

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANDRESSA VON WURMB HELRIGHEL LEITE

**RIZOBACTÉRIAS *STREPTOMYCES* NO CRESCIMENTO E NA DEFESA DE PLANTAS DE
SOLANUM LYCOPERSICUM (L.)**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANDRESSA V. W. HELRIGHEL LEITE

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Medina da Silva

**RIZOBACTÉRIAS *STREPTOMYCES* NO CRESCIMENTO E NA DEFESA DE
PLANTAS DE *SOLANUM LYCOPERSICUM* (L.)**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular e Molecular pela Faculdade de
Biotecnologia da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

L533 Leite, Andressa Von Wurmb Helrighel

Rizobactérias Streptomyces no crescimento e na defesa de plantas de *Solanum lycopersicum* (L.) / Andressa Von Wurmb Helrighel Leite . – 2017.

61 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita.

Co-orientador: Prof. Dr. Renata Medina Da Silva.

1. PGPR. 2. Biocontrole. 3. *Alternaria solani*. 4. tomate. I. Astarita, Leandro Vieira. II. Da Silva, Renata Medina. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita e à Profa. Dra. Renata Medina da Silva por terem me acolhido na PUCRS e em seus laboratórios, mesmo sabendo que eu teria o grande desafio de conciliar gestação, família, trabalho e pós-graduação. Obrigada, serei sempre grata pela confiança.

O apoio da família, dos amigos, e dos colegas de trabalho foi imprescindível para eu conseguir chegar até aqui. Meu marido, e melhor amigo, Carlos Eduardo Leite sempre tomou conta do nosso filho Eduardo com muito carinho nas minhas ausências, e sempre me acolheu com amor e paciência. Você me manteve forte, e foi meu principal pilar para conseguir levar este desafio até o fim. Obrigada, amor. Eu jamais teria conseguido sem você.

Eduardo Helrighel Leite, meu lindo filho, nasceu nessa época atribulada da minha vida: obrigada por existir, por fazer meus dias mais felizes, por me receber diariamente com o sorriso mais lindo do mundo. Você completou dois anos, e meu mestrado também. Eu te amo, obrigada pelo amor e carinho. Eu prometo sempre zelar por ti, até o fim.

Devo agradecer sobretudo aos meus pais: minha mãe, Ercilda Luzia Helrighel, sempre foi meu exemplo de mulher. Ela sempre batalhou ao máximo pelas suas conquistas, e sempre foi mãe e esposa carinhosa. Te amo muito mãe, obrigada por todo o suporte afetivo e emocional. Pai, Gino Álvaro Helrighel, você é dono do coração mais bonito que eu conheço. Obrigada por todo seu amor, confiança e aposta nos meus sonhos. Eu te amo muito, obrigada! Espero ser para o Dudu tudo o que vocês são na minha vida. À minha irmã Stephanie Helrighel, obrigada por todo o companheirismo e apoio. Eu te amo!

Aos colegas de laboratório Ellen Souza e Matheus Scherer, muito obrigada pelos conselhos, e principalmente por auxiliarem a conduzir os experimentos em momentos que eu não podia estar no laboratório. Eu não teria conseguido sem vocês, obrigada pela amizade.

Aos meus alunos, obrigada por compreenderem os atrasos nas entregas de provas e correções. Obrigada pelo incentivo, pela alegria, por tudo.

Quem tem amor conquista tudo.

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é constantemente atacado por diversos patógenos, levando a perdas de produtividade. Dentre os principais patógenos, destaca-se o fungo *Alternaria solani* que causa a doença “pinta-preta” (“*Early blight*”), capaz de reduzir a produção e/ou levar à formação de frutos de baixa qualidade. Devido à grande susceptibilidade do tomateiro a patógenos, as práticas agrícolas incluem o uso intensivo de agroquímicos que resultam, frequentemente, em tomates com altos níveis residuais de pesticidas. A promoção do crescimento e da defesa vegetal utilizando microrganismos representa uma ferramenta para o manejo do tomateiro. Dentre as diversas rizobactérias com capacidade de modular o crescimento e a defesa vegetal, o gênero *Streptomyces* vem se destacando. Estas bactérias são capazes de sintetizar moléculas que interferem tanto diretamente no crescimento, como a auxina e a ACC desaminase, quanto indiretamente, através da produção de antibióticos e sideróforos. Pretendeu-se, neste trabalho, selecionar isolados de *Streptomyces* (CLV04, CLV05 e CLV07) com capacidade de promover a germinação e o crescimento de plantas de tomate, além de aumentar a resistência vegetal contra *A. solani*. Os resultados demonstram que o CLV07 causou retardo na germinação, mas não reduziu a taxa final de germinação. Apesar das rizobactérias CLV04, CLV05 e CLV07 produzirem elevados níveis de auxina, elas causaram a redução do crescimento tanto da raiz quanto da parte aérea de plântulas de tomate cultivadas *in vitro*. O CLV07 foi eficiente na promoção da defesa de plantas de tomate contra *A. solani*. Todas as rizobactérias apresentaram antagonismo por competição, reduzindo o crescimento do micélio do fungo *A. solani*. Considerando todos os resultados, as diferentes bactérias *Streptomyces* foram prejudiciais à germinação e ao crescimento inicial de plântulas de tomate. Desta forma, não é recomendável a utilização destas bactérias em sementes e plântulas jovens. Contudo, o CLV07 apresenta potencial para ser utilizado para a indução de resistência de plantas de tomate contra o patógeno *A. solani*.

Palavras-chave: PGPR, biocontrole, *Alternaria solani*, tomate

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) cultures are frequently attacked by many pathogens, leading to yield losses. Among the pathogens, the fungus *Alternaria solani* (“*Early blight*” disease) can cause significant yield reductions and decreases the fruit quality. Due to the high susceptibility of tomato to fungal pathogens, the agricultural practices include the intensive use of agrochemicals, which may result in fruits with high levels of residual pesticides and higher production costs. The promotion of plant defense system represents an additional tool for disease control and plant growth management. Some rhizobacteria have been shown the ability to affect plant development and modulate plant defense against pathogens. Among those bacteria, the genus *Streptomyces* is able to synthesize molecules that directly interfere with growth, through auxin and ACC deaminase production, and indirectly, through antibiotics and siderophores synthesis. The aim of this work was to select *Streptomyces* (CLV04, CLV05 and CLV07) with the ability to promote seed germination and plant growth, as well as improve tomato plant resistance against *A. solani*. Results showed that CLV07 delayed the initial seed germination, but it did not impair the final germination process. However, CLV04, CLV05 and CLV07 reduced the early root and shoot growth. All these rhizobacteria produced high auxin levels. CLV07 was efficient for inducing plant resistance against *A. solani*. Furthermore, all CLVs showed antagonism by competition, decreasing the *A. solani* growth. Taking together all results, *Streptomyces* tested were deleterious for seed and initial plant growth, but CLV07 showed a potential to be used for inducing plant resistance. However, the inoculation of these rhizobacteria on seeds is not recommended.

Keywords: PGPR, biocontrol, *Alternaria solani*, tomato.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: ácido 1-aminociclopropano carboxílico
ACCO: ACC oxidase
AIA: Auxina
AJ: Ácido Jasmônico
ANVISA: Agência de Vigilância Sanitária
AS: Ácido Salicílico
CAT: Catalase
DAMPS: Damage Associated Molecular Patterns
ERF: Ethylene Responsive Factor
EROS: Espécies Reativas de Oxigênio
ET: Etileno
ETI: Effector triggered immunity
HR: Hypersensitive Response
ISR: Induced Systemic Resistance
LRR: Leucine Repeat Rich
MAMPS: Microbial Associated Molecular Patterns
NB: Nucleotide Binding
NPR1: Nonexpressor of PR Genes1
PAL: Fenilalanina Amônia Liase
PAMPS: Pathogen Associated Molecular Patterns
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PR: Pathogenesis Related
PRRs: Transmembrane Pattern Recognition Receptors
PTI: PAMP-triggered immunity
SAR: Systemic Acquired Resistance
VOCs: Compostos Orgânicos Voláteis

Sumário

CAPÍTULO I	9
1. Introdução	10
1.1 <i>Solanum lycopersicum</i> (L.)	10
1.2 <i>Alternaria solani</i>	11
1.3 Rizosfera, rizoplano e rizobactérias	14
1.4 <i>Streptomyces</i>	15
1.5 Mecanismos de defesa vegetal	17
2. Justificativa	21
3. Hipóteses	22
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo Geral.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
Referências	24
CAPÍTULO II - Artigo Científico	30
1. Introduction.....	32
2. Material and Methods	34
2.1 <i>Microorganisms</i>	34
2.2 <i>Seed microbialization</i>	35
2.3 <i>Seed germination and plant growth</i>	35
2.4 <i>Determination of auxin produced by Streptomyces sp.</i>	35
2.5 <i>Antibiosis</i>	36
2.6 <i>Plant defense</i>	36
2.7 <i>Statistics</i>	37
3. Results and Discussion	37
References	44
CAPÍTULO III - Conclusões e Perspectivas	30
1. Conclusões.....	30
2. Perspectivas	58
3. Material Suplementar	59

CAPÍTULO I

Introdução, Justificativa, Hipóteses e Objetivos

1 Introdução

1.1 *Solanum lycopersicum* (L.)

Diversas espécies selvagens do gênero *Solanum* crescem espontaneamente na região andina, sendo atribuído aos Incas o cultivo e a domesticação do tomate. Contudo, foram os povos pré-colombianos do México, integrados à cultura Asteca, que selecionaram e cultivaram o tomate em larga escala. Somente no século XVI o tomate chegou na Europa, difundido por espanhóis e portugueses (Haak *et al.*, 2014).

Tomateiros são eudicotiledôneas, pertencem à ordem Solanales, à família Solanaceae, e ao gênero *Solanum*. Para o tomate cultivado, atualmente utiliza-se a classificação sugerida por Linnaeus, *Solanum lycopersicum* (Shirahige, 2009). Estas plantas são herbáceas e seu crescimento é, geralmente, ilimitado (indeterminado), ou limitado (determinado). No hábito de crescimento indeterminado, o ramo principal cresce mais que as ramificações laterais (dominância apical), podendo ultrapassar os dois metros de altura, e seus frutos geralmente são comercializados para consumo *in natura*. Em plantas de tomate cujo crescimento é determinado, cada galho apresenta um ramo floral apical que limita o desenvolvimento vegetativo. Neste caso, suas hastes atingem cerca de um metro de altura, e seus frutos destinam-se à agroindústria (Filgueira, 2008).

O caule do tomateiro é flexível, piloso, e apresenta abundantes ramificações laterais. O sistema radicular do tomateiro é composto por raiz principal (pivotante) e raízes laterais. Grande parte delas está a menos de vinte centímetros de profundidade, mas a raiz pivotante pode chegar a um metro e meio de profundidade, caso não ocorra barreiras ao seu crescimento. As folhas do tomateiro são compostas e alternadas, com margens dentadas. Suas flores são pequenas e amarelas, monoicas, em formato de cachos ou racemo, e ocorrem em inflorescências cimeiras simples, bifurcadas ou ramificadas (Da Silva e De Brito Giordano, 2000). Os frutos são carnosos do tipo baga, e podem apresentar variação de cores entre verde, amarelo e vermelho vivo (De Melo, 1989). Eles são divididos em lóculos onde as sementes encontram-se imersas na mucilagem placentária. Dependendo do cultivar, os frutos podem ser biloculares, triloculares, tetraloculares ou

pluriloculares. O formato do fruto define as variedades do tomate de mesa no Brasil: santa cruz, salada ou saladete, caqui, italiano, cereja e penca (Ferreira *et al.*, 2004).

O tomate é considerado uma das principais hortaliças comercializadas no planeta. Nestas condições, o Brasil coloca-se como o oitavo maior produtor mundial de tomates, tendo sido cultivada uma área de aproximadamente 109.657 hectares em 2015 (Faostat, 2015). Devido à suscetibilidade do tomateiro a diversas pragas e doenças, é prática comum utilizar agrotóxicos no manejo desta cultura. De acordo com análises referentes à concentração de agrotóxicos realizadas/encomendadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no ano de 2007, o tomate, juntamente com a alface e o morango, foram os alimentos que apresentaram o maior número de inconformidades nos resultados. Foram realizadas análises em 153 amostras de tomate, sendo que 55 delas foram reprovadas (Anvisa, 2014).

1.2 *Alternaria solani*

O gênero *Alternaria* pertence ao filo Ascomycota, à ordem Pleosporales e à família Pleosporaceae (Sayers *et al.*, 2009). Este gênero compreende um grande e importante grupo de fungos filamentosos patogênicos que causam perdas econômicas consideráveis na agricultura e na indústria de processamento de alimentos, causando doenças em plantas como batateira, tomateiro, salsa, cenoura e brássicas (Zur *et al.*, 2002).

A espécie *Alternaria solani* ataca principalmente solanáceas como batata e tomate. Ela é responsável pela doença foliar denominada de “pinta-preta”, também conhecida como “mancha de alternária”. O micélio deste patógeno se torna mais pigmentado conforme a cultura fúngica envelhece, escurecendo ao longo do tempo. Seus conídios (esporos gerados por mitose) são formados individualmente, ou em uma cadeia dupla - em conidióforos distintos. Eles se apresentam em forma de clava invertida e com bico, e podem apresentar de 9 a 11 septos transversais, assim como septos verticais, apresentando uma célula terminal longa (Figura 1). A variabilidade morfológica e de patogenicidade entre isolados de *A. solani* sugere a existência de raças, mas até o momento isto permanece sem confirmação (Kemmitt, 2002).

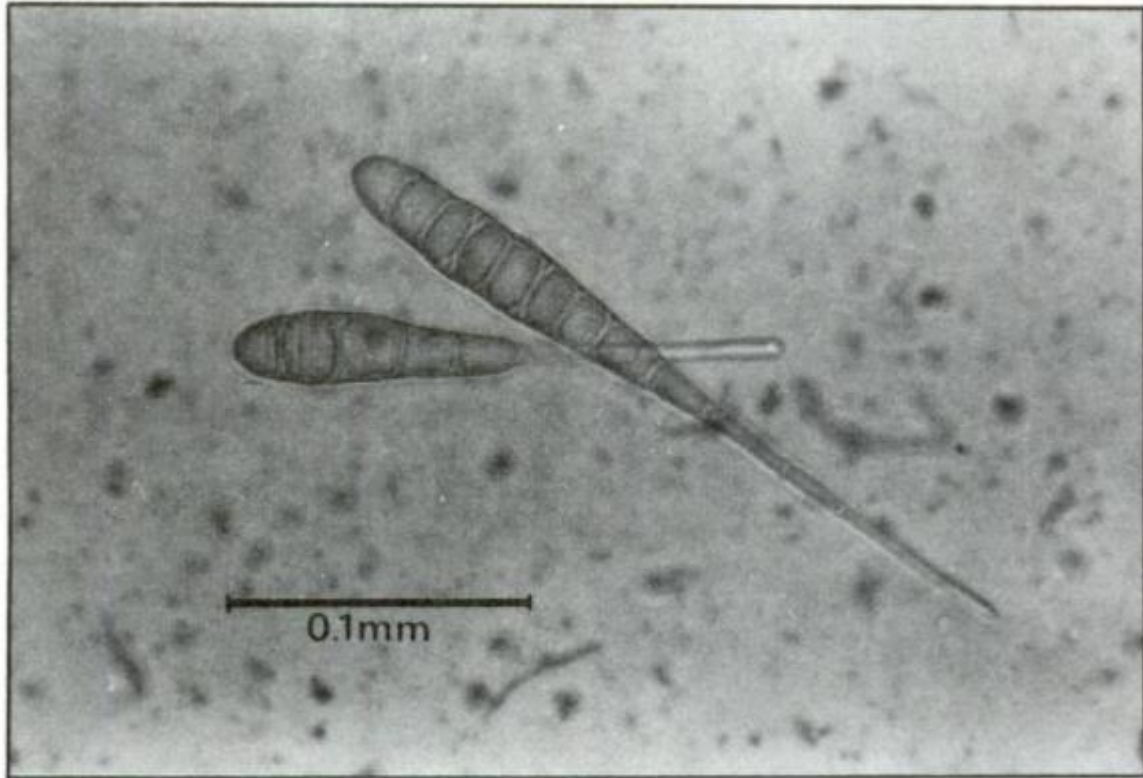


Figura 1 – Esporos (conídios) de *A. solani* têm coloração escura, formato de clava, são septados e apresentam uma célula terminal longa (Zachmann, 1982).

A. solani é um patógeno policíclico, pois muitos ciclos de infecção são possíveis durante uma temporada. Infecções primárias em jovens plantas de batata podem ser causadas por inóculos (micélios ou conídios) em hibernação (Pscheidt, 1985). O patógeno hiberna como micélio ou conídio em detritos vegetais, solo, tubérculos infectados ou em outras plantas hospedeiras da mesma família (Shuman, 1995). Estes inóculos permanecem infectantes em detritos presentes em solo não-cultivado entre cinco e oito meses. A pigmentação escura das hifas aumenta sua resistência à lise. Os esporos sobrevivem mais frequentemente em detritos e sementes infectadas (Rotem, 1994).

O inóculo primário gera conídios que são dispersos pela água ou pelo vento para as folhas mais baixas da planta, nas quais eles germinam, infectando-as. Vento, chuva e insetos são os principais métodos de disseminação de *A. solani* (Rotem, 1994). Em condições ótimas os conídios de *A. solani* podem iniciar a germinação em 30 minutos (Zachmann, 1982). Os tubos germinativos formam um apressório e penetram na epiderme

vegetal diretamente através de estômatos ou feridas. As infecções primárias se tornam necróticas, com halos cloróticos. O micélio, nas lesões necróticas, produz conídios que infectam folhas saudáveis, que por sua vez iniciam infecções secundárias (Shuman, 1995). Os tubos germinativos ressecados do patógeno podem retomar o crescimento quando reidratados: desta maneira, a infecção pode ocorrer em períodos em que umidade e seca se alternam. A esporulação ocorre de maneira significativa depois de chuvas fortes ou orvalho (Van Der Waals *et al.*, 2001).

O tempo necessário para surgirem os sintomas depende das condições ambientais, idade da folha, e susceptibilidade da planta. As lesões são geralmente visíveis nas folhas mais velhas entre 5 a 7 dias após a infecção, em condições de elevada umidade e temperatura (Alvarenga, 2013). O ciclo de vida do patógeno (esquematizado na Figura 2) é curto, o que favorece sua dispersão.

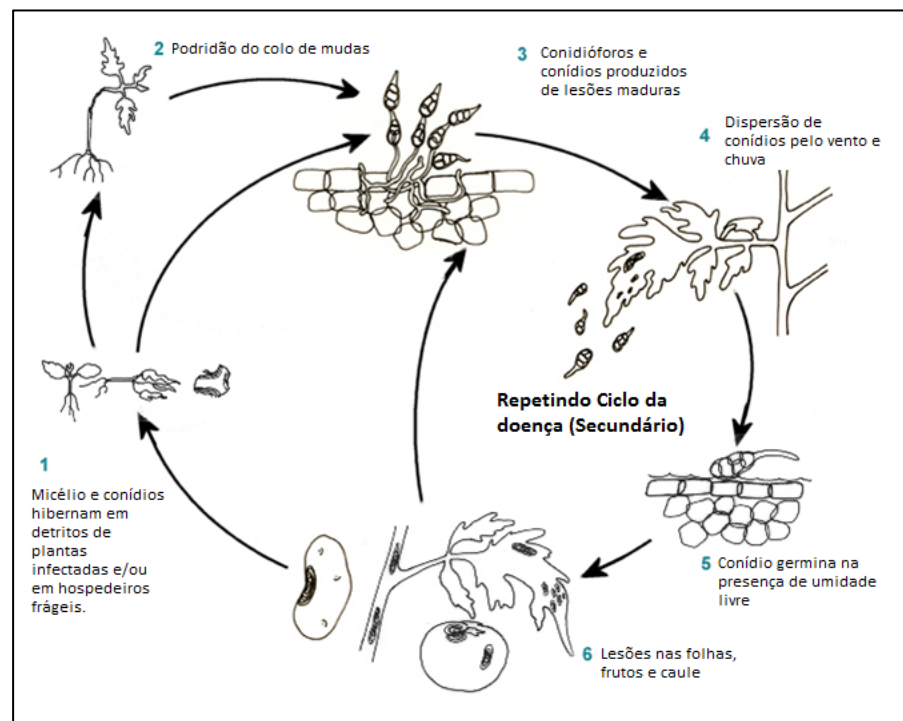


Figura 2– Fases do ciclo de vida de *A. solani* em tomate. Adaptado de Kemmitt, 2002.

A doença ocorre em praticamente todas as regiões onde o tomateiro é cultivado. De acordo com Madden e cols. (1978), dentre os sintomas mais comuns observados em tomateiro, estão os danos nos frutos e a redução da área foliar fotossintetizante. Além

disso, todas as partes do vegetal são vulneráveis ao fungo, mas as folhas manifestam os sintomas de forma mais intensa: manchas pequenas, de coloração marrom à preta. Conforme a doença progride, as manchas escuras ganham anéis concêntricos (que surgem devido ao crescimento irregular do fungo durante períodos de luz e escuro) (Figura 3a). Em ataques graves, pode ocorrer a perda das folhas, com a consequente morte da planta. Já nos frutos, ocorre necrose na inserção do pedúnculo (entre o cálice e o fruto), manifestando-se como manchas afundadas com anéis concêntricos (Figura 3b). A doença, desta forma, causa a impossibilidade do consumo dos frutos (Alvarenga, 2013).

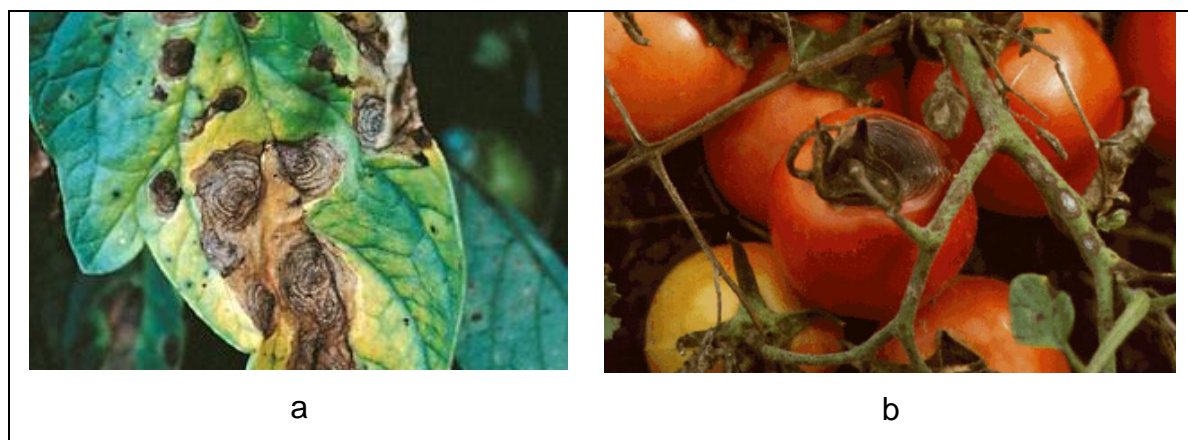


Figura 3 -Sintomas de *A. solani* em folhas(a) e frutos (b) de tomateiro (Kemmitt, 2002).

1.3 Rizosfera, rizoplano e rizobactérias

A rizosfera é caracterizada pelo volume de solo ao redor e sob a influência das raízes, enquanto o rizoplano corresponde às superfícies das raízes vegetais e aos elementos de solo fortemente aderidos a ela (Sylvia, 2005). Na rizosfera, as bactérias são os microrganismos mais abundantes colonizando intensamente as raízes das plantas. Elas são chamadas de rizobactérias e são capazes de se multiplicar e ocupar a maior parte dos nichos ecológicos encontrados nas raízes, em todos os estágios de crescimento vegetal, inclusive na presença de microbiota competidora (Pinton *et al.*, 2007).

Relações ecológicas extremamente importantes entre planta, solo, microfauna do solo, e microrganismos ocorrem nestas zonas. As interações podem influenciar no crescimento e no rendimento das culturas, em função das rizobactérias apresentarem

efeito neutro, benéfico ou deteriorante no crescimento e desenvolvimento das plantas. As bactérias neutras da rizosfera possivelmente não afetam o desenvolvimento vegetal, enquanto as deletérias podem afetar a planta por produzir metabólitos (como fitotoxinas ou fitormônios), por competir pelos nutrientes do solo, ou até por inibir os efeitos benéficos de micorrizas (Sturz e Christie, 2003). As bactérias promotoras de crescimento vegetal (*plant growth promoting rhizobacteria* - PGPR) são bactérias de vida livre que vivem na superfície dos vegetais e/ou penetram nos tecidos, causando infecções assintomáticas e não aparentes. Estas rizobactérias são referidas como bactérias epifíticas e endofíticas, respectivamente (Siddiqui, 2006).

As PGPRs podem promover o crescimento das plantas por mecanismos de ação diretos ou indiretos. Os mecanismos diretos incluem: produção de compostos voláteis bacterianos estimulatórios e/ou fitormônios; redução dos níveis de etileno nas plantas; estimulação de mecanismos de resistência a doenças; melhora da disponibilidade de nutrientes para a planta, como no caso de bactérias que promovem a liberação de fosfato e outros micronutrientes de fontes insolúveis, além da fixação de nitrogênio não-simbiótica (Bhattacharyya e Jha, 2012). Já foi demonstrado que algumas PGPRs conseguem proteger sementes da inibição do desenvolvimento em solo contaminado com metais pesados (Grobela *et al.*, 2015). Os mecanismos indiretos de promoção de crescimento incluem PGPRs com capacidade de atuar como biocontroladores de patógenos vegetais (produzindo antibióticos e antifúngicos), ou ao estimularem outras simbioses benéficas, ou ao degradarem agentes xenobióticos inibitórios em solos contaminados (Bhattacharyya e Jha, 2012).

1.4 *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* pertence à família *Streptomycetaceae*, à ordem Streptomycetales, bem como à classe Actinobacteria. Estas bactérias podem ser distinguidas de outros Actinomicetos por sua parede celular rica em glicina e ácido L-diaminopimélico. *Streptomyces* são aeróbios, Gram positivos, e apresentam grande parte do conteúdo genômico composto por guanina e citosina. Além disto, são quimiorganotróficos e crescem dentro de uma faixa de pH entre 5 e 11,5 (Salamoni, 2009).

Estas bactérias colonizam diferentes ambientes por meio de hifas que formam uma rede micelial. Inicialmente um micélio filamentososo coloniza o substrato. Depois de um período assimilativo de crescimento, hifas aéreas crescem no ar e eventualmente se partem para formar cadeias de exosporos pigmentados (Figura 4) (Claessen *et al.*, 2006). Diferentes *Streptomyces* constituem 30% da microbiota do solo, colonizam ambientes aquáticos, e podem ser isolados de plantas e animais. Além disso, o gênero inclui espécies acidófilas, alcalotolerantes, halofílicas e termotolerantes (Li *et al.*, 2005).

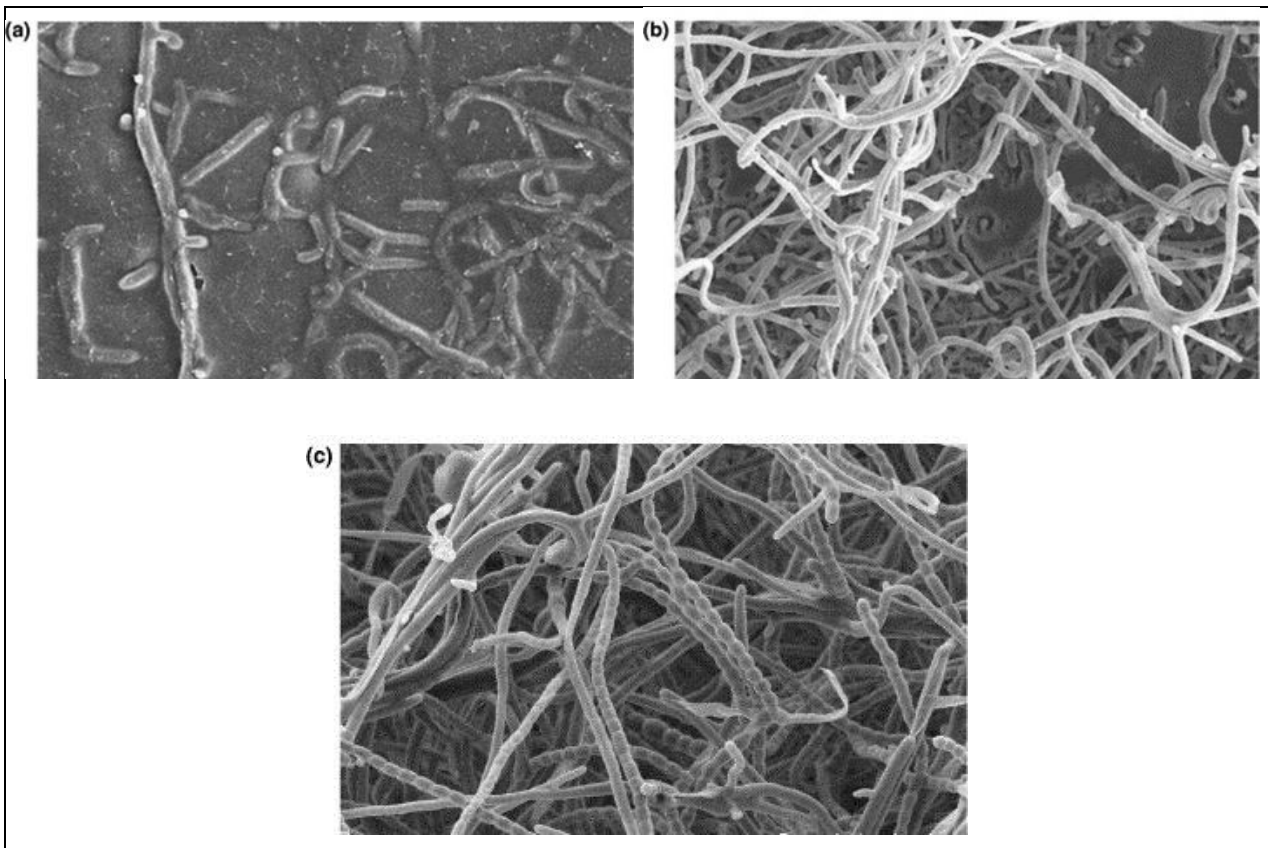


Figura 4 - Ciclo de vida de *Streptomyces* em meio sólido. (a) estruturas semelhantes a micélios filamentosos colonizando o substrato. (b) surgimento de estruturas semelhantes a hifas aéreas. (c) estruturas septadas formando cadeias de exosporos pigmentados (Claessen *et al.*, 2006).

Estreptomicetes são abundantes e importantes no solo, onde apresentam papel na reciclagem do carbono de detritos orgânicos insolúveis, particularmente de plantas e de

fungos. Esta ação é possibilitada pela produção de diversas exoenzimas hidrolíticas (Barka *et al.*, 2016).

Alguns representantes de *Streptomyces* são considerados PGPRs, pois são capazes de produzir compostos promotores de crescimento vegetal, tais como AIA, antibióticos, proteases extracelulares, sideróforos, Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs), entre outros (Salla *et al.*, 2014). O gênero também exibe uma disseminação filogenética bastante ampla. Além disto, eles produzem uma quantidade diversa de metabólitos secundários (como, por exemplo, os antibióticos): conseqüentemente eles são de grande interesse de estudo na medicina e na indústria (Barka *et al.*, 2016).

Em 2011, Dalmas e cols. avaliaram o efeito de três isolados de *Streptomyces* spp. (CLV04/PM1, PM4 e PM9) como promotoras de crescimento e moduladoras do metabolismo secundário de plântulas de *Araucaria angustifolia* (pinheiro do Paraná). Neste estudo, foi observado que todos os isolados foram capazes de produzir auxina e demonstraram competência em crescer e se desenvolver na superfície das raízes (Dalmas *et al.*, 2011). Baseado neste estudo, Salla e cols. (2014) utilizaram isolados de *Streptomyces* spp. como indutores de crescimento e moduladores do metabolismo secundário de plantas de *Eucalyptus* spp. *in vitro*. Os resultados indicaram haver uma resposta sistêmica na modulação das enzimas relacionadas à defesa vegetal, sugerindo a utilização destes microrganismos como agentes de biocontrole (Salla *et al.*, 2014).

A ação promotora de crescimento e moduladora de metabolismo dos isolados de *Streptomyces* spp. em plantas como *Araucaria* sp. e *Eucalyptus* spp. sugere que mecanismos semelhantes possam ser detectados em plantas cultivadas, como *S. lycopersicum*, bem como a possibilidade de utilização de um destes isolados no controle biológico do patógeno *A. solani*.

1.5 Mecanismos de defesa vegetal

As plantas, ao contrário dos animais, não possuem células móveis defensoras e um sistema imune adaptativo somático. Ao invés disto, estes organismos dependem de barreiras pré-formadas, do sistema imune inato de cada célula, e de sinais sistêmicos que emanam dos pontos de infecção. As barreiras pré-formadas, como a cutícula cerosa e a

parede celular, representam a primeira linha de defesa do vegetal para prevenir a entrada de possíveis invasores. Os patógenos que conseguem suplantar estas barreiras se deparam com as respostas imunológicas induzidas pelo sistema imune das plantas (Dangl e Jones, 2001).

Existem basicamente dois ramos do sistema imune inato vegetal: o primeiro usa receptores transmembrana de reconhecimento de padrões (PRRs – *transmembrane pattern recognition receptors*), que respondem a padrões moleculares associados a microrganismos não patogênicos, a patógenos, ou a danos celulares (MAMPs/PAMPs/DAMPs - *microbial/pathogen/damage - associated molecular patterns*). Os padrões moleculares são componentes típicos de microrganismos, como lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos, flagelina, quitina, entre outros. O segundo ramo do sistema imunológico age amplamente dentro da célula, contra moléculas efetoras produzidas pelo patógeno e introduzidas no citoplasma vegetal. As células vegetais são capazes de perceber as moléculas efetoras dos patógenos através das proteínas R (proteína de patogenicidade) codificadas por genes *R*. Estas são proteínas polimórficas que apresentam estruturas conservadas com domínios NB-LRR ligantes de nucleotídeos (NB – *nucleotide binding*) e domínios com repetições ricas em leucina (LRR – *leucine repeat rich*).

Os efetores produzidos pelos patógenos são reconhecidos pelas proteínas R, que ativam vias de sinalização que levam às respostas de defesa, como a transcrição de genes de defesa relacionados às proteínas PR (*pathogenesis related*). As proteínas PR compreendem enzimas de defesa como as quinases e glucanases, bem como proteínas antimicrobianas (Jones e Dangl, 2006).

Existem primordialmente quatro possíveis etapas da efetivação da resposta imune em vegetais: na primeira fase da resposta imunológica, os PAMPs ou MAMPs são reconhecidos pelos PRRs, o que resulta na imunidade desencadeada por PAMP (PTI – *PAMP-triggered immunity*), que é capaz de interromper a colonização dos microrganismos no tecido infectado. Na segunda etapa, os patógenos produzem moléculas efetoras que agem reduzindo ou inativando as respostas PTI, contribuindo para a virulência do patógeno. Em um terceiro momento, um dado efector pode ser especificamente reconhecido por uma proteína R, resultando na imunidade desencadeada por efector (ETI

– effector triggered immunity). A ETI utiliza geralmente a via de sinalização mediada por ácido salicílico (AS), levando a intensificação das respostas de defesa e a resistência à doença. Esta via pode resultar em uma resposta de morte celular programada, denominada de resposta de hipersensibilidade (HR, *hypersensitive response*) no local da infecção. Ao nível molecular, as respostas das plantas a infecções podem envolver a despolarização da membrana plasmática, modificação da atividade dos canais iônicos, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de compostos antimicrobianos, fosforilação reversível de proteínas, modulação da transcrição gênica e deposição de lignina e calose na parede celular vegetal (Schwessinger e Ronald, 2012).

Por fim, durante uma quarta etapa, a seleção natural pode dirigir os patógenos de forma a evitar a ETI, tanto por mudar ou por diversificar o gene do efetor reconhecido, quanto por produzirem efetores adicionais que suprimem a ETI. Contudo, a seleção natural pode também resultar em novas especificidades das proteínas R para que a ETI possa ser desencadeada novamente (Jones e Dangl, 2006). Ao contrário da imunidade desencadeada pelo patógeno (PTI), que geralmente é restrita a um número limitado de PAMPs, a imunidade desencadeada por efetores (ETI) é específica para diferentes efetores (altamente polimórficos) entre diferentes cepas de patógenos (Spoel e Dong, 2012).

A rápida morte de um número limitado de células no local da infecção, ou HR, está associada à formação de halos necróticos e lesões nos locais de infecção do patógeno. O processo ocorre em menos de 24 horas após o reconhecimento dos PAMPs por PRRs, na tentativa de limitar o crescimento do patógeno (Glazebrook, 2005). A HR está associada a diversas respostas celulares, como o fortalecimento da parede celular, contribuindo para a contenção do patógeno. Além disto, a HR leva ao desenvolvimento de outro tipo de resistência, denominada de resistência sistêmica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*), que promove a resistência de tecidos distantes do local de infecção e reduz as chances de uma infecção subsequente (Medeiros, 2003).

Ao menos três moléculas de sinalização de plantas regulam a defesa contra microorganismos: ácido salicílico, ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET). O AS tem um papel importante na resistência contra organismos biotróficos (ou parasíticos), enquanto AJ e ET estão tradicionalmente envolvidos na resposta de defesa contra patógenos

necrotróficos (Chisholm *et al.*, 2006). Os microrganismos necrotróficos são aqueles que penetram no tecido vegetal para alimentar-se do tecido morto e, para isto, produzem toxinas que provocam a morte de partes da planta (gerando manchas foliares). Seus danos são mais severos do que os causados pelos biotróficos (Gassen, 2005).

Além de atuarem na sinalização de defesa, o ET e o AJ também atuam no crescimento vegetal e em respostas a estresses, além da maturação e da abscisão de frutos e de folhas. O AS também atua na dominância apical, no alongamento do caule, na geminação de sementes e na floração, além de proteger a planta contra o estresse hídrico (Medeiros, 2003).

De acordo com (Dangl e Jones, 2001), a intercomunicação entre as vias de sinalização permite ao vegetal ajustar as respostas de defesa, dependendo do tipo de invasor. Elas são capazes de estabelecer respostas imunes que são altamente específicas. De acordo com (Medeiros, 2003), a resposta SAR parece ser inespecífica, e sua eficiência tem sido demonstrada em um grande número de espécies vegetais, como melão, melancia, feijão, *Arabidopsis thaliana*, trevo, soja, batata, tomate, milho e alfafa.

A SAR foi descrita inicialmente por A. Frank Ross (1961), quando descobriu que uma inoculação local em plantas de tabaco com o vírus mosaico do tabaco pode proteger contra infecções não apenas deste vírus, mas também contra outros patógenos (Ryals *et al.*, 1994). A SAR é tipicamente induzida após a imunidade desencadeada por efetor (apesar de a indução por PAMPs também ter sido descrita), e é efetiva contra um amplo conjunto de patógenos. O início da SAR é acompanhado por um acúmulo do hormônio sinalizador AS no floema, e a subsequente indução de proteínas PR.

O tempo que a planta leva para reconhecer o patógeno e desencadear respostas de defesa é crucial para efetivar a resposta imunológica. Se o reconhecimento é tardio, a interação planta-patógeno resultará em susceptibilidade, mesmo que os mecanismos de defesa tenham sido ativados. Sendo assim, se uma planta é pré-condicionada, o processo infeccioso pode ser reduzido. Na resistência sistêmica induzida (ISR, *induced systemic resistance*), o indutor da resposta imunológica não provoca uma resposta de defesa local, mas induz a planta a se proteger sistemicamente. Neste caso, não há acúmulo de proteínas PR e sua indução não é salicilato dependente. A via de sinalização para ISR parece estar associada a jasmonato e a etileno. A ISR pode ser promovida por indutores

abióticos, contudo, é mais conhecida por envolver a participação de microrganismos não patogênicos (Cavalcanti *et al.*, 2005).

O contínuo contato do vegetal com um determinado microrganismo não patogênico pode promover a ISR, levando ao aumento da resistência basal da planta. Isto potencializa as defesas inatas contra vários patógenos, herbívoros e estresses abióticos. Desta forma, o início de ISR requer microrganismos benéficos que eficientemente colonizem o sistema radicular das plantas hospedeiras. Para o estabelecimento de uma associação mutualista de sucesso, plantas e microrganismos precisam responder a sinais reciprocamente e, assim, priorizar suas respostas, de modo a desenvolver um estilo de vida que proporcione benefícios mútuos (Kuč, 1982). Microrganismos como as PGPRs e fungos promotores de crescimento vegetal não-simbiontes, também atuam na ISR, porém ainda é pouco conhecido como se estabelece a interação mutualista prolongada entre raízes de plantas e microrganismos não-simbiontes. Acredita-se que um diálogo molecular também é essencial para estas interações (Cole e Hoch, 2013).

De qualquer maneira, independentemente do agente indutor, a comunicação cruzada entre estas rotas já foi demonstrada. Um dos paralelos entre a ISR e a SAR é que ambos os tipos de resistência são efetivos contra um amplo espectro de patógenos vegetais.

Os mecanismos de defesa vegetal relacionados à ISR podem ser estruturais ou bioquímicos. Eles envolvem o aumento da lignificação da parede celular, o que dificulta a entrada do patógeno e impede a colonização do patógeno na planta e também alterações metabólicas, as quais estão relacionadas com a atividade de enzimas chaves do metabolismo, como as enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amonialiase (Kurabachew e Wydra, 2014).

2. Justificativa

Considerando que o tomate é uma cultura de grande importância alimentar e econômica, e que apresenta uma grande susceptibilidade a patógenos, é importante desenvolver ferramentas alternativas, de baixo impacto ambiental e econômico, que promovam tanto a fitossanidade quanto o crescimento vegetal, resultando na redução do

uso de agroquímicos empregados no seu manejo. Para isto, visamos selecionar isolados de *Streptomyces* com capacidade de aumentar a resistência vegetal contra *A. solani*; de apresentar antibiose a este fungo patogênico; e/ou promover a taxa de germinação e de crescimento de plantas de tomate.

3. Hipóteses

Considerando a inexistência de produtos que utilizem bactérias *Streptomyces* como promotoras do crescimento de plantas de tomate e da indução da imunidade inata, apresentamos as hipóteses:

- A microbiolização de sementes de tomate com *Streptomyces* promove o aumento da taxa de germinação e de crescimento vegetal.
- Rizobactérias *Streptomyces* são capazes de inibir o desenvolvimento do fungo *A. solani*.
- A inoculação de *Streptomyces* em raízes de plantas de tomate promove a redução dos sintomas de doença em plantas desafiadas com o patógeno *A. solani*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de três isolados de *Streptomyces* na germinação de sementes, no crescimento de plântulas e na promoção da resistência de *Solanum lycopersicum* contra o fitopatógeno *Alternaria solani*.

4.2 Objetivos específicos

I. Avaliar o efeito dos isolados CLV04, CLV05 e CLV07 na germinação de sementes de tomate;

II. Determinar o efeito dos isolados CLV04, CLV05 e CLV07 no crescimento do tomateiro;

III. Determinar a ocorrência de antibiose entre isolados de *Streptomyces* (CLV04, CLV05 e CLV07) e o fitopatógeno *A. solani*;

IV. Determinar a capacidade dos isolados CLV04, CLV05 e CLV07 em promover a resistência de plântulas de tomate contra *A. solani*.

5. Referências

ALVARENGA, M. A. R. Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. rev. **Lavras: Editora Universitária de Lavras**, 2013.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (para) 2012 - Relatório de atividades complementar 2012**. Brasília: 33 p. 2014.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, n. 1, p. 1-43, Mar 2016. ISSN 1098-5557 (Electronic) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609051> >.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 4, p. 1327-50, Apr 2012. ISSN 1573-0972 (Electronic) 0959-3993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805914> >.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. FEALQ, 2005. ISBN 9788571330351. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=rxfkAAAACAAJ> >.

CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803-14, Feb 24 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497589> >.

CLAESSEN, D. et al. Regulation of Streptomyces development: reach for the sky! **Trends Microbiol**, v. 14, n. 7, p. 313-9, Jul 2006. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759865> >.

COLE, G. T.; HOCH, H. C. **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. Springer US, 2013. ISBN 9781489926357. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=BbAACAAAQBAJ> >.

DA SILVA, J. B. C.; DE BRITO GIORDANO, L. **Tomate para processamento industrial**. Embrapa, 2000.

DALMAS, F. R. et al. Autochthonous Streptomyces regulate the metabolism of seedlings of *Araucaria angustifolia* (Coniferales) during root colonisation. **Australian Journal of Botany**, v. 59, n. 2, p. 118-125, 2011. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/BT10175> >.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-33, Jun 14 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459065> >.

DE MELO, P. C. T. **Melhoramento genético do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. ASGROW, 1989. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=3QDeZwEACAAJ> >.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**, 2015.

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S. D.; LAZZARI, E. N. Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de mesa. **Ciência Rural**, v. 34, p. 329-335, 2004. ISSN 0103-8478. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000100054&nrm=iso >.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Ed. UFV, 2008. ISBN 9788572693134. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=xrdyQwAACAAJ> >.

GASSEN, F. R. **Doenças foliares em soja**. Aldeia Norte, 2005. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=w0vHZwEACAAJ> >.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, v. 43, p. 205-27, 2005. ISSN 0066-4286 (Print)

0066-4286 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16078883> >.

GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 22-28, 11// 2015. ISSN 0925-8574. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857415301257> >.

HAAK, D. C.; KOSTYUN, J. L.; MOYLE, L. C. Merging ecology and genomics to dissect diversity in wild tomatoes and their relatives. **Adv Exp Med Biol**, v. 781, p. 273-98, 2014. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277305> >.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-9, Nov 16 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108957> >.

KEMMITT, G. Early blight of potato and tomato. **The Plant Health Instructor**, 2002.

KUĆ, J. Induced Immunity to Plant Disease. **BioScience**, v. 32, n. 11, p. 854-860, December 1, 1982 1982. Disponível em: < <http://bioscience.oxfordjournals.org/content/32/11/854.abstract> >.

KURABACHEW, H.; WYDRA, K. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against

Ralstonia solanacearum in tomato (Solanum lycopersicum). **Crop Protection**, v. 57, p. 1-7, 3// 2014. ISSN 0261-2194. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219413002688> >.

LI, F. et al. Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine Streptomyces sp. isolate M045#, 1. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 349-353, 2005. ISSN 0163-3864.

MEDEIROS, R. B. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno** Brasília: EDU COEDIÇÃO FINATEC 2003. ISBN 8523007628.

PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface, Second Edition**. CRC Press, 2007. ISBN 9781420005585. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=SeOFo5L8dFoC> >.

PSCHEIDT, J. W. **Epidemiology and Control of Potato Early Blight, Caused by Alternaria Solani**. University of Wisconsin--Madison, 1985. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=29nQAAAAMAAJ> >.

ROTEM, J. **The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity**. APS Press, American Phytopathological Society, 1994. ISBN 9780890541524. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=9ILwAAAAMAAJ> >.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiol**, v. 104, n. 4, p. 1109-1112, Apr 1994. ISSN 1532-2548 (Electronic) 0032-0889 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12232151> >.

SALAMONI, S. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de Streptomyces e estudo de produção de moléculas bioativas**. 2009. (Doutorado).

Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS, Porto Alegre.

SALLA, T. D. et al. Streptomyces rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. **Plant Physiol Biochem**, v. 85, p. 14-20, Dec 2014. ISSN 1873-2690 (Electronic)

0981-9428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394796> >.

SAYERS, E. W. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D5-15, Jan 2009. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940862> >.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P. C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. **Annu Rev Plant Biol**, v. 63, p. 451-82, 2012. ISSN 1545-2123 (Electronic)

1543-5008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404464> >.

SHIRAHIGE, F. H. **Produtividade e qualidade de híbridos de tomate (Solanum lycopersicum L.) dos segmentos Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos, em ambiente protegido**. 2009. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz

SHUMAN, J. L. **Integrating a host resistance factor into a potato early blight-forecasting model**. 1995. M.Sc. thesis Pennsylvania State University

SIDDIQUI, Z. A. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer Netherlands, 2006.

ISBN 9781402041525. Disponível em: <

<https://books.google.com.br/books?id=vWAcf2usWuUC> >.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 2, p. 89-100, Feb 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273771> >.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, v. 72, n. 2, p. 107-123, 8// 2003. ISSN 0167-1987. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167198703000825> >.

SYLVIA, D. M. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. Pearson Prentice Hall, 2005. ISBN 9780130941176. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=tLjwAAAAMAAJ> >.

VAN DER WAALS, J.; KORSTEN, L.; AVELING, T. A review of early blight of potato. **African Plant Prot**, v. 7, p. 1-12, 2001.

ZACHMANN, R. Early blight of potato; *Alternaria solani*. **International Potato Center: Technical Information Bulletin 17**, p. 13, 1982.

ZUR, G. et al. Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. **J Food Prot**, v. 65, n. 9, p. 1433-40, Sep 2002. ISSN 0362-028X (Print) 0362-028X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12233854> >.

Seed germination, plant growth, and defense of *Solanum lycopersicum* (L.) plants treated with rhizobacteria *Streptomyces* and the pathogen *Alternaria solani*

Andressa von Wurmb Helrighel Leite¹, Ellen Larissa Souza¹, Matheus Scherer Bastos¹, Renata Medina-Silva², Leandro Vieira Astarita^{1*}

¹Laboratory of Plant Biotechnology, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

²Laboratory of Immunology and Microbiology, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

*Corresponding author. E-mail address: astarita@puccrs.br (L.V. Astarita).

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum*) cultures are frequently attacked by many pathogens, leading to yield losses. Among the pathogens, the fungus *Alternaria solani* ("Early blight" disease) can cause significant yield reductions and decreases the fruit quality. The promotion of plant defense system represents an additional tool for disease control and plant growth management. Some rhizobacteria have been shown the ability to affect plant development and modulate plant defense against pathogens. Among those bacteria, the genus *Streptomyces* is able to synthesize molecules that directly and indirectly interfere with growth. The aim of this work was to select *Streptomyces* (CLV04, CLV05 and CLV07) with the ability to promote seed germination and plant growth, as well as improve tomato plant resistance against *A. solani*. Results showed that CLV07 delayed the initial seed germination, but it did not impair the final germination process. However, CLV04, CLV05 and CLV07 reduced the early root and shoot growth. All these rhizobacteria produced high auxin levels. Only CLV07 was efficient for inducing plant resistance against *A. solani*. Furthermore, all CLVs showed antagonism by competition, decreasing the *A. solani* growth. Taking together all results, *Streptomyces* tested were deleterious for seed and initial plant growth, but CLV07 showed a potential to be used for inducing plant resistance. However, the inoculation of these rhizobacteria on seeds is not recommended.

Keywords: PGPR, biocontrol, tomato.

1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is considered one of the main vegetables traded on the planet (Faostat, 2015). This culture is highly susceptible to various pests and diseases, leading to use large amounts of pesticides for its management. Among the pathogens, the fungus *Alternaria solani* is responsible for the so-called "black-spotted" leaf disease and causes important losses in tomato cultures. The disease occurs in practically all regions where the tomato is grown, leading to fruit damages, reduction of leaves photosynthesis and plant death (Alvarenga, 2013).

Biological control using autochthonous rhizobacteria represents an alternative approach to manage plant diseases. Within the rhizo-microbiome, some microorganisms can promote plant growth and provide better plant health through mutual beneficial interactions (Vacheron *et al.*, 2013). Soil bacteria that colonize the roots and promote the enhancement of plant growth are named plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Siddiqui, 2006). There are numerous reports showing the advantages of PGPRs for crop management. Tomatoes seeds microbiolized with the rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Rothia sp.* were less infested by *Spodoptera litura*, resulting in a 60% increase in plant biomass and an increment of 40% in yield (Bano e Muqarab, 2017). Isolates of *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus* and *B. pumilos* promoted the growth of *Arabidopsis*, corn and tomato plants. Moreover, they upregulated plant genes related to auxin (indole-3-acetic acid) synthesis and promoted the induced systemic resistance (ISR) against pathogens (Huang *et al.*, 2015).

Conversely, there are many rhizobacteria with inhibitory effects on plant development (Sarathchandra *et al.*, 1996). Detrimental, non-pathogenic and non-infective rhizobacteria that inhibit root growth, suppress overall plant growth, and antagonize beneficial rhizosphere microorganisms are known as deleterious rhizobacteria (DRB) (Kremer e Souissi, 2001). This group of microorganisms are predominantly saprophytic bacteria that aggressively colonize plant seeds, roots and rhizospheres, suppressing the plant growth by producing toxic metabolites which inhibit root growth and development (Sarathchandra *et al.*, 1996). The harm of deleterious rhizobacteria is related to the production of extra-cellular toxic metabolites which inhibit seed germination and root

growth (Sarathchandra *et al.*, 1996). Bacteria producing amounts of lethal compounds to a pathogen on one plant, may affect negatively the growth of another plant (Defago and Haas, 1990). Although the mechanisms for plant inhibition are not completely known, the deleterious rhizobacteria are considered as potential weed biological control agents (Kremer e Souissi, 2001). Despite this potential interest, competitive rhizosphere colonization between PGPR and DRB is crucial for the regulation of plant growth. Moreover, PGPR may decrease the inhibitory effects of DRB and soil pathogens, and enhance the plant immune system (Lugtenberg e Kamilova, 2009).

The interaction of non-pathogenic bacteria with the plant roots may result in plants resistant to some pathogenic bacteria, fungi, and viruses through the ISR. The ISR induces the plant to protect itself systemically. The plant ISR leads to an increase in the plant basal resistance (Kuć, 1982; Cavalcanti *et al.*, 2005). This resistance involves lignification of the cell wall and metabolic alterations, which hinders the entry and prevents the colonization of the pathogen (Kurabachew e Wydra, 2014). Some *Streptomyces* strains are able to increase the yield and dry matter, as well as the root length and biomass in rice plants (Gopalakrishnan *et al.*, 2013). This bacteria genus has the property of producing antibiotics, extracellular proteases, siderophores and plant hormones, such as auxin, presenting the potential to be used as a biostimulating agent (Hoster *et al.*, 2005; Fretes *et al.*, 2013; Cordovez *et al.*, 2015). In addition, some *Streptomyces* can act against phytopathogens, producing antifungal and antibacterial compounds (Barka *et al.*, 2016). *Streptomyces* spp. were also described as capable to promote the growth and modulate the metabolism of *Araucaria* and *Eucalyptus* plants (Toumatia *et al.*, 2015). Gopalakrishnan *et al.* (2011) showed that *Streptomyces* strains produced enzymes and metabolites such as cellulases, proteases and hydrogen cyanide that inhibited the growth of pathogens such as *Fusarium oxysporum* in *Cicer arietinum*. All these results show that the genus *Streptomyces* present a great potential for promoting plant growth and defend plant against phytopathogens (Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Previous studies have shown that *Streptomyces* are efficient for promoting and modulating the secondary metabolism of the Brazilian conifer *Araucaria angustifolia* (Dalmas *et al.*, 2011). All rhizobacteria evaluated in this study were able to produce auxin and showed competence for root colonizing. *Streptomyces* were also efficient in *Eucalyptus* spp., promoting plant growth and inducing

plant resistance against *Botrytis cinerea* (Salla et al. 2014). All these results highlight the *Streptomyces* as promising biocontrol agents.

In this study, we hypothesized that *Streptomyces* strains present the ability to promote growth and induce defense in *S. lycopersicum* plants against the pathogen *Alternaria solani*. In this context, the germination of tomato seeds, plant growth and resistance against *A. solani* were evaluated in *in vitro* plants treated with the *Streptomyces* strains CLV04, CLV05 and CLV07. The antibiosis of these *Streptomyces* strains against *A. solani* was also evaluated.

2. Material and Methods

2.1 Microorganisms

Streptomyces isolates CLV04, CLV05 and CLV07 were obtained from soil samples (rhizosphere) collected in a native forest area (PRO-MATA/PUCRS, São Francisco de Paula-RS, Brazil) that belongs to the Mata Atlântica Biome. After *Streptomyces* isolation and morphological characterization of this genus, cultures were preserved in glycerol (50% v/v) at -80°C and integrated into the Microorganisms Collection of the Laboratory of Plant Biotechnology (CLV). Stored *Streptomyces* were recovered in ISP4 liquid culture medium (Shirling e Gottlieb, 1966). The cultures were grown under agitation (100 rpm), at 26°C for seven days. Suspensions were centrifuged (2,500 xg, 15 min, room temperature), and the pellet resuspended in sterile distilled water. Then, bacterial suspensions were adjusted at the optical density of 600 nm to 0.5 and used for seed microbiolization. The rhizobacteria CLV04, CLV05 and CLV07 were chosen based on previous studies, in which they were efficient for promoting and modulating the secondary metabolism of the conifer *Araucaria angustifolia* (Dalmas et al., 2011).

The plant pathogenic fungus *A. solani* was gently provided by Dra. Maria José Dávila Charchar (Embrapa Cerrados, DF). This culture was grown for 10 days on potato agar (PDA) in Petri dishes at 26 °C. Agar plugs were removed using a sterile 10 mm diameter cork borer and prepared for plant challenging. Plugs were grounded in sterile

water (10 mL) and the final concentration was adjusted at the optical density of 400 nm to 0.4 with water. Then, the macerate was used for plant challenging. Briefly, plants were grown in vitro for 29 days and the true leaves inoculated with the macerate, using a sterile swab on the abaxial leaf surface.

2.2 Seed microbialization

Tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L., Santa Cruz Kada cultivar), were disinfected with sodium hypochlorite (1% active chloride) for 10 min and soaked in fungicide (Ridomil Gold MZ, Syngenta Crop Protection) for 20 min. Then, seeds were rinsed with sterile distilled water and microbialized. The microbialization consisted in submerge tomato seeds in *Streptomyces* suspension (5 mL) for 24h under agitation (100 rpm). Control consisted in seeds submersed in water. Seeds were then individually placed in glass tubes (2.5 cm in diameter) with MS semi-solid medium (Murashige and Skoog, 1962) adjusted to contain half the concentration of the salts in order to mitigate the root osmotic stress. Plants were maintained at 25 ± 2 °C with light intensity of $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in a 16h photoperiod.

2.3 Seed germination and plant growth

In order to determine the effect of CLV04, CLV05 and CLV07 on seed germination and plant growth, tomato seeds were microbialized with *Streptomyces* as described above. For germination analysis, each treatment (CLV04, CLV05 and CLV07) consisted in 20 seeds. Germination was evaluated along 9 days. For plant growth investigation, each treatment consisted in 50 plants germinated from microbialized seeds. Plants were weekly evaluated in a 25 days period. Germination rates, root and shoot lengths, and the number of true leaves were determined. Control treatment consisted in non-microbialized seeds treated with sterile water, in both assays.

2.4 Determination of auxin produced by *Streptomyces* sp.

Actinobacteria auxin production was analyzed in triplicate by the Salkowski reagent (Salkowski, 1885), a common assay for auxin and indolic compounds determination in bacteria. Briefly, the reagent consisted in 180 mL concentrated H₂SO₄ dissolved in 150 mL H₂O, with 9 mL of 1.5 M FeCl₃.6H₂O added. The isolates CLV04, CLV05 and CLV07 were maintained in semi-solid ISP4 medium, and samples (50 mg Fresh Mass, FM) were extracted with 0.5 mL of 96% ethanol and centrifuged at 2,500 xg for 6 min at room temperature. The supernatant (0.3 mL) was analysed with 1mL of Salkowski's reagent, after incubation for 60 min at room temperature in the dark. The auxin concentration was determined in a spectrophotometer (530 nm) with indol-3-acetic acid (IAA) used as standard.

2.5 Antibiosis

The antibiosis between the *Streptomyces* strains (CLV04, CLV05 and CLV07) and *A. solani* was verified by co-cultivation. The suspensions of each *strain* (100 µL) were individually inoculated in Petri dishes containing semi-solid medium PDA (Potato Dextrose Agar), establishing a linear bacterial streak at 1 cm from the edge of the plate. Cultures were grown for five days at 26 °C. Then, a disk (1 cm diameter) containing *A. solani* previously cultivated in PDA, was placed in the opposite position, 2 cm from the *Streptomyces* line. In a control plate, the rhizobacteria were replaced by 100 µL of sterile distilled water. Co-cultivation was maintained for 7 days and the size of the inhibition zone (mm) was determined (AxioVision - Digital Image Processing Software, Sony).

2.6 Plant defense

The effect of *Streptomyces* in plant resistance was evaluated by inoculating CLV04, CLV05 and CLV07 on plants roots germinated from non-microbiolized seeds. Plants were grown for 25 days and roots were then inoculated with *Streptomyces* (200 µL). Four days after root inoculation, plant shoots were challenged with *A. solani*, as previously described. Each treatment consisted in 8 - 10 tomato plants presenting true leaves. Control treatments

consisted in: i) non-inoculated + non-challenged plants (H₂O); ii) inoculated + non-challenged plants (CLVs) and iii) non-inoculated + challenged plants (*A. solani*).

After plant challenging, disease progression was assessed from the first sign of yellow or dark spots, with visible hyphae observed under stereomicroscopy, on the leaves at the site of infection. Disease incidence evaluations were performed twice a week until 100% plants death in the control treatment (non-inoculated + challenged plants). The disease incidence and mortality rates caused by the fungi were plotted versus time in order to generate the disease progress curve. The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated by the equation described by Campbell, 1990, where "n" is the number of evaluations; "Y" is the incidence rate (%); "T" is the time (days) of each evaluation (Campbell, 1990).

$$AACPD = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1}) / 2X(t_{i+1} - t_i)$$

2.7 Statistics

The homogeneity of variances was determined by the Levene's test and when necessary, data were transformed to adjust to the normal distribution. The occurrence of outliers was determined by BoxPlot and the extreme values (more than 3 box-lengths from the edge of the box) were removed. Means were compared using analysis of variance (ANOVA) complemented by Duncan's t-test, with $p \leq 0.05$. Analyzes were performed using SPSS v17 software.

3. Results and Discussion

The activity of *Streptomyces* CLV04, CLV05 and CLV07 on seed germination and plant development was evaluated in plants cultivated *in vitro*. Regardless the *Streptomyces* used for seed microbiolization, all treatments promoted an initial delay in seed germination (Fig. 1). The non-microbiolized seed showed a high germination rate (35%) ($p=0.001$) at day 2, compared to seeds microbiolized with CLV04 (5%) and CLV05 (5%) and CLV07 (0%).

However, the germination rate of seeds microbiolized with CLV05 (45%) and CLV07 (44%) reached the similar level ($p=0.12$) of the non-microbiolized seeds (75%) at day 5. In addition, nine days after microbiolization, the germination rate of CLV05 (93.33%) and CLV07 (70%) was still similar ($p=0.68$) to the non-microbiolized plants (90%). The lowest germination rate ($p=0.04$) at day 9, was observed in seeds microbiolized with CLV04 (26.67%). Many rhizobacteria selected for beneficial effects of plant growth and suppression of plant pathogens may detrimentally affect seed germination.

There are many reports showing rhizobacteria inhibiting seed growth (Howell, 1991; Koch, 2001; Bataineh *et al.*, 2008). Difficulties in the germinative process in microbiolized seeds may be related to the production of secondary metabolites, as previously observed in lettuce radicles (Kunova *et al.*, 2016). Seed germination and seedling development may also be affected by rhizobacteria that produce phytotoxic metabolites, such as hydrogen cyanide and phenazine compounds (Kang *et al.*, 2007). These compounds have already been reported to affect potato (Schippers *et al.*, 1990), lettuce and *Echinochloa crus-galli* (Kremer and Souissi, 2001). Furthermore, the production of phenazine from *Pseudomonas fluorescens* reduced the germination of wheat seeds (Slininger *et al.*, 1996).

Although CLV05 and CLV07 delayed the initial germination, they did not impair the final germination. However, the rhizobacterium CLV04 showed a detrimental effect for seed germination. In order to determine whether this effect of *Streptomyces* persisted in the seedlings growth, the initial plant development was evaluated along 25 days after germination. The experiments of tomato seedlings germinated from seeds treated with rhizobacteria showed that the CLV04, CLV05 and CLV07 strains are not PGPRs (Figs. 2-4). Treatments with *Streptomyces* did not bring any beneficial effect in relation to the development of aerial parts, root growth and number of leaves, compared to plants derived from non-microbiolized seeds.

Although the inhibition of shoot growth by CLV07 was only observed until day 15 (Fig. 2), this rhizobacterium reduced dramatically ($p=0.159$) the root growth over the time, compared to control (Fig. 3). On the other hand, CLV05 reduced the shoot growth at day 25. Similar results were observed for leaves, where the lowest number was attained at day 25 in seeds treated with CLV05 and CLV07 (Fig. 4). Seedlings from the control treatment did not present evidences of growth inhibition.

The inhibitory effect of rhizobacteria has already been verified in many studies (Koch, 2001; Bataineh *et al.*, 2008; Poitout *et al.*, 2017). Drastic growth inhibition (>80%) was observed in *Arabidopsis* when plants were incubated by 14 days with *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia odorifera*, *Stenotrophomonas rhizophila*, or *Stenotrophomonas maltophilia* (Vespermann *et al.*, 2007). Moreover, volatiles compounds produced by *Serratia odorifera*, an antagonistic rhizobacterium, presented plant inhibitory effect (Kai and Piechulla, 2009). The compound N,N-dimethyl-hexadecylamine (C16-DMA), produced by rhizobacteria such as *Arthrobacter agilis*, inhibited *Arabidopsis* development (Raya-Gonzalez *et al.*, 2017). Eleven strains of rhizobacteria were screened *in vitro* for toxic metabolites that inhibit plant root growth. Ten strains of these bacteria inhibited root growth of *Trifolium repens* seedlings, and four strains inhibited root growth of *Lolium perene* seedlings (Sarathchandra *et al.*, 1996). The compound gougerotin, produced by *Streptomyces spp.*, inhibited the rice seedlings growth (Murao e Hayashi, 1983). Interestingly, the initial inhibitory effect of *Streptomyces*, observed in lettuce and tomato, did not persist in the subsequent plant development (Kunova *et al.*, 2016).

Our plant grow experiments were performed in a short time (25 days), since they were conducted *in vitro*. This experimental period may not have been sufficient for supplant the deleterious effects caused by rhizobacteria. We hypothesized that experiments should be carried out in a greenhouse and for a longer time with those rhizobacteria, in order to clarify the initial inhibitory effect produced by CLV04, CLV05 and CLV07.

Giving support to this hypothesis, when tomato roots of 30 days old plants were treated with the same *Streptomyces* (PM1/CLV04; PM3/CLV05 and PM5/CLV07), plants showed an increment in chlorophyll levels, the number of leaves and root and shoot fresh mass (Dias *et al.*, 2017). Taking account all those data, the deleterious effect of rhizobacteria may probably depend on the plant development stage.

Production of IAA has been reported for many bacteria that interact with plants. The *Streptomyces* strains CLV04, CLV05 and CLV07 showed the ability to produce auxin in culture (Table 1). CLV04 produced the lowest auxin level (0.13 mg/g FM), compared to the similar levels produced by CLV05 (0.79 mg/g FM) and CLV07 (0.979 mg/g FM). It is supposed that over 80% of the bacteria isolated from the rhizosphere are capable to

synthesize IAA that may interfere in the plant development (Spaepen e Vanderleyden, 2011). *Streptomyces*, such as *Streptomyces anulatus*, *S. cyaneus* and *S. albidoflavus* were reported producing IAA (Kunova *et al.*, 2016). This auxin may promote the release of plant nutrients to the bacteria and promote simultaneous plant growth (Lindow and Brandl, 2003). However, high amounts of IAA produced by rhizobacteria may inhibit plant growth (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

Suppression of plant growth by high levels of auxin was observed in maize (Sarwar e Frankenberger, 1994), *Beta vulgaris* (Loper, 1986), *Prunus cerasis* (Dubeikovsky *et al.*, 1993) and lettuce (Barazani and Friedman, 1999). Furthermore, plant growth was also inhibited when deleterious rhizobacteria and tryptophan were applied together to the plant (Sarwar and Frankenberger, 1994; Sarwar and Kremer, 1995). It is also possible that, by producing auxin and other phytohormones the colonizing bacteria eventually modulate the hormonal homeostasis of the plant, which may influence its initial development (Vacheron *et al.*, 2013). Since we verified a significant reduction on root length in young plants treated with CLV04, CLV05 and CLV07, this decreasing may be attributed to the auxin produced by those rhizobacteria. Regarding this, plants with short roots may reduce the plant nutrition and compromise the shoot growth. This result may suggest that there is a balance between the auxin level produced by rhizobacteria and the stage of plant development. This balance may represent the success for bacteria colonization and plant growth.

Antibiosis is characterized by a relationship between two or more organisms that is detrimental to at least one of them (Frey-Klett *et al.*, 2011). The antagonistic activity between *Streptomyces* and *A. solani* was evaluated *in vitro*, and all *Streptomyces* strains showed antagonism by competition and stopped *A. solani* growth, without any apparent death (Fig 5). There were not differences among the inhibition rates observed for CLV04 (60.3%), CLV05 (60.59%) and CLV07 (59.71%), but all they promoted a significant decrease on mycelium growth area, compared to the control ($p < 0,001$) (Fig. 6). Control cultures of *A. solani* grew rapidly and covered the entire petri dish. The *Streptomyces* strains stopped *A. solani* without contact between both cultures, indicating a strong antibiosis, without any visible changes in the culture medium color. This inhibition zone represented a consolidated chemical barrier produced by *Streptomyces* which may be a result of secondary metabolite excretion (Mendoza *et al.*, 2015).

The genus *Streptomyces* is able to produce more than 7,600 bioactive compounds, many of them are able to antagonize with phytopathogenic fungi (Gunji *et al.*, 1983; Getha e Vikineswary, 2002; Kunova *et al.*, 2016; Manhas e Kaur, 2016). Antibiosis was observed in many species of *Streptomyces*, showing inhibition against phytopathogens, such as *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, *Verticillium albo-atrum* (El-Abyad *et al.*, 1993), *Curvularia eragrostides* (Henn.) Meyer, and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (Soares *et al.*, 2006). In addition, Manhas and Kaur (2016) showed that *Streptomyces hydrogen* was able to completely inhibit *Alternaria brassicicola* growth. Several *Streptomyces* strains were already screened against different phytopathogenic fungi (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f.sp. lactucae*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora* and *Thielaviopsis basicola*) and all inhibited the development of at least one phytopathogen (Kunova *et al.*, 2016).

The ability of strains CLV04, CLV05 and CLV07 to inhibit *A. solani* indicates their potential to protect plant roots against soil borne pathogen or for producing compounds to control pathogens.

The AUDPC experiments were performed in order to evaluate the ability of strains CLV04, CLV05 and CLV07 in promoting the resistance of plants against *A. solani*. Tomato plants challenged with the pathogen presented symptoms, such as small black spots with hyphae on leaves. On the other hand, plants treated only with *Streptomyces* strains did not present any disease symptoms (Tab. 1). Strains CLV04 and CLV05 were not able to promote plant resistance against *A. solani*, compared to the control (*A. solani* treatment). However, plants treated with CLV07 and challenged with the pathogen, showed a reduction in the disease symptoms.

The improving of tomato resistance by the strain CLV07 may be attributed to a defense based on an induced systemic responses. The promotion of plant resistance by *Streptomyces* has already been reported by many authors (Getha *et al.*, 2005; Kurth *et al.*, 2014; Kunova *et al.*, 2016) and is attributed to an induction of plant priming state (Gupta *et al.*, 2017). The time interval between the treatment with CLV07 and the plant challenging may have pre-conditioned tomato ISR, as demonstrated in Norway spruce treated with *Streptomyces* (Tarkka *et al.*, 2008). This author showed that isolates of *Streptomyces* induced plant ISR by generating characters such as cell walls thickened and increased

lignifications of the xylem. Moreover, transcripts of ISR-related genes are also observed in plants treated with *Streptomyces*, even in the absence of pathogen challenge, indicating a possibility of priming. Tomato seeds microbiolized with *Streptomyces setonii* presented ISR, leading to a severity reduction symptoms disease caused by *Xanthomonas gardneri* (Conn *et al.*, 2008a). This rhizobacterium increased the activity of plant defense enzymes, such as peroxidases, polyphenoloxidases, β -1,3-Chitinases and phenylalanine-ammonia-lyases. The expression of disease resistance genes in *Arabidopsis* was upregulated when plants were treated with *Streptomyces*, showing that these rhizobacteria were able to prime both SAR and ISR pathways, depending on the pathogen (Conn *et al.*, 2008b). Moreover, ISR was also promoted by *Streptomyces* in *Rhododendron* plants, protecting them against *Pestalotiopsis sydowniana*. This rhizobacterium did not show any antagonism to the pathogen, and led to activation the plant expression of ethylene/jasmonate-associated defense genes and the synthesis of phytoalexins (Shimizu *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2006).

The CLV07 delayed the initial germination, but it did not impair the final germination process. However, CLV04, CLV05 and CLV07 reduced the root and shoot growth. These rhizobacteria produced high auxin levels. Only CLV07 was efficient for inducing plant resistance against *A. solani*. Furthermore, CLV04, CLV05 and CLV07 showed antagonism by competition, reducing the *A. solani* growth. Taking together all results, the *Streptomyces* tested were deleterious for seed and initial plant growth, but CLV07 showed a potential to be used for inducing plant resistance. However, the inoculation of these rhizobacteria on seeds is not recommended. The promotion of defense and plant growth are two different processes, but related by similar molecular mechanisms. Further studies are needed to optimize the use of CLV07 as biological control, considering an adequate plant development stage.

Acknowledgments

We would like to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 403843/2013-8) for the grants and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the fellowship program.

References

ALVARENGA, M. A. R. Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. rev. **Lavras: Editora Universitária de Lavras**, 2013.

BANO, A.; MUQARAB, R. Plant defence induced by PGPR against *Spodoptera litura* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant Biol (Stuttg)**, v. 19, n. 3, p. 406-412, May 2017. ISSN 1438-8677 (Electronic) 1435-8603 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28004873> >.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the Major Root Growth Factor Secreted from Plant-Growth-Mediating Bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2397-2406, 1999/10/01 1999. ISSN 1573-1561. Available in: < <https://doi.org/10.1023/A:1020890311499> >.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, n. 1, p. 1-43, Mar 2016. ISSN 1098-5557 (Electronic) 1092-2172 (Linking). Available in: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609051> >.

BATAINEH, S. M. et al. Screening for soil streptomycetes from North Jordan that can produce herbicidal compounds. **Pol J Microbiol**, v. 57, n. 4, p. 297-305, 2008. ISSN 1733-1331 (Print) 1733-1331.

CAMPBELL, C. L., AND L. V. MADDEN. Introduction to Plant Disease Epidemiology. **Wiley-Interscience**, p. 532 pp, 1990.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. FEALQ, 2005. ISBN 9788571330351. Available in: <<https://books.google.com.br/books?id=rxkKAAAACAAJ>>.

CONN, V. M.; WALKER, A. R.; FRANCO, C. M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 21, n. 2, p. 208-18, Feb 2008a. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184065> >.

CONN, V. M.; WALKER, A. R.; FRANCO, C. M. M. Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 208-218, 2008/02/01 2008b. ISSN 0894-0282. Available in: < <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0208> >. Acesso em: 2017/07/30.

CORDOVEZ, V. et al. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1081, 2015. ISSN 1664-302X (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26500626> >.

DEFAGO, G.; HAAS, D. Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: modes of action and genetic analysis. **Soil Biochem**, v. 6, n. 49, p. 291, 1990.

DIAS, M.; BASTOS, M. S.; XAVIER, V. B.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 479-493, 2017. Available in <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942817302395>>

DUBEIKOVSKY, A. N. et al. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 9, p. 1277-1281, 1993/09/01/ 1993. ISSN 0038-0717. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003807179390225Z> >.

EL-ABYAD, M. S. et al. 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, 1993. ISSN 1573-5036. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00016608> >.

FAO/STAT. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**, 2015.

FRETES, C. E.; SEMBIRING, L.; PURWESTRI, Y. A. Characterization of *Streptomyces* spp. Producing Indole-3-acetic acid as Biostimulant Agent. **Indonesian Journal of Biotechnology**, n. ##issue.vol## 18, ##issue.no## 2 (2013), 2013. Available in: < <http://ijbiotech.ugm.ac.id/index.php/biotech/article/view/243> >.

FREY-KLETT, P. et al. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 75, n. 4, p. 583-609, 2011. ISSN 1092-2172 1098-5557. Available in: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232736/> >.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 6, p. 303-10, Jun 2002. ISSN 1367-5435 (Print) 1367-5435 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032802> >.

GETHA, K. et al. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 32, n. 1, p. 24-32, Jan 2005. ISSN 1367-5435 (Print) 1367-5435 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650871> >.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 1313-21, Jun 2011. ISSN 0959-3993 (Print) 0959-3993 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187130> >.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. **Springerplus**, v. 2, p. 574, 2013. ISSN 2193-1801 (Print). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24255867> >.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Screening of Antifungal Antibiotics According to Activities Inducing Morphological Abnormalities. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 2061-2069, 1983/09/01 1983. ISSN 0002-1369. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1983.10865911> >.

GUPTA, R. et al. Microbial modulation of bacoside A biosynthetic pathway and systemic defense mechanism in *Bacopa monnieri* under *Meloidogyne incognita* stress. **Sci Rep**, v. 7, p. 41867, Feb 03 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28157221> >.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J. E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 66, n. 4, p. 434-42, Jan 2005. ISSN 0175-7598 (Print)

0175-7598 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290142> >.

HOWELL, C. Biological control of *Pythium damping-off* of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, v. 81, n. 7, p. 738-741, 1991.

HUANG, X. F. et al. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. **J Appl Microbiol**, v. 118, n. 3, p. 672-84, Mar 2015. ISSN 1365-2672 (Electronic) 1364-5072 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494882> >.

KAI, M.; PIECHULLA, B. Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles – An effect of CO₂? **FEBS Letters**, v. 583, n. 21, p. 3473-3477, 2009. ISSN 1873-3468. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.053> >.

KANG, B. R. et al. Inhibition of seed germination and induction of systemic disease resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6 requires phenazine production regulated by the global regulator, *gacS*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, n. 4, p. 586-93, Apr 2007. ISSN 1017-7825 (Print) 1017-7825 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18051268> >.

KOCH, E. Effect of biocontrol agents on plant growth in the absence of pathogens. **IOBC WPRS BULLETIN**, v. 24, n. 1, p. 81-90, 2001. ISSN 0253-1100.

KREMER, R. J.; SOUISSI, T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. **Curr Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 182-6, Sep 2001. ISSN 0343-8651 (Print) 0343-8651 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11400067> >.

KUĆ, J. Induced Immunity to Plant Disease. **BioScience**, v. 32, n. 11, p. 854-860, December 1, 1982 1982.

Available in: < <http://bioscience.oxfordjournals.org/content/32/11/854.abstract> >.

KUNOVA, A. et al. Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. **BMC Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 272, Nov 09 2016. ISSN 1471-2180 (Electronic) 1471-2180 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829359> >.

KURABACHEW, H.; WYDRA, K. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Crop Protection**, v. 57, p. 1-7, 3// 2014. ISSN 0261-2194.

Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219413002688> >.

KURTH, F. et al. *Streptomyces*-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 27, n. 9, p. 891-900, Sep 2014. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779643> >.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003. ISSN 0099-2240.

LOPER, J. E., & SCHROTH, M.N. . Influence of bacteria sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugarbeet. **Phytopathology**, v. 76, p. 386-389., 1986.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 541-56, 2009. ISSN 1545-3251 (Electronic) 0066-4227 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575558> >.

MADDEN L., Pennypacker S. P. & MacNab A. A.. **FAST, a forecasting system Alternaria solani on tomato**. *Phytopathology* 68: 1354–1358, 1978.

MANHAS, R. K.; KAUR, T. Biocontrol Potential of Streptomyces hydrogenans Strain DH16 toward Alternaria brassicicola to Control Damping Off and Black Leaf Spot of Raphanus sativus. **Front Plant Sci**, v. 7, p. 1869, 2016. ISSN 1664-462X (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018402> >.

MENDOZA, J. L. H. et al. Antibiosis of Trichoderma spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus Macrophomina phaseolina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1093-1101, 2015. ISSN 1517-8382. Available in: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000401093&nrm=iso >.

MURAO, S.; HAYASHI, H. Gougerotin, as a plant growth inhibitor, from Streptomyces sp. No. 179. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1135-1136, 1983. ISSN 0002-1369.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. ISSN 1399-3054. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> >.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 2, p. 189-199, 2003. ISSN 1365-3040. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x> >.

POITOUT, A. et al. Local signalling pathways regulate the Arabidopsis root developmental response to Mesorhizobium loti inoculation. **J Exp Bot**, v. 68, n. 5, p. 1199-1211, Feb 01 2017. ISSN 1460-2431 (Electronic) 0022-0957 (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199673> >.

RAYA-GONZALEZ, J. et al. N,N-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana. **Protoplasma**, v. 254, n. 3, p. 1399-1410, May 2017. ISSN 1615-6102 (Electronic) 0033-183X (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27696021> >.

SALKOWSKI, E. **Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus**. *Zeitschrift für physiologische Chemie*. 9: 23 p. 1885.

SARATHCHANDRA, S. U.; BROWN, J. A.; COX, N. R. Rhizobacteria harmful to seedling growth in white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **New Zealand**

Journal of Agricultural Research, v. 39, n. 1, p. 129-136, 1996/03/01 1996. ISSN 0028-8233. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1080/00288233.1996.9513171> >.

SARWAR, M.; FRANKENBERGER, W. T. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. **Plant and Soil**, v. 160, n. 1, p. 97-104, 1994/03/01 1994. ISSN 1573-5036. Available in: < <https://doi.org/10.1007/BF00150350> >.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 261-269, 1995/06/01 1995. ISSN 1573-5036. Available in: < <https://doi.org/10.1007/BF00011328> >.

SCHIPPERS, B. et al. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. **Plant and Soil**, v. 129, n. 1, p. 75-83, 1990/12/01 1990. ISSN 1573-5036. Available in: < <https://doi.org/10.1007/BF00011693> >.

SHIMIZU, M. et al. Disease Resistance of Tissue-cultured Seedlings of *Rhododendron* after Treatment with *Streptomyces* sp. R-5. **Journal of General Plant Pathology**, v. 67, n. 4, p. 325-332, 2001/11/01 2001. ISSN 1345-2630. Available in: < <https://doi.org/10.1007/PL00013040> >.

SHIMIZU, M. et al. Disease resistance induced by nonantagonistic endophytic *Streptomyces* spp. on tissue-cultured seedlings of *rhododendron*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 6, p. 351-354, 2006/12/01 2006. ISSN 1610-739X. D Available in: < <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0305-9> >.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species¹. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966. Available in: < <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-16-3-313> >.

SIDDIQUI, Z. A. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer Netherlands, 2006. ISBN 9781402041525. Available in: < <https://books.google.com.br/books?id=vWAcf2usWuUC> >.

SLININGER, P. J. et al. Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 391-398, 1996/04/01 1996. ISSN 1432-0614. Available in: < <https://doi.org/10.1007/s002530050701> >.

SOARES, A. C. F. et al. Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 456-461, 2006. ISSN 1517-8382. Available in: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000400010&nrm=iso >.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011. ISSN 1943-0264. Available in: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062209/> >.

TARKKA, M. T. et al. Plant behavior upon contact with Streptomycetes. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 11, p. 917-919, 03/25/received 03/31/accepted 2008. ISSN 1559-2316 1559-2324. Available in: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2633735/> >.

TOUMATIA, O. et al. Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. **J Basic Microbiol**, v. 55, n. 2, p. 221-8, Feb 2015. ISSN 1521-4028 (Electronic) 0233-111X (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25284744> >.

VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Front Plant Sci**, v. 4, p. 356, Sep 17 2013. ISSN 1664-462X (Print) 1664-462X (Linking). Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062756> >.

VESPERMANN, A.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 17, p. 5639-5641, September 1, 2007 2007. Available in: < <http://aem.asm.org/content/73/17/5639.abstract> >.

Table 1 – Mean area under the disease progress curve normalized and corrected (AUDPC-nc) values for tomato plants treated previously with *Streptomyces* (CLV04, CLV05 and CLV07) and after four days, challenged with *Alternaria solani*. Control treatment consisted in plants treated and challenged with water. Different lowercase letters in the column indicate statistical difference between means (ANOVA, Duncan $p \leq 0.05$).

Treatments	AUDPC-nc
H ₂ O	0.00 c
CLV04	0.00 c
CLV05	0.00 c
CLV07	0.00 c
<i>A.solani</i>	15,642.50 a
CLV04+ <i>A.solani</i>	15,169.35 a
CLV05+ <i>A.solani</i>	15,511.48 a
CLV07+ <i>A.solani</i>	13,306.70 b

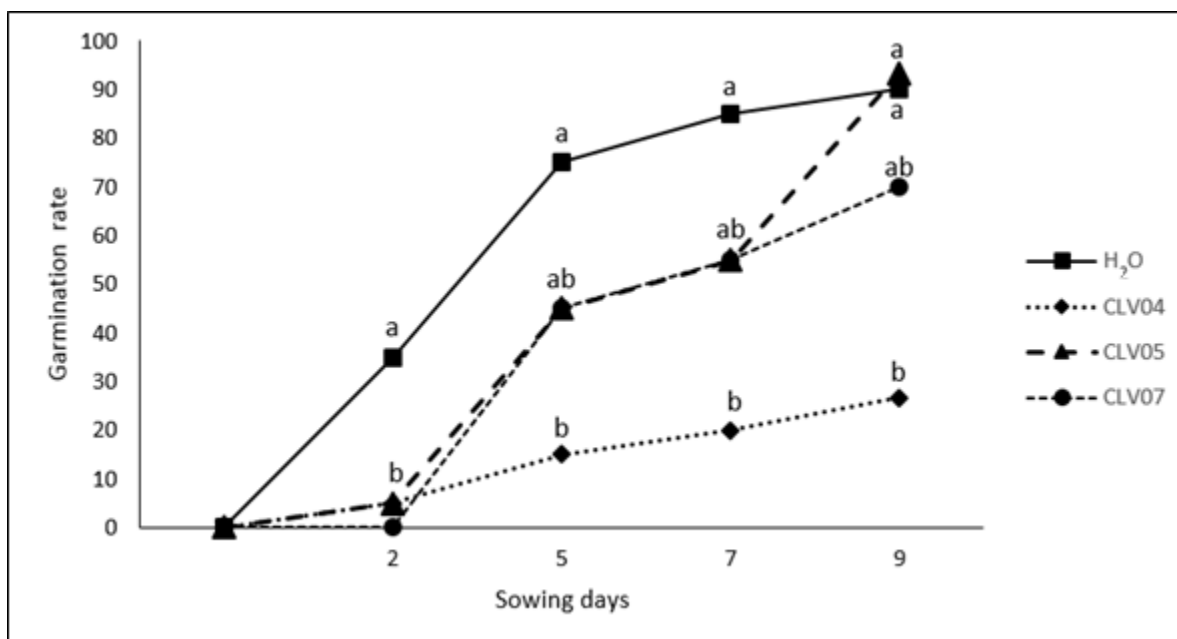


Figure 1 - Germination rate of microbiolized tomato seeds with *Streptomyces* CLV04, CLV05 and CLV07. Different letters within the sowing day, indicate statistical difference between means (ANOVA, Duncan $p \leq 0.05$).

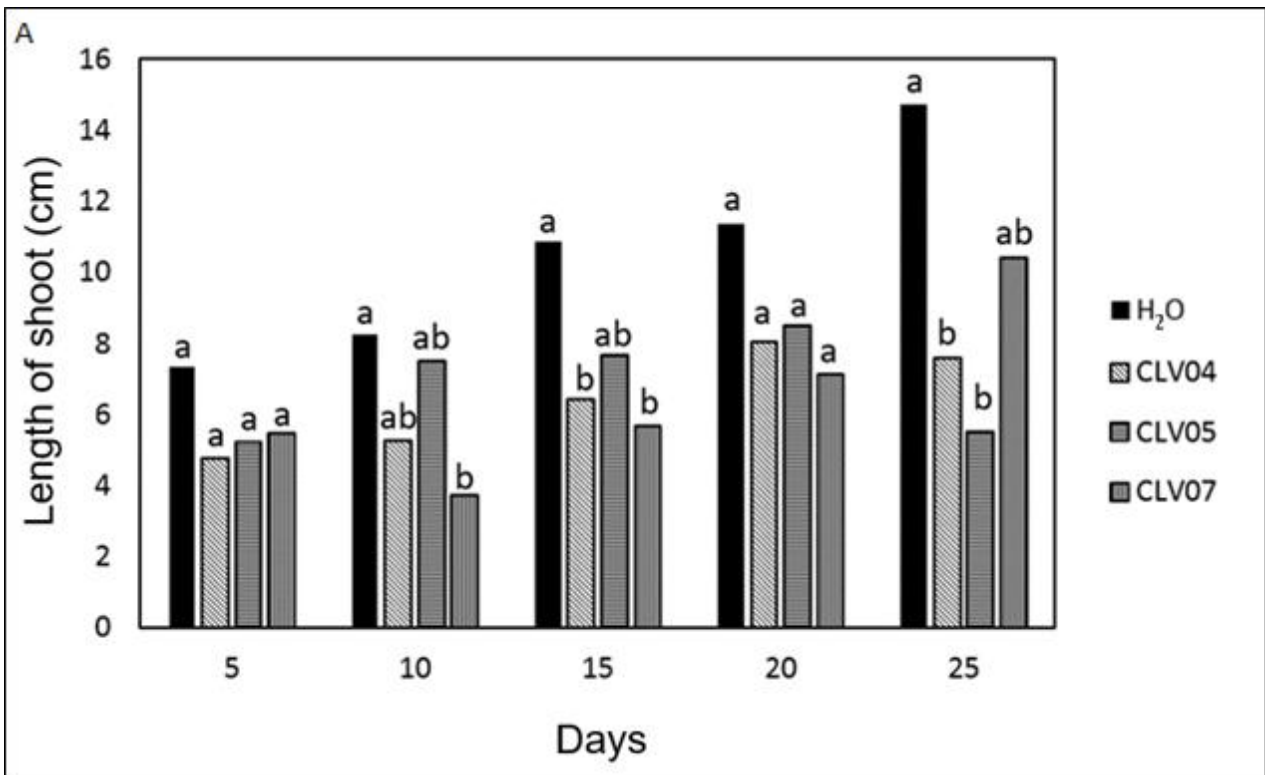


Figure 2 – Shoot length of *in vitro* seedlings of *S. lycopersicum* germinated from microbiolized seeds with CLV04, CLV05 and CLV07. Control treatment (H₂O) consisted in non-microbiolized seeds. Different letters in the bars indicate significant statistical difference (ANOVA OneWay, Duncan p ≤ 0.05)

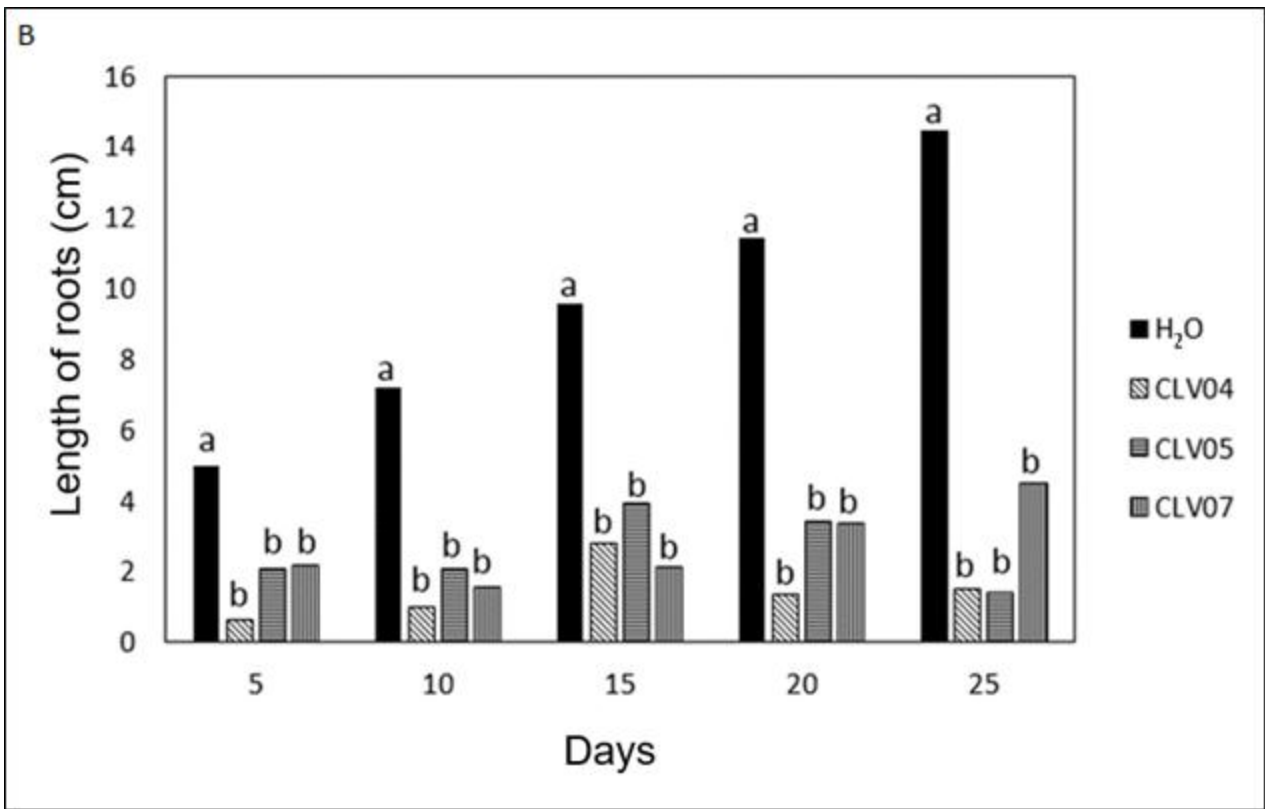


Figure 3 – Root length of *in vitro* seedlings of *S. lycopersicum* germinated from microbiolized seeds with CLV04, CLV05 and CLV07. Control treatment (H₂O) consisted in non-microbiolized seeds. Different letters in the bars indicate significant statistical difference (ANOVA OneWay, Duncan $p \leq 0.05$)

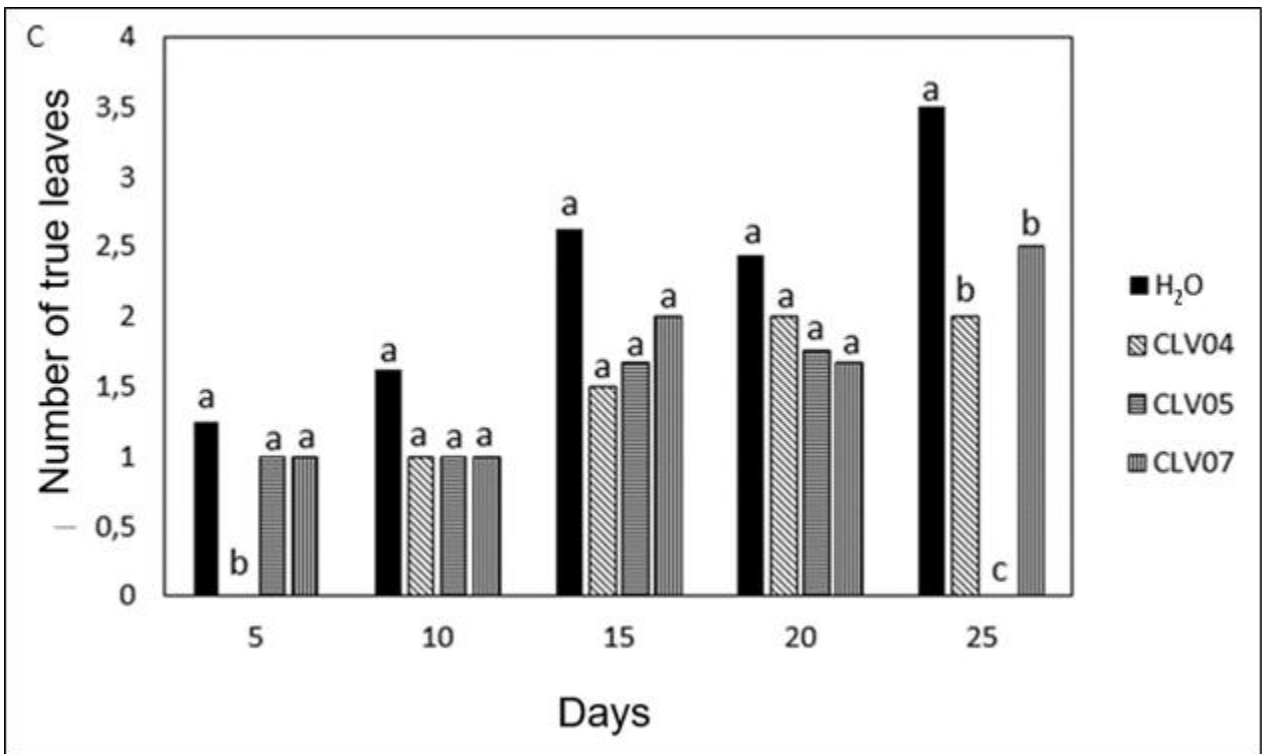


Figure 4 – Number of true leaves of *in vitro* *S. lycopersicum* seedlings germinated from microbialized seeds with CLV04, CLV05 and CLV07. Control treatment (H₂O) consisted in non-microbialized seeds. Different letters in the bars indicate significant statistical difference (ANOVA OneWay, Duncan p ≤ 0.05)

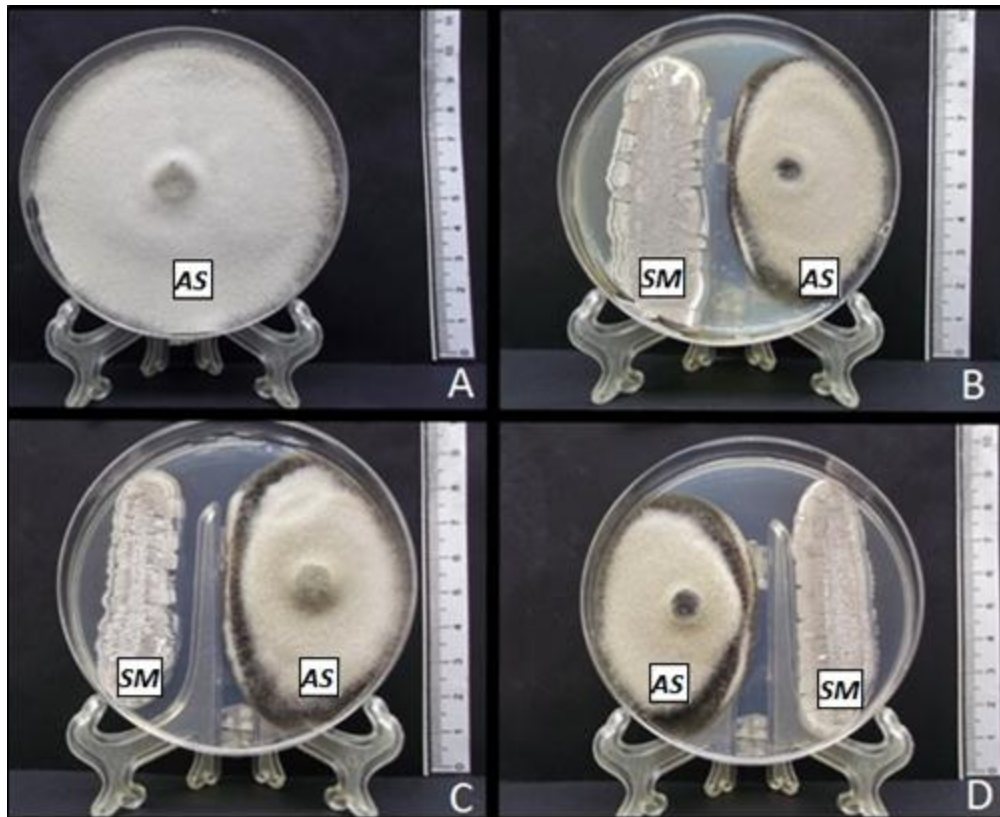


Figure 5 – Antibiosis between *Streptomyces* (*SM*) and *Alternaria solani* (*AS*). A) Mycelium of *A. solani* (control treatment). B) Co-culture of *A. solani* and CLV04. C) Co-culture of *A. solani* and CLV05. D) Co-culture of *A. solani* and CLV07.

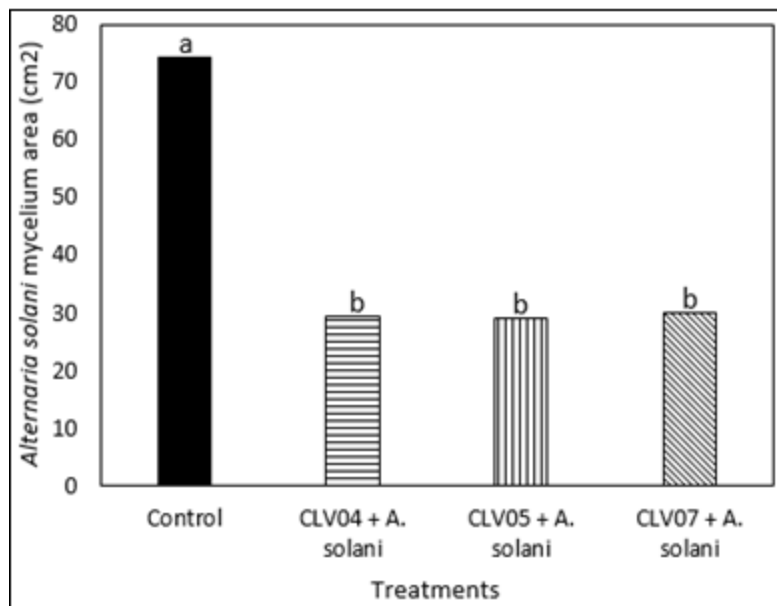


Figure 6 - Antibiosis between *Streptomyces* (CLV04, CLV05 and CLV07) and *Alternaria solani*. Data represent the growth area (cm²) of *A. solani* mycelium in the plate. Control consisted in plates without *Streptomyces*. Bars with the same letter are not significantly different (ANOVA, $\alpha \leq 0.05$) according to Duncan's Test.

1. Conclusões

Nossos dados demonstraram que:

- Apesar de CLV05 e CLV07 atrasarem as taxas iniciais de germinação, eles não comprometeram a taxa final de germinação.

- Sementes microbiolizadas com CLV04 apresentaram as menores taxas de germinação. As dificuldades no processo germinativo podem estar relacionadas a produção de metabólitos secundários pelas rizobactérias, como hydrogen cyanide, phenazine e compostos orgânicos voláteis.

- As rizobactérias avaliadas nos experimentos foram capazes de produzir concentrações elevadas de auxina. O CLV04 produziu a menor quantidade (0.13 mg/g FM) quando comparada ao CLV05 e CLV07 (0.79 e 0.979 respectivamente). A auxina pode promover o crescimento vegetal, embora altos níveis possam reduzir o crescimento das raízes.

- As plantas provenientes de sementes microbiolizadas apresentaram uma redução drástica no crescimento das raízes.

- O crescimento da parte aérea foi menos afetado pelo CLV07 ao final do período de observação (aos 25 dias). A redução na taxa de crescimento pode estar relacionada às altas concentrações de auxina produzidas pela rizobactéria. Além disto, também existe a possibilidade de produção de compostos fitotóxicos. Ainda, é admissível que os altos níveis de auxina auxiliem as rizobactérias na colonização inicial das raízes. Sugere-se que o efeito inibitório inicial do desenvolvimento das plântulas seja compensado após este período inicial de colonização.

- O CLV07 foi capaz de promover uma redução significativa dos sintomas da pinta-preta causado por *A. solani* quando inoculado em plântulas de tomate. É possível que a presença da rizobactéria induza o estado de *priming* no tomateiro, através de ISR.

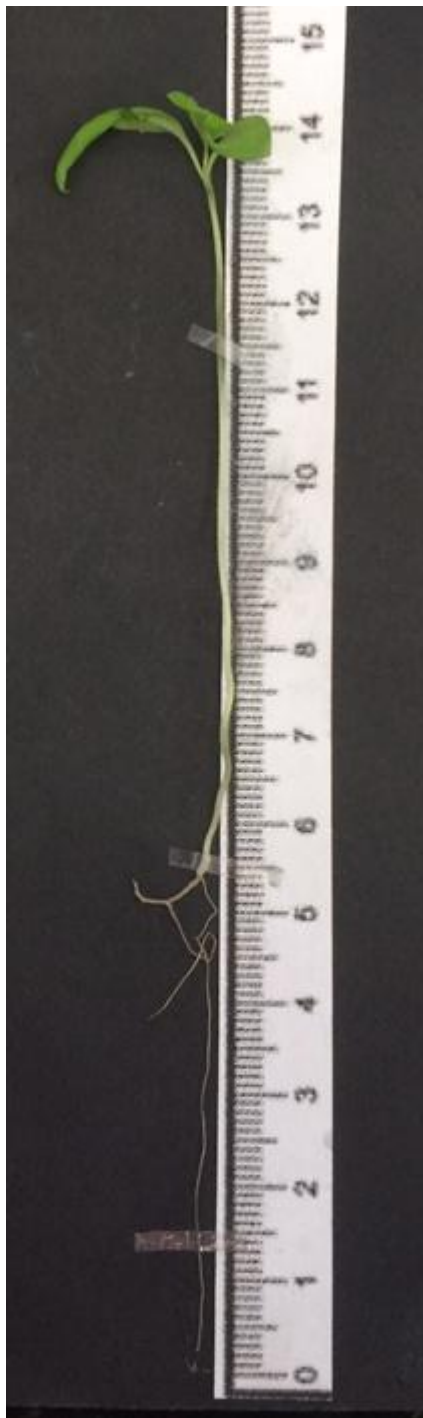
- As rizobactérias demonstraram competência em reduzir o desenvolvimento do micélio do fungo fitopatogênico. Esta habilidade talvez esteja relacionada à já conhecida capacidade de produção de metabólitos secundários, e moléculas bioativas como antibióticos.

2. Perspectivas

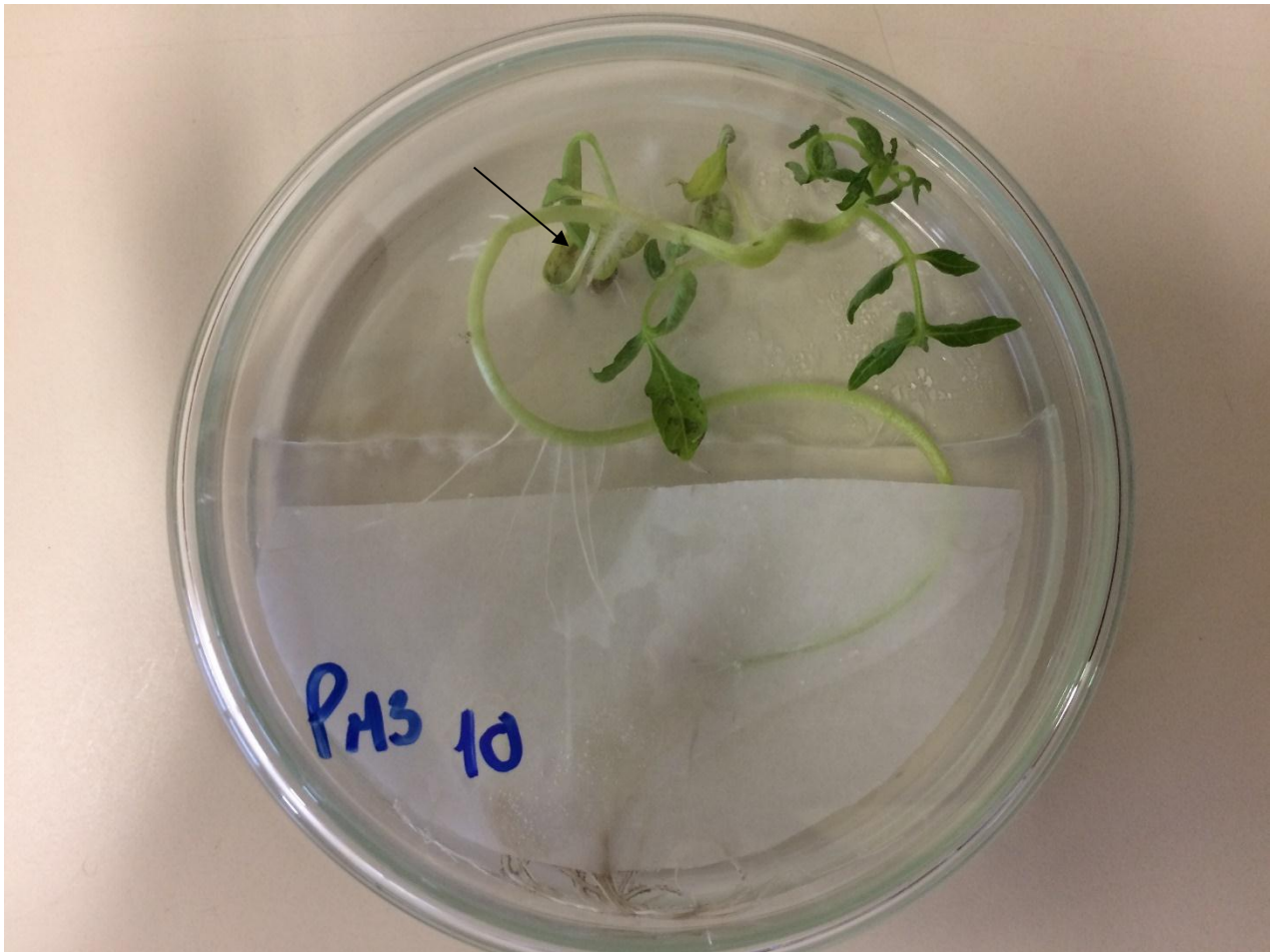
O fato das sementes de tomate microbiolizadas com os isolados CLV04, CLV05 e CLV07 apresentarem dificuldades de germinação e de crescimento inicial, pode ser melhor compreendido através das seguintes abordagens:

- Potencial uso como herbicida – Determinar e avaliar compostos fitotóxicos produzidos pelas bactérias visando inibir a germinação e o crescimento inicial de plantas invasoras.
- Aumentar o período de observação do crescimento das plântulas – Observar o crescimento das plantas por 60 dias, utilizando sementes de tomate microbiolizadas e germinadas em vaso mantidos em casa de vegetação.
- Interação das rizobactérias com a microbiota do solo - Avaliar o efeito da interação entre a microbiota autóctone do solo e os CLV04, CLV05 e CLV07 em sementes e plantas de tomate cultivadas em substrato orgânico.

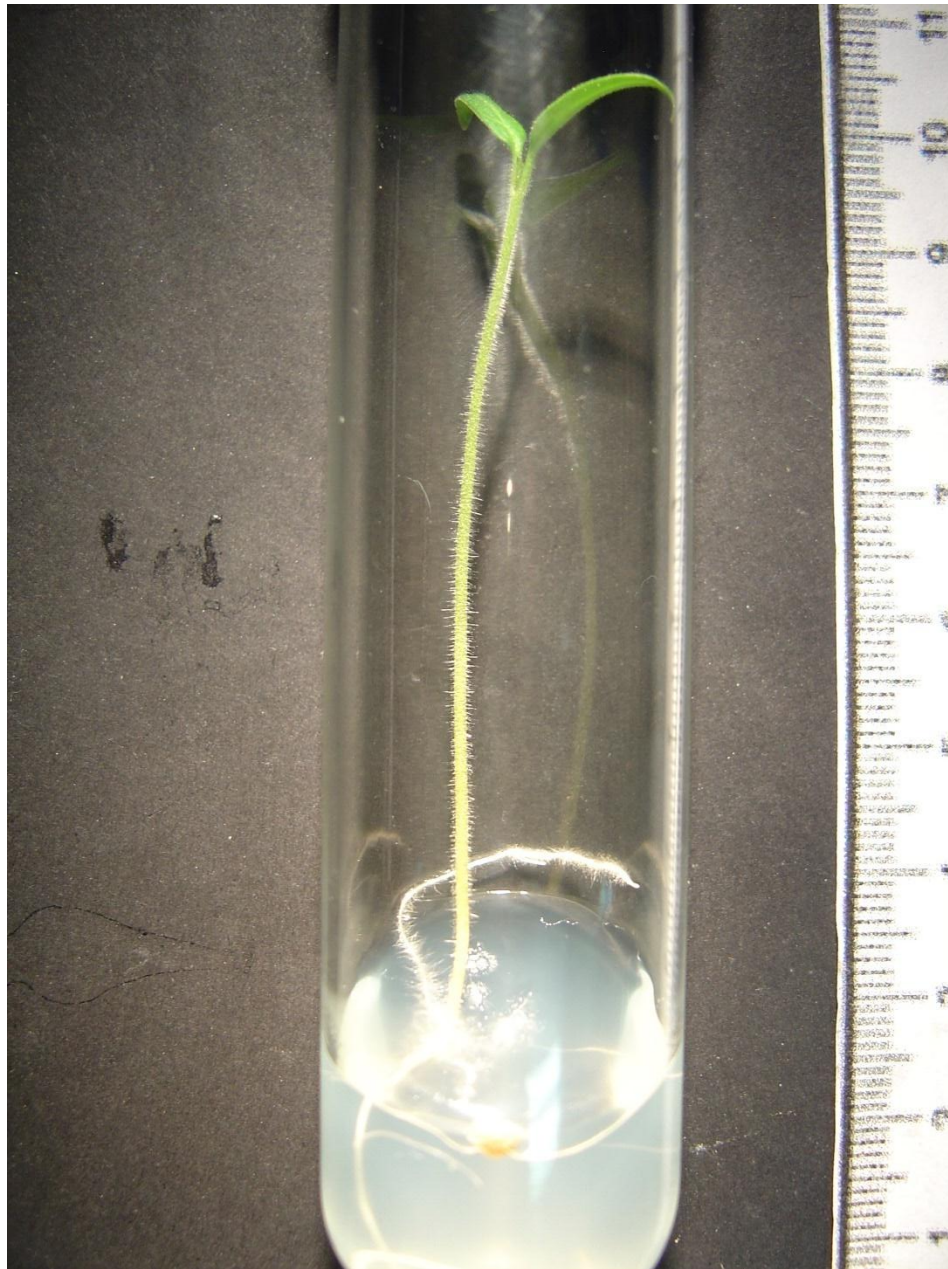
3. Material Suplementar



S_01 – Plantas de tomate provenientes de sementes microbiolizadas com o CLV07, crescendo por 15 dias *in vitro*.



S_02 – Plantas de tomate provenientes inoculadas com o CLV05 e desafiadas com *A. solani*. A seta indica sintoma de doença pinta-preta.



S_03 – Plantas de tomate provenientes de sementes microbiolizadas com o CLV07, crescendo por 10 dias *in vitro*.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br