Leeuwenhoek**.v. 94, n. 1, p. 11- 19, jun. 2008.

SCHULTZ, B. **Levantamento de Doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos Estados do Paraná e Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SEMEDO, L. T. A. S. **Atividade antimicrobiana e celulolítica de actinomicetos isolados de solos brasileiros**. Dissertação (Mestrado Biotecnologia Vegetal - Microbiologia Aplicada) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1997.

SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. Isolamento e seleção massal de actinomicetos antagônicos a *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Ceres**, Viçosa. v. 48, n. 277, p. 285-291, mai./jun. 2001.

SILVA, M. D. D.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; ZAUZA, E. A. V. Etiologia do oídio do Eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. n. 26, p. 201-205, jun. 2001.

SILVA, J. C.M.; COELHO, L. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinérea*, fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus sp.* em viveiros florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 27-36. 2003.

SILVA, J. S.; COIMBRA, J. L.; GONCALVES, D. G.; AFONSO, G.O. Inibição in vitro do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza On Line**, Espírito Santo, v. 11, p. 15-19, fev. 2013.

SILVA, L. J., CREVELIN, E. J., SOUZA, W. R., MORAES, L. A. B., MELO, I. S., ZUCCHI, T. D. *Streptomyces araujoniae* produces a multiantibiotic complex with ionophoric properties to control *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**. v.104, n. 12, p. 1298-1305, dez. 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. **World congress on computers in agriculture**, American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, A. C.; RESENDE, M. L. V.; SOUZA, P. E.; PÔSSA, K. F.; SILVA JÚNIOR, M. B. S. Extrato vegetal, fosfito e sulfato de zinco no controle do oídio em eucalipto. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 4, n.1, p. 93-100, jan./ mar. 2016.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S. *Streptomyces* antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1897-1900, jun. 2009.

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1, p.195-203, 2009.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. Description of *Bogoriellaceae* fam. nov., *Dermacoccaceae* fam. nov., *Rarobacteraceae* fam. nov. and *Sanguibacteraceae* fam. nov. and emendation of some families of the suborder Micrococccineae. **International Journal of Systematic and Evolutionay Microbiology**. v. 50, n. 3, p.1279–1285, mai. 2000.

SUTTON, J. C.; LI, D-W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 316 - 328, abr.1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOFOLI, J. F; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E. M. C. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 11-20, jan/jun. 2011

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALLEJO, I.; CARBÚ, M.; MUÑOZ, F.; REBORDINOS, L.; CANTORAL, J. M.; Inheritance of chromosome-length polymorphisms in the phytopathogenic ascomycete *Botryotinia fuckeliana* (anam. *Botrytis cinerea*). **Mycological Research** v. 106, p. 1075-1085, set. 2002.

VALVERDE, S. R.; SOARES, N. S.; SILVA, M. L. da; JACOVINE, L. A. G.; NEIVA, S. A. O comportamento do mercado da madeira de Eucalito no Brasil. **Biomassa & Energia**, Viçosa, v. 1, n. 4, p. 393-403, out./dez. 2004.

VIJAYABHARATHI, R.; SATHYA, A.; GOPALAKRISHNAN, S. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**: Research Perspectives. India: Springer, 2016.

WELBAUM, G.; STURZ, A. V.; DONG, Z.; NOWAK, J. Managing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Scienc**, v. 23, n.2, p.175 –193, ago. 2010.

WHITE, J. G.; LINFIELD, C. A.; LAHDENPERA, M. L. Mycostop - a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*. **Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases**. v. 1. 1990

WILLIAMS, S. T., SHARPLES, G. P. The fine structure of the Actinomycetales. In: SYKES, G.; SKINNER, F. A. (Ed.) **Actinomycetales Characteristics and Practical Importance**. London: Academic Press, 1973. p. 113-130.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNKI, P.; VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular plant pathology**. v. 8, n.5, p. 561–580, set. 2007.

YOHALEM, D.S. Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 9 – 15, fev. 2004.

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

## ANEXO 1 – MEIO DE CULTURA UTILIZADOS

### 1.1 Meio Sabouraud

Glicose..... 40,0 g  
 Peptona.....10,0 g  
 Ágar.....15,0 g  
 Água destilada.....1000 mL  
 pH a 25°C 5,6 ± 0,2

### 1.2 Meio Czapeck Dox

Sacarose..... 30,0 g  
 Nitrato de Sódio..... 3,0 g  
 Fosfato Dipotássio..... 1,0 g  
 Sulfato de Magnésio..... 0,5 g  
 Cloreto de Potássio..... 0,5 g  
 Sulfato Ferroso..... 0,01 g  
 Água destilada..... 1.000 mL  
 Ágar.....15,0 g  
 pH a 25°C 7,3 ± 0,2

### 1.3 BDA- Batata-dextrose ágar

Infusão de batata.....4,0 g  
 Dextrose.....20,0 g  
 Ágar.....20,0 g  
 Água destilada.....1.000 mL  
 pH á 25°C 4,0 - 4,5 ± 0,2

### 1.4 Meio ISP-2 – Ágar extrato de levedura – extrato malte

Extrato de levedura.....4g  
 Extrato de malte.....10g  
 Glicose.....4g  
 Amido.....5g  
 Ágar.....20g  
 Água destilada..... 1000mL  
 pH á 25°C 7,2

### 1.5 Ágar caseína amiga - ACA

Amido.....10g  
 Caseína.....0,3g  
 Nitrato de portássio.....2g  
 Cloreto de sódio... ..2g  
 Fosfato Hidrogenado dipotássio... 2g  
 Sulfato de Magnésio.....0,05g  
 Carbonato de cálcio.....0,02g  
 Sulfato ferroso.....0,01g  
 Ágar.....20g  
 Água destilada.....1000 mL  
 pH á 25°C 7,2