

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE
Streptomyces scabiei E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE MICRO-
ORGANISMOS NO CONTROLE DA SARNA DA BATATA**

RENATA COMPARONI

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agrossistema
Orientadora: Prof^a. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Comparoni, Renata.

Caracterização da diversidade genética de linhagens de *Streptomyces* e avaliação do potencial antagônico de micro-organismos no controle da sarna da batata./ Renata Comparoni.—São Paulo, 2015.

84 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Linha de pesquisa: caracterização,

Orientadora: Suzete Aparecida Lanza Destefano

Versão do título para o inglês:

1. *Solanum tuberosum* 2. 3.
4. 5. I. Comparoni, Renata II. Destefano, Suzete III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Renata Comparoni

Título: Caracterização da diversidade genética de linhagens de *Streptomyces scabiei* e avaliação do potencial antagônico de micro-organismos no controle de sarna da batata.

Orientador(a): Profa Dra Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agrossistema.

Aprovada em: 29.05.2015

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Suzete Ap. Lanza Destéfano

*Instituição: Instituto Biológico - IB

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Cleusa Maria Mantovanello Lucon

*Instituição: Instituto Biológico - IB

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Sérgio Hayato Seike

*Instituição: Instituto federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – IFTM Uberaba

DEDICÁTORIA

A Deus por nunca me abandonar nos momentos mais difíceis;
aos meus pais, pelo incentivo sempre, pelo amor e carinho de todos os dias;
e ao meu namorado por todo o companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as bênçãos em minha vida e principalmente aquelas recebidas no ano de 2013.

À Prof^a Dra. Suzete Lanza Destefano, Susi, por ter me dado à oportunidade de voltar a estudar, pelos ensinamentos, por confiar em meu trabalho, pelo fornecimento de materiais para realização dos meus testes e principalmente, pela amizade.

À Dra. Cleusa Maria Mantovanello Lucon, por toda a ajuda, ideias e colaborações, me ensinando muito sobre controle biológico, tudo o que sei hoje com certeza foi com sua dedicação. Muito obrigada pela paciência, por todo o tempo em responder e-mails, pelas visitas ao seu laboratório, em São Paulo, e claro pelas ligações desesperadas cheias de dúvidas.

À Prof^a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, pelas sugestões e correções apresentadas.

Ao Prof Dr. Sérgio Hayato Seike, pela disposição em participar da banca de defesa.

Ao Dr. Julio Rodrigues Neto, que foi meu professor, meu mestre, me ensinando toda a parte de microbiologia e por confiar deixando a Coleção de fitobactérias (IBSBF) aos meus cuidados. Por tirar dúvidas e ser muito paciente e compreensivo com meus testes do mestrado.

À Dra Fabiana Fantinatti Garboggini, por ceder as linhagens de *Streptomyces* sp., isoladas de cupinzeiro ou solo, usadas nesse estudo.

À MSc. Irene Maria Gatti de Almeida, Dona Irene, pelas broncas, discussão, mas, que isso foi essencial ao meu crescimento, por sempre me ensinar tirando minhas dúvidas, sendo muito paciente. E me fazendo chorar por ser tão doce, me mostrando que um gesto simples muda o mundo. Volta logo, a senhora faz muita falta!

À Associação Brasileira da Batata (ABBA) pelo fornecimento dos tubérculos semente utilizadas no estudo e em especial ao engenheiro agrônomo Natalino Yassushi Shimoyama.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pelo incentivo financeiro com a concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a minha grande amiga, “irmã” e colega de trabalho, Lu, que sempre me ajudou, me esclarecendo dúvidas que surgiam, por me apoiar, me ajudar nas milhões de placas dos meus testes, pela ajuda com minhas “batatinhas”, por me incentivar, por não me deixar desanimar nas horas difíceis, principalmente pela amizade e companheirismo, por ser meus “ouvidos” dentro e fora do laboratório. Te amo miga!

A minha querida amiga Mari, que me ensinou muito no laboratório e com o passar dos anos nos tornamos melhores amigas, mesmo não tendo mais a convivência diária, a amizade e companheirismo não tenha mudado. Por acompanhar o crescimento de seus “filhotes” e ganhar de presente ouvindo essas lindezas me chamando de “Tia Rê”. Amo muito vocês!

Aos amigos de laboratório, Lú, Alex, Soninha, Denise, Beriam, D. Irene, Pedro, Mariana, Bárbara, Karen, Daniele, Lucas pelas risadas e horinhas de café, pelos bate-papos tirando a tensão e deixando os dias mais animados. E as pessoas queridas que não estão mais presente no meu dia-a-dia, Mari, Jaque, Thaís, Anne, Mari T, Marina, muito obrigada pela convivência diária, foi muito bom estar com vocês.

Ao Lucas, pela paciência em me ajudar nas análises estatísticas e por tirar algumas dúvidas. Valeu garotinho!

A Daniele, pelos DNA fornecidos das bactérias, por algumas informações de sua dissertação, por esclarecer as dúvidas com os testes na estufa e principalmente pela amizade. Obrigada Dani Dani garotinha!

A Soninha, por ser uma pessoa maravilhosa e solidária, ouvindo meus desabafos, conversando sobre muitas coisas, pela ajuda em autoclavar minhas

milhões de placas e por ajudar na estufa. Obrigada por tudo, você é uma grande amiga!

Ao Pedro por me ajudar com os vasos enchendo-os com substrato, fazendo “carreto” entre as estufas e principalmente pelas conversas, risadas e bom humor. Você tem um coração enorme.

Aos colegas de turma do mestrado pela companhia praticamente diária no primeiro ano, amizade que serão eternas e principalmente a Amanda – Formiguinha, pelas conversas e risadas, pela companhia em São Paulo e Campinas, minha “irmãzinha” querida que ganhei junto a esse título, você é muito especial em minha vida e ao querido André, pelas vezes que foi especialmente no Instituto em São Paulo para almoçarmos juntos, pelas conversas e incentivo, com certeza você é um grande amigo, obrigada!

Agradeço a todos da minha família, tias, tios, primas, primos, avôs, nona, sogros, cunhada, por sempre estarmos juntos e pelas horas de alegria e tristeza, que juntos somos mais fortes. Ao meu querido Nono (in memoriam) pelas lembranças, amor e carinho, o senhor faz muita falta!

A minha irmã, Roberta, meu cunhado “Gugu” que me recebem de braços abertos nos finais de semana e principalmente meu sobrinho lindo Samuel, que me faz esquecer os problemas e me faz ver a vida ainda mais bonita. A “Tatá” te ama de todo coração.

Ao meu amado namorado Juan, que me incentiva, me ajuda, ouve todas minhas lamentações e os problemas que surgiram durante esses dois anos, enxugando minhas lágrimas nas horas mais difíceis e me fazendo rir sempre. Muito obrigada “amor”. Amo-te imensamente!

Agradeço aos meus amados pais, Roberto e Darli, que me incentivaram, me ajudaram de todas as formas para a realização desse sonho, entendendo a ausência, o nervosismo, me apoiando e me dando forças para não desistir nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por tudo, eu os amo demais.

A todos que, direta ou indiretamente, colaborou para a realização deste trabalho, meu sincero obrigada!

COMPARONI, R. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE *Streptomyces scabiei* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE MICRO-ORGANISMOS NO CONTROLE DA SARNA DA BATATA. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

A sarna da batata é uma das principais doenças bacterianas que afetam a cultura e é causada por *Streptomyces scabiei* e outras diferentes espécies do gênero. Os sintomas característicos da sarna comum são lesões tipicamente arredondadas com uma textura áspera e corticosa e variam a profundidade podendo ser superficial, elevada e profunda com coloração de pardo-clara a pardo-escura. O presente estudo teve por objetivo, caracterizar a diversidade genética de 43 linhagens de *Streptomyces scabiei*, isoladas de diferentes regiões produtoras do Brasil por meio da técnica de rep-PCR (REP-, ERIC- e BOX-PCR) e avaliar o potencial antagônico de dez linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo, 14 linhagens de *Bacillus subtilis* e uma de *Paenibacillus* sp. no controle da sarna da batata por meio de testes *in vitro*. Nesses testes foram empregadas as técnicas de difusão em Ágar, semeadura por estrias, produção de compostos voláteis e pareamento de culturas. Por último, linhagens de *B. subtilis* foram avaliadas quanto à capacidade de promover o crescimento de plantas de batata *in vivo*. Resultados obtidos com análises de *fingerprinting* possibilitaram a construção de dendogramas de similaridade. Nos experimentos com o iniciador BOX A1R verificou-se a formação de vários grupos de similaridades de 2 a 100%, sendo observada uma grande variabilidade genética entre as linhagens analisadas. Com relação aos experimentos empregando-se os iniciadores ERIC1R/ ERIC2 observou-se similaridades entre 3 a 100% com a formação de diversos agrupamentos, onde não foi possível a separação das linhagens por

origem geográfica e/ou variedade de batata afetada. Nos testes de difusão em ágar, somente foi observado halo de inibição nos ensaios com a linhagem de *Streptomyces* sp. PA 03, isolada de solo. A dificuldade em inativar as linhagens de *B. subtilis* impossibilitou a realização do teste de semeadura por estrias. Nos testes de avaliação de produção de metabólitos voláteis, verificou-se 33,33% de inibição no crescimento da linhagem Tipo de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T) quando a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 810 foi testada. Nos testes com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298, foi observada uma taxa 37,37% de inibição com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 814 e 36,36% com IBSBF 899. As nove linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo não produziram qualquer efeito de inibição no crescimento das linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2049^T e 2318. Por outro lado, nos testes com a linhagem IBSBF 2298 observou-se que a linhagem PA 27 causou 14,43% de inibição; as linhagens PA 10 e LC 32 causaram 20,75%; a linhagem MC 25, 23,45%; e o melhor resultado foi de 30,64% utilizando-se a linhagem *Streptomyces* sp. LC 03. Nos testes de pareamento de culturas com as linhagens IBSBF 2049^T e 2318 não foram observadas diferenças significativas entre as nove linhagens de *B. subtilis* testadas e o controle. Nos ensaios com a linhagem IBSBF 2298 e *B. subtilis* IBSBF 814 a porcentagem de inibição foi de 22,65%, enquanto que com a linhagem IBSBF 897, 20,25% e IBSBF 812, 19,08%. Nos testes com as linhagens de *Streptomyces* sp. somente a linhagem PA 27 (solo) apresentou 12% de inibição no crescimento da linhagem IBSBF 2318. No teste de promoção de crescimento, os melhores resultados foram obtidos com as linhagens IBSBF 898 e 896, com 37,07% e 35,71% de aumento de massa seca.

Palavras – chaves: *Solanum tuberosum*, rep-PCR, antagonismo, promoção de crescimento.

COMPARONI, R. CHARACTERIZATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF *Streptomyces scabiei* STRAINS AND EVALUATION THE ANTAGONISTIC POTENTIAL OF MICROORGANISMS STRAINS IN CONTROLLING OF POTATO SCAB. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

Potato scab is a major bacterial disease that affects the culture and is caused by *Streptomyces scabiei* and another species of the genus. The characteristic symptoms of common scab are typically rounded lesions with a rough texture of cork that can appear high, on the surface or deep into the potato, with coloration range from pale to dark brown. The present study aimed to characterize the genetic diversity of 43 strains of *Streptomyces scabiei* isolated from different producing areas in Brazil through the technique of rep-PCR (REP-, ERIC- and BOX-PCR), and evaluate the antagonistic potential of 14 strains of *Bacillus subtilis*, one strain of *Paenibacillus* sp. and ten strains of *Streptomyces* sp., isolated from termite nest or soil, for the control of potato scab *in vitro*. The techniques used in the work were agar diffusion, streak method, production of volatile compounds and pairing of cultures. Finally, strains of *B. subtilis* were evaluated for the ability to promote potato plant growth *in vivo*. Results obtained from fingerprinting analyzes allowed the construction of similarity dendrograms. In the experiments with the BOX A1R primer sequence distinct groups were formed with a high genetic variability between the strains (similarity from 2% to 100%). The experiments with ERIC1R / ERIC2 primes showed similarities ranging 3% to 100% with the several groups. In both experiments it was not possible to separate the strains by geographical origin or variety of potato plant. On the tests of agar diffusion it was observed that the strains of *B. subtilis* and *Paenibacillus* sp. showed no inhibition zone for pathogenic strains. The inhibition zone was only observed in the tests with the strain of *Streptomyces* sp PA 03, isolated from soil. The difficulty in inactivating the strains of *B. subtilis* prevented the achievement of streak method. On the evaluation tests of

production of volatile compounds it was observed a 33.33% inhibition rate on the growth of strain of *S. scabiei* (IBSBF 2049^T) when the strain of *B. subtilis* IBSBF 810 was tested. On the tests with the strain of *S. scabiei* 2298 IBSBF a 37.37% inhibition rate was observed with the strain of *B. subtilis* IBSBF 814 and 36.36% with IBSBF 899. On this assay it was observed that the nine strains of *Streptomyces* sp. isolated from soil or termite nest had no effects on the growth of strains of *S. scabiei* IBSBF 2049^T and 2318. Otherwise on the tests with the IBSBF 2298 strain it was observed that the PA 27 strain caused 14,43% of inhibition. The PA 10 and LC 32 strains caused 20.75%; the MC 25 strain 23.45% and the best result was 30.64% caused by *Streptomyces* sp. LC 03 strain. On the tests of pairing of cultures with *S. scabiei* IBSBF 2049^T and 2318 no significant differences were observed among the nine strains of *B. subtilis* tested and the control. On the tests with *S. scabiei* IBSBF 2298 strain with *B. subtilis* IBSBF 814 it was found 22.65% inhibition while with the strain IBSBF 897 the percentage was 20.25% and IBSBF 812 strain was 19.08%. On the tests with strains of *Streptomyces* sp. isolated from soil or termite nest, only PA 27 strain (isolated from soil) showed 12% of inhibition of the growth of IBSBF 2318 strain. On the test of growth promotion the best result was obtained by inoculation with IBSBF 898 strain, showing 37.07% dry weight increase; the IBSBF 896 strain showed 35,71%.

Keywords: *Solanum tuberosum*, rep-PCR, antagonism, growth promotion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões nos tubérculos de batata causadas por <i>Streptomyces</i> sp.....	5
Figura 2. Ciclo da sarna da batata.....	9
Figura 3. Representação esquemática da formação de endósporo em uma célula da bactéria <i>B. subtilis</i> quando as condições nutricionais são limitantes. 1) Célula em condições normais; 2) Condensação e alinhamento do DNA no centro da célula; 3) Invaginação celular e início da divisão do DNA em dois componentes; 4) Separação do DNA em dois componentes e formação do pré-endósporo; 5) Crescimento da porção maior da célula que engloba o pré-endósporo; 6) Envolvimento do pré-endósporo por duas camadas de membrana e degradação do DNA; 7) Formação externa de um revestimento proteico e maturação do endósporo; 8) Formação de uma camada adicional denominada de exosporica; 9) Endósporo maduro, resistente as condições ambientais; 10) Destruição da célula bacteriana por enzimas líticas e liberação do endósporo e 11) Endósporo maduro.....	18
Figura 4. Placas de Petri seladas com película tipo “parafim” no teste de metabólito volátil.....	31
Figura 5. Produtos de amplificação do DNA de linhagens de <i>S. scabiei</i> utilizando-se o iniciador BOX A1R. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Linhagens IBSBF (1) 1886, (2) 2049 ^T , (3) 2124, (4) 2147, (5) 2203, (6) 2204, (7) 2242, (8) 2248, (9) 2250, (10) 2251, (11) 2257, (12) 2282, (13) 1936, (14) 2293, (15) 2294, (16) 2298, (17) 2308, (18) 2315, (19) 2316, (20) 2317, (21) 2359, (22) 2388, (23) 2408, (24) 2409, (25) 2410, (26) 2411, (27) 2475, (28) 2476, (29) 2501, (30) 2502, (31) 2503, (32) 2523, (33) 2524, (34) 2528, (35) 2529, (36) 2809, (37) 2811, (38) 2860, (39) 2950, (40) 2954, (41) 2228, (42) 2239 e (43) 2292.....	34
Figura 6. Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação utilizando-se o iniciador BOX A1R.....	35
Figura 7. Produtos de amplificação do DNA de linhagens de <i>S. scabiei</i> utilizando-se os iniciadores de ERIC1R/ ERIC2 (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Linhagens IBSBF (1) 1886, (2) 2049 ^T , (3) 2124, (4) 2147, (5) 2203, (6) 2204, (7) 2242, (8) 2248, (9) 2250, (10) 2251, (11) 2257, (12) 2282, (13) 1936, (14) 2293, (15) 2294, (16) 2298, (17) 2308, (18) 2315, (19) 2316, (20) 2317, (21) 2359, (22) 2388, (23) 2408, (24) 2409, (25) 2410, (26) 2411, (27) 2475, (28) 2476, (29) 2501, (30) 2502, (31) 2503, (32) 2523, (33) 2524, (34) 2528, (35) 2529, (36) 2809, (37) 2811, (38) 2860, (39) 2950, (40) 2954, (41) 2228, (42) 2239 e (43) 2292.....	36
Figura 8. Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação utilizando-se os iniciadores ERIC1R/ ERIC2.....	37

- Figura 9.** Teste de difusão em Ágar utilizando-se a linhagem de *B. subtilis*. (IBSBF 812) contra linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T. (A) controle somente com água; (B) (C) e (D) Placas contendo 50 µL do filtrado da linhagem de *Bacillus* no orifício central..... 39
- Figura 10.** Teste de difusão em Ágar utilizando-se a linhagem de *B. subtilis*. (IBSBF 814) contra linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298. (A) controle somente com água; (B) (C) e (D) Placas contendo 50 µL do filtrado da linhagem de *Bacillus* no orifício central..... 39
- Figura 11.** Teste de difusão em Ágar utilizando-se linhagem a de *Paenibacillus* sp. (IBSBF 2305) contra linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318. (A) controle somente com água; (B) (C) e (D) Placas contendo 50 µL do filtrado da linhagem de *Paenibacillus* no orifício central..... 40
- Figura 12.** Teste de difusão em Ágar utilizando-se a linhagem de *Streptomyces* sp. (PA 03) contra linhagens de *Streptomyces scabiei* (A) IBSBF 2049^T e (B) IBSBF 2298..... 41
- Figura 13.** (A) Linhagens de *S. scabiei* semeadas no sentido horizontal (IBSBF 2049^T, 2298 e 2318) e linhagens de *B. subtilis* semeadas na vertical (IBSBF 812 e 813). (B) linhagens de *S. scabiei* semeadas na horizontal (IBSBF 2049^T, 2298 e 2318) e linhagem de *B. subtilis* (IBSBF 810) e de *Paenibacillus* sp. (IBSBF 2305) semeadas na vertical..... 42
- Figura 14.** Teste de metabólito volátil utilizando-se (A) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 814; (B) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298 com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 814 e (C) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318 com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 899..... 43
- Figura 15.** Teste de metabólito volátil utilizando-se (A) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T com a linhagem de *Streptomyces* sp. MC 25; (B) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298 com a linhagem de *Streptomyces* sp. LC 03 e (C) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318 com a linhagem de *Streptomyces* sp. PA 27..... 45
- Figura 16.** Teste de pareamento de culturas utilizando as linhagens de *Bacillus subtilis* (A) IBSBF 897 contra linhagem patogênica IBSBF 2049^T. (B) IBSBF 815 contra linhagem patogênica IBSBF 2298 e (C) IBSBF 814 contra linhagem patogênica IBSBF 2318..... 48
- Figura 17.** Teste de promoção de crescimento de plantas de batata em casa de vegetação empregando-se linhagens de *B. subtilis*..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Streptomyces scabiei</i> analisadas neste estudo.....	26
Tabela 2. Linhagens de <i>Streptomyces</i> sp., isoladas de cupinzeiro.....	27
Tabela 3. Medidas do crescimento radial (mm) de linhagens de <i>S. scabiei</i> IBSBF 2049 ^T , 2298 e 2318 após teste de metabólito volátil com as linhagens de <i>B. subtilis</i> IBSBF 809, 810, 814 e 899 e porcentagem de inibição.....	43
Tabela 4. Medidas do crescimento radial (mm) de linhagens de <i>S. scabiei</i> IBSBF 2049 ^T , 2298 e 2318 após teste de metabólito volátil com as linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. porcentagem de inibição.....	45
Tabela 5. Medidas do crescimento radial (mm) de linhagens de <i>S. scabiei</i> IBSBF 2049 ^T , 2298 e 2318 após teste de pareamento de cultura com as linhagens de <i>B. subtilis</i> IBSBF 808, 810, 814, 815, 897, 898, 899 e 900 e porcentagem de inibição.....	47
Tabela 6. Massa média de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de batata, inoculadas com as linhagens de <i>Bacillus subtilis</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µM	micromolar
16S	RNA ribossomal em procariotos
16S-23S	região espaçadora entre os RNAs ribossomais 16S e 23S
ABBA	Associação Brasileira da Batata
AJ	ácido jasmônico
AS	ácido salicílico
<i>atpD</i>	gene codificante da cadeia β da ATP sintase
BA	Bahia
BDA	Batata Dextrose Agar
BSA	Albumina Sérica Bovina
BOX	elementos Box
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAr	ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DRM	Divisão de Recursos Microbianos
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence
Et	etileno
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>

FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
g	gramas
GO	Góias
i.a.	ingredientes ativo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBSBF	Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
Kg	Kilograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
NA	Nutriente Ágar
NaCl	cloreto de sódio
NaOCl	hipoclorito de sódio
ng	nanograma
°C	graus Celsius
ONU	Organização das Nações Unidas
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Potato Dextrose both
pH	potencial hidrogeniônico

PR	Paraná
qsp	quantidade suficiente para
REP	Repetitive Extragenic Palindromic sequence
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucléico
RPCP	Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas
rpm	rotações por minuto
rpoB	gene codificante da subunidade β da RNA polimerase
RS	Rio Grande do Sul
RSI	resistência sistêmica induzida
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo
sp.	Espécie
SIMQUAL	Programa de Similaridade para Dados Qualitativos
T	linhagem Tipo
TAE	Tris - Acetato - EDTA
TAE	Tris - Acetato - EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
TE	Tris - EDTA
txtAB	operon com os genes <i>txtA</i> e <i>txtB</i> que codificam sintetases da taxtomina
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean

UV	Luz Ultra Violeta
YME	<i>Yeast Malt Extract</i>
μL	microlitro

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O histórico da cultura da batata e dados de produção no Brasil.....	3
2.2. Problemas fitossanitários da batata e caracterização das espécies patogênicas de <i>Streptomyces</i>	4
2.2.1. Ciclo da doença e Epidemiologia.....	8
2.3. Controle da sarna da batata.....	10
2.3.1. Batata – semente certificada.....	11
2.3.2. Tratamento químico.....	11
2.3.3. Rotação de culturas.....	12
2.3.4. Acidificação do solo.....	12
2.3.5. Adubação do solo.....	12
2.3.6. Manejo de irrigação.....	13
2.3.7. Legislação.....	13
2.4. Controle Biológico.....	14
2.5. Vantagens e desvantagens do controle biológico.....	15
2.6. Controle biológico da sarna da batata.....	16
2.7. <i>Bacillus subtilis</i> no controle biológico de doenças de plantas.....	17
2.8. Promoção de crescimento em plantas por <i>Bacillus subtilis</i>	19
2.9. Síntese de metabólitos.....	20
2.10. Diversidade Genética em <i>Streptomyces scabiei</i>	21
3. OBJETIVO GERAL.....	24
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25

4.1.	Linhagens testados nesse estudo e condições de cultivo.....	25
4.2.	Caracterização Molecular.....	27
4.2.1.	Extração de DNA cromossômico.....	27
4.2.2.	Análise da diversidade genética dos isolados de <i>Streptomyces scabiei</i> por rep-PCR.....	28
4.2.3.	Análise dos padrões de <i>fingerprinting</i>	28
4.3.	Avaliação do potencial antagonístico <i>in vitro</i>	29
4.3.1.	Teste de difusão em Ágar.....	29
4.3.2.	Método de semeadura por estrias.....	30
4.3.3.	Avaliação de produção de metabólitos voláteis.....	30
4.3.4.	Teste de pareamento de culturas.....	31
4.3.5.	Teste de promoção de crescimento <i>in vivo</i>	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1.	Análise dos padrões de <i>fingerprinting</i>	34
5.1.1.	Análise por BOX-PCR.....	34
5.1.2.	Análise por ERIC-PCR.....	36
5.1.3.	Análise por REP-PCR.....	37
5.2.	Avaliação do potencial antagonístico <i>in vitro</i>	38
5.2.1.	Teste de difusão em Ágar.....	38
5.2.2.	Método de semeadura por estrias.....	42
5.2.3.	Avaliação de produção de metabólitos voláteis.....	42
5.2.4.	Teste de pareamento de culturas.....	46
5.2.5.	Teste de promoção de crescimento <i>in vivo</i>	49
6.	CONCLUSÕES.....	52
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	54

1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.), originária da região dos Andes e difundida para diversos países, é uma cultura de grande importância alimentícia e um dos alimentos mais completos em termos nutricionais, sendo o terceiro alimento mais produzido no mundo, depois do arroz e trigo (SHIMOYAMA, 2012). Devido às suas características nutricionais, é um dos vegetais mais importantes na dieta alimentar de vários países e é considerada a segunda maior fonte de nutrientes para a humanidade, sendo superada somente pelo ovo. Além disso, é um alimento de fácil cultivo, com alto rendimento por área quando comparada a outros alimentos e com demanda crescente da sua produção (FAO, 2010).

No Brasil, os principais estados produtores são Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Bahia, Goiás, Santa Catarina, Espírito Santo, Distrito Federal e Paraíba (IBGE, 2013). As cultivares de batata mais plantadas no país são importadas, sendo elas Ágata, Monalisa, Asterix, Atlantic, Cupido e Mondial. A cultivar Ágata é muito produtiva, mas muito suscetível às doenças. A produção atende ao mercado interno e o consumo anual é abaixo de 10 kg por pessoa. Muito pouco do produto é destinado à exportação, principalmente sob a forma de batata processada (FAO, 2008).

A produtividade brasileira de batata ainda é considerada baixa devido principalmente às pragas e doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e pragas, que afetam essa cultura (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

Entre as doenças bacterianas que atacam a cultura, podemos citar a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, a podridão mole causada por bactérias do gênero *Pectobacterium* e a sarna da batata, causada por diferentes espécies de bactérias do gênero *Streptomyces*. Esta última é de ocorrência generalizada nas regiões produtoras do Brasil e é considerada uma das doenças de maior importância econômica, pois reduz consideravelmente a comercialização do produto devido aos sintomas externos causados nos tubérculos (HOOKER, 1981).

A incidência da sarna nos campos de produção depende de diversos fatores como a adaptação ou predominância de espécies de *Streptomyces* mais agressivas, o aumento da área plantada com variedades de batata suscetíveis, a dispersão de *Streptomyces* patogênicos por meio de batata semente contaminada e práticas culturais que promovam condições favoráveis à sarna, como a compactação e a alteração da microbiota do solo devido ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

Considerando os fatores favoráveis ao desenvolvimento da doença, diferentes estratégias de controle podem ser adotadas a fim de reduzir a incidência e severidade da

sarna da batata. Dentre elas, podemos citar o uso de cultivares resistentes à doença, a utilização da batata semente certificada, o tratamento dos tubérculos antes do plantio, a manutenção de umidade e acidificação do solo, rotação com culturas não hospedeiras, controle químico e controle biológico. Entretanto, essas práticas apresentam resultados limitados quando aplicadas isoladamente (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

O controle biológico é uma alternativa promissora no controle de fitopatógenos e vem sendo empregado em diversos estudos (SHODA, 2000; HARMAN, 2000; BYRNE et al., 2005; RAN et al., 2005; LEMESSA; ZELLER, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência são *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA et al., 2008).

O uso de micro-organismos antagonistas como agentes de biocontrole da sarna ou a incorporação de adubos verdes tem sido explorado na busca de reduzir a incidência de doenças. Os relatos mostram que há variações neste controle dependendo do patógeno em questão.

Outro ponto importante envolvendo o controle dessa doença consiste no fato de que é necessário se ter uma ideia da diversidade genética de linhagens de *S. scabiei* que ocorrem no país para um melhor entendimento das diferentes populações dessa espécie no desenvolvimento da doença no campo. Uma das ferramentas moleculares empregada em estudos de diversidade genética é a técnica de rep-PCR. Esta técnica consiste na amplificação, por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), e análise de sequências repetitivas REP (*Repetitive Extragenic Palindromic sequence*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence*) e BOX (elementos BOX) (DE BRUIJN, 1992; LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1992).

O presente projeto teve como objetivo avaliar o potencial antagônico de linhagens de *Streptomyces* sp., isoladas de cupinzeiro ou solo, *Paenibacillus* sp., *Bacillus subtilis* contra linhagens de *S. scabiei* isoladas das principais regiões produtoras de batata no Brasil visando o controle da sarna da batata no país. Outro objetivo foi a diversidade genética de linhagens de *Streptomyces scabiei* isoladas de diferentes regiões produtoras no país por meio da técnica de rep-PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da cultura da batata e dados de produção no Brasil

O primeiro registro do cultivo da batata fora da América do Sul foi no ano de 1567 nas Ilhas Canárias (Espanha) e a partir desse país foi então disseminada por toda Europa e posteriormente difundida para as outras partes do mundo (AMES; SPOONER, 2008).

Na Irlanda no século XIX, a batata atingiu o apogeu no cultivo, sendo que o consumo alcançou 200 kg/ano representando 80% da base da alimentação. Mas, o fato da alimentação depender de apenas um alimento representou uma grande vulnerabilidade, o desastre ocorreu nos anos de 1845 e 1846, quando as lavouras de batata foram dizimadas por uma doença severa causada por *Phytophthora infestans*, denominada de “Fome Irlandesa da Batata”, resultando em pobreza e emigração. Calculou-se que morreram cerca de um milhão de pessoas, enquanto que dois milhões emigraram (BROWN, 1993).

Na virada do século XIX, a cultura da batata já estava disseminada por todo mundo, sendo considerada um recurso alimentar universal. Com isso a ONU (Organização das Nações Unidas) declarou 2008 como o “Ano Internacional da Batata”, considerada um componente importante para mitigar a fome e a miséria nos países em desenvolvimento (FAO, 2008).

Segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization*), o maior produtor de batata na América Latina é o Brasil. Em 2013, a produção destinada para o consumo interno foi de 3,73 milhões de toneladas em uma área de cerca de 136 mil hectares (ha), com rendimento (produtividade por área) de 27,4 toneladas por hectare (IBGE, 2013). Na década 2000-2010 houve um aumento na produção e no rendimento por área, apesar da redução de área plantada. Segundo projeções do agronegócio dos anos de 2010 a 2020, realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de batata deverá crescer a uma taxa anual de 1,51% atingindo 4,2 milhões de toneladas e a produtividade por hectare deverá crescer 2,62%. Além disso, a melhoria tecnológica introduzida deverá levar à redução de cerca de 1,08% da área destinada para o plantio da cultura da batata (MAPA, 2010). Entretanto, segundo a Associação Brasileira da Batata (ABBA), o consumo e a produção nacional têm diminuído devido a uma série de fatores como o crescimento das importações do produto pré-frito e congelado, a falta de variedades que agradem os consumidores e a forma equivocada de comercialização da batata fresca pelas grandes redes de varejo.

2.2. Problemas fitossanitários da batata e caracterização das espécies patogênicas de *Streptomyces*

A cultura da batata impõe um constante desafio para os produtores devido ao grande número de problemas fitossanitários que ocorre durante praticamente todo o ciclo. Essa cultura é explorada o ano todo nas regiões produtoras e os problemas com pragas e doenças vêm aumentando, causando sérios danos à cultura (ZAMBOLIM et al., 2011).

Dentre as doenças importantes, podemos citar a requeima causada por *Phytophthora infestans*, a sarna pulverulenta causada por *Spongospora subterranea* e *Rhizoctonia solani* e a pinta preta por *Alternaria solani* (ZAMBOLIM et al., 2011).

Com relação às doenças bacterianas consideradas limitantes à produção destacam-se a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, a canela preta por *Pectobacterium* spp. e a sarna da batata causada por diferentes espécies *Streptomyces* (LAMBERT; LORIA, 1989a; 1989b; GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996; LIU et al., 2005; MYAJIMA et al., 1998; BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000; PARK et al., 2003). Essa última doença é considerada uma das mais importantes economicamente em todo globo, uma vez que reduz consideravelmente a comercialização do produto devido aos sintomas externos causados nos tubérculos (HOOKER, 1981).

Segundo Fischer e colaboradores (2009), as cultivares mais plantadas no Brasil são resistentes à sarna comum, dentre elas a Mondial e Jaete Bintje que apresentam índice de severidade da doença de 10,5% e 14,0%, respectivamente. Com relação às outras cultivares os índices são: 17,4% para Asterix, 21,8% para Ágata; 23,0% para Monalisa e 23,3% para Cupido.

A primeira espécie descrita como causadora da sarna foi *S. scabiei* (sin. *S. scabies*) (LAMBERT; LORIA, 1989a), presente em todas as regiões produtoras do mundo, principalmente em solos secos de neutros a alcalinos, e é considerada a espécie patogênica dominante (LAMBERT; LORIA, 1989a). Causa sintomas de sarna comum e produz a taxtomina, uma toxina que atua necrosando o tecido, levando aos sintomas característicos da doença (LAWRENCE; CLARK; KING, 1990). As lesões são tipicamente arredondadas, mas podem coalescer cobrindo porções significantes do tubérculo. Apresentam uma textura áspera e corticosa e variam em profundidade e coloração, de pardo-clara a pardo-escura (LORIA et al., 1997) (Figura 1).



Figura 1. Lesões nos tubérculos de batata causadas por *Streptomyces* sp..
(Fonte: CORRÊA, 2011).

As lesões podem ser mais elevadas, ter pontos aprofundados no centro ou serem superficiais (CULLEN; LEES, 2007). A profundidade da lesão está associada à virulência do patógeno, sendo que quanto mais superficiais, menos virulento o patógeno. Lesões elevadas e profundas caracterizam maior virulência do patógeno (LORIA et al., 1997).

Outras espécies de *Streptomyces* também já foram descritas como associadas a essa doença. São elas:

S. acidiscabies

Causadora da sarna em solos ácidos (LAMBERT; LORIA, 1989b) e os sintomas são semelhantes aos da sarna comum. Essa espécie tem como característica principal o crescimento em substrato com pH abaixo de 5,2. Foi detectada na região de Maine (Canadá) em 1953 ocorrendo em solos com valores de pH 4,5 (BONDE; McINTYRE, 1968; MANZER; McINTYRE; MERRIAM, 1977). *S. acidiscabies* também foi descrita em outros países, como o Japão, e atualmente está distribuída no mundo (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

***S. caviscabies* (sin. *S. setonii* e *S. griseus*)**

Essa espécie bacteriana foi observada inicialmente por Faucher, Savard e Beaulieu (1993) e por Faucher e colaboradores (1995), causando sintomas de “sarna profunda” na região de Quebec (Canadá). Causa lesões aprofundadas (GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996; LIU et al., 2005), são mais escuras e chegam a atingir cerca de 1 cm de profundidade (LOPES, 2011).

S. turgidiscabies

Linhagens de *S. turgidiscabies* foram observadas ocorrendo na Ilha de Hokkaido (Japão) em 1995 (TANAKA et al., 1995) e posteriormente foi descrita por Miyajima e colaboradores (1998). Os sintomas são do tipo erupente, e assemelham-se à sarna comum, produzindo um tipo de hipertrofia dos tecidos, de modo a formar erupções (elevações) na superfície dos tubérculos infectados (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

S. reticuliscabiei

Essa espécie foi isolada na França por Bouček-Mechiche e colaboradores (2000). E os sintomas causados caracterizam-se por lesões escuras, superficiais e com aspecto de rede (reticulado) (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei

Essas espécies bacterianas foram isoladas na França (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000), e são descritas como duas genomoespécies dentro da espécie *S. scabiei*, podendo ser diferenciadas por algumas características bioquímicas. Ainda, embora *S. stelliscabiei* possua características muito semelhantes à *S. europaeiscabie*, essa produz sintomas de sarna em forma de estrela (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei* e *S. niveiscabiei

O avanço das técnicas em biologia molecular, tais como o sequenciamento da região espaçadora 16S-23S e hibridização DNA-DNA, possibilitou caracterizar três novas espécies de *Streptomyces*, isoladas na Coreia, induzindo sintomas de lesões erupentes em batata cultivada em solos ácidos (PARK et al., 2003).

S. ipomoeae*, *S. aureofaciens* e *S. sampsonii

S. ipomoeae, causadora da sarna em batata-doce, foi descrita por (PERSON; MARTIN, 1940), Waksman; Henrici, (1948). Essa espécie bacteriana é morfológica e fisiologicamente distinta de outras espécies causadoras da sarna e é específica para essa espécie vegetal.

Além das espécies descritas acima, são citadas as espécies *S. aureofaciens*, considerada organismo de solo que pode vir a causar doença em batata e *S. sampsonii*, considerada saprófita, mas que já foi isolada de lesões de sarna (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; LAMBERT; LORIA, 1989a).

No Brasil, a frequência com que a sarna tem aparecido em lavouras nas regiões Sudeste e Nordeste tem preocupado os produtores. A sarna comum não afeta a qualidade culinária e dificilmente reduz a produtividade, mas compromete seriamente a aparência dos tubérculos e conseqüentemente a sua comercialização. Essa doença afeta outras culturas como beterraba, cenoura, rabanete e nabo (LOPES, 2011).

A literatura pertinente à caracterização de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata no país está resumida em um número extremamente reduzido de trabalhos, baseados na caracterização morfológica dos isolados, na avaliação da suscetibilidade de diferentes variedades hospedeiras e nas medidas de manejo da doença (FISCHER; KIMATI; MARTINS, 2003; FISHER et al., 2005; FISCHER et al., 2009; JADOSKI et al., 2009).

Estudos realizados por Fischer, Kimati e Martins (2003) sugerem a ocorrência de *S. scabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*, entretanto, as análises de identificação foram efetuadas apenas por comparação da morfologia e testes de patogenicidade, sem a inclusão nos testes das linhagens Tipo associadas à sarna da batata.

Em 2007, Salomão realizou um trabalho de levantamento, isolamento e identificação de linhagens de *Streptomyces* provenientes das principais regiões produtoras de batata no Brasil e nesse estudo foram detectadas as espécies *S. scabiei*, *S. caviscabies* e *S. turgidiscabies*. Posteriormente, esse trabalho foi ampliado por Corrêa (2011) com relação ao número de linhagens analisadas e às técnicas empregadas. Ao final, 178 linhagens foram analisadas por meio de taxonomia polifásica envolvendo análises morfológicas, testes de patogenicidade e testes moleculares, concluindo-se que das 178 linhagens analisadas, 57 (32%) foram identificadas como pertencentes à *S. scabiei*, 28 linhagens (15,7%) à *S. ipomoeae*, 13 (7,3%) à *S. caviscabies*/ *S. setonii*, 12 (6,72%) semelhantes a *S. europaeiscabiei* e duas linhagens (1,1%) semelhantes a *S. sampsonii*.

2.2.1. Ciclo da doença e Epidemiologia

Espécies de *Streptomyces* sobrevivem como saprófitas em solo ou em tecidos de planta infectados, sob a forma vegetativa micelial ou de esporos. Esses esporos podem sobreviver em solos secos por longos períodos, porém as hifas não são tolerantes à alta umidade do solo. Possuem um envoltório externo e parede mais espessa, os esporos, conseguem uma maior resistência ao calor e a seca. Esses permanecem no solo em aglomerados próximos a restos de cultura e as hifas produzidas por estes se desenvolvem radialmente, o que facilita sua dispersão (MAYFIELD et al., 1972).

Os esporos podem ser disseminados por chuva, vento, vetores ou até mesmo por tubérculos infectados. Alguns insetos também podem proporcionar a disseminação da bactéria no solo, podendo promover a entrada da doença nos tubérculos (MANZER; STORCH; SEWELL, 1984).

O inóculo contido nos tubérculos de batata contribui para a dispersão da doença e introdução de outras espécies de *Streptomyces* em novas áreas (WILSON; RANSON, PEMBERTON, 1999). Experimentos realizados em casa de vegetação por Lehtonen, Rantala e Kreuze (2004), indicaram que *S. scabiei* e *S. turgidiscabies* podem estar presentes na mesma lesão e serem transmitidos via tubérculos após seis meses de armazenamento. Esses autores verificaram ainda que *S. turgidiscabies* foi mais tolerante ao manuseio e armazenamento que *S. scabiei*.

Ao encontrar um tubérculo sadio e no início de seu desenvolvimento, esporos de *Streptomyces* penetram no tubérculo através de estruturas como lenticelas, estômatos ou ferimentos (AGRIOS, 1997) (Figura 2). Se os tubérculos estão secos durante o período de penetração, bactérias antagônicas aos patógenos, normalmente presentes nas lenticelas, desaparecem facilitando a infecção. Além disso, em solos secos, durante o crescimento dos tubérculos são produzidos ferimentos pelos quais os patógenos penetram (LEWIS, 1971).

Desde o início da tuberização, o tecido do tubérculo sofre um processo de crescimento contínuo, onde os nódulos são separados devido ao alargamento dos internódios (ADAMS, 1975). Nesse período ocorre uma maior suscetibilidade do tubérculo à infecção por *Streptomyces*, uma vez que as lenticelas jovens não estão totalmente suberizadas. Assim, desde o início da sua formação até cerca de três a quatro semanas, o tubérculo passa por um período de desenvolvimento onde os internódios estão suscetíveis à infecção. Por outro lado, com a maturação, onde aparentemente as lenticelas estão totalmente suberizadas, os tubérculos se tornam resistentes à infecção (ADAMS; LAPWOOD, 1978).

O patógeno invade primeiramente as lenticelas na superfície do tubérculo ou qualquer outra abertura por ferimento. Após a penetração, os patógenos colonizam inicialmente os espaços intercelulares e logo após os intracelulares (ADAMS; LAPWOOD, 1978). A bactéria cresce entre as camadas da periderme, nutrindo-se do tecido morto (AGRIOS, 1997) e produz fitotoxinas, como taxtominas, que induzem a produção de suberina nas células adjacentes e levam à formação de uma camada corticosa ao redor do tecido infectado, que ao se intensificar empurra a periderme infectada para o exterior tornando a superfície áspera e suberificada (sintoma de sarna) (BABCOCK; ECKWALL; SCHOTTEL, 1993). Este ciclo ocorre muitas vezes durante o crescimento do tubérculo, aumentando o tamanho da lesão. Assim quanto mais cedo o tubérculo for infectado, maior será a extensão da lesão (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008) (Figura 2).

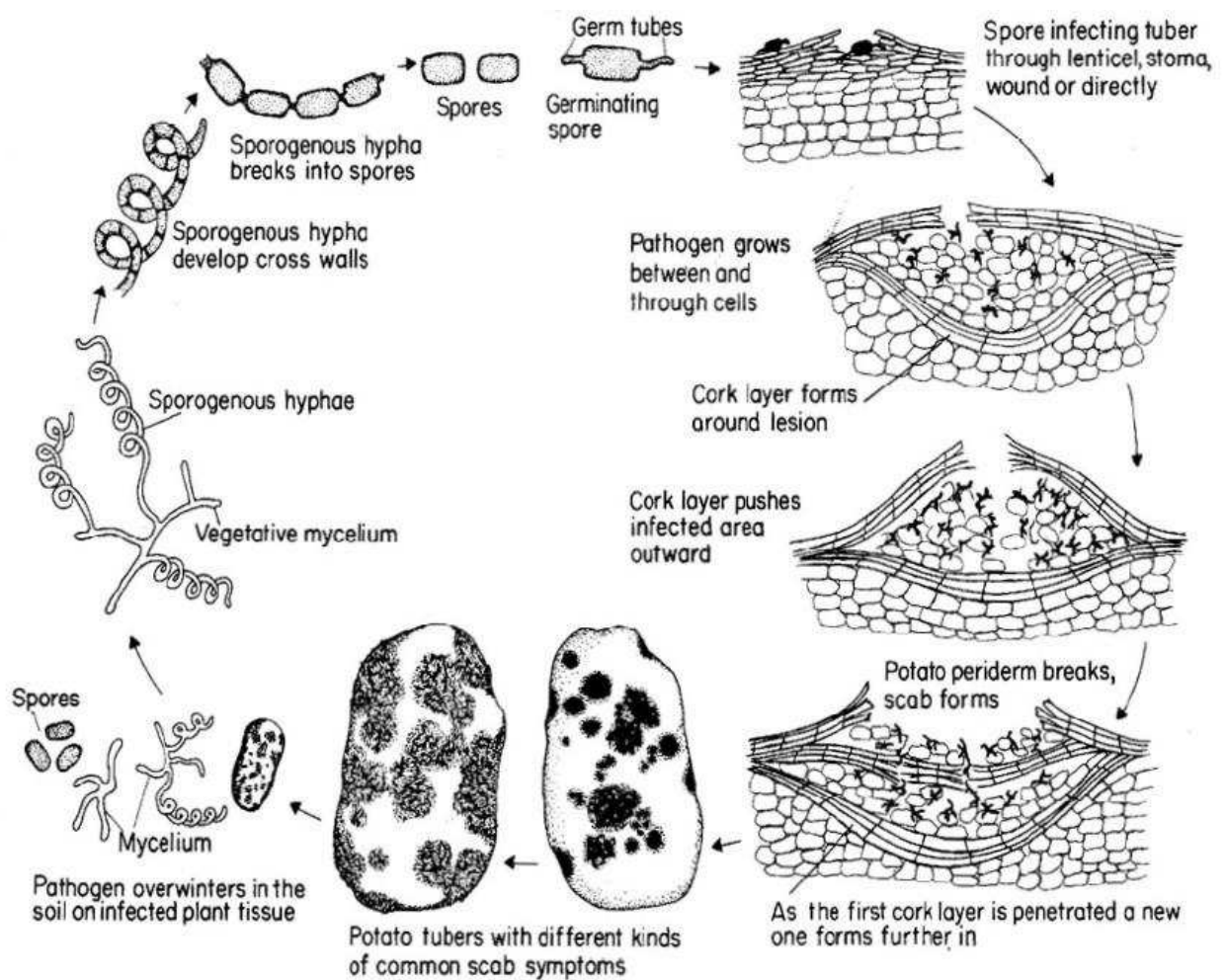


Figura 2. Ciclo da sarna da batata (Agrios, 1997).

Frequentemente são observados escapes para o desenvolvimento da doença mesmo na presença de fatores como: batata-semente sem a certificação do MAPA, cultivar plantada muito suscetível ou plantio em solos com alta população do patógeno (LOPES, 2011).

Em longas distâncias essa doença é disseminada através de batata-semente e em curtas distâncias é disseminada por solo aderido a implementos agrícolas, pela água, pelo vento e pelo esterco de gado alimentado com batata contaminada, já que o patógeno passa incólume pelo trato intestinal de ruminantes (POWELSON et al., 1993).

Depois de introduzida em uma área, dificilmente a bactéria é eliminada do solo, podendo sobreviver em restos não decompostos de plantas de batata, em soqueira ou na matéria orgânica de solos, principalmente os que foram adubados com esterco (LOPES, 2011).

O pH mais adequado para a sobrevivência de *S. scabiei* está entre 5,0 e 7,5, enquanto que a *S. acidiscabiei* sobrevive bem em pH de até 4,5. Esta espécie causa sintomas mais severos em pH de 5,0 a 5,5. Segundo, HOOKER (1981), a amplitude de temperatura em que a doença ocorre situa-se entre 5 e 40°C, sendo o ótimo de 25 a 30°C (LOPES, 2011).

Um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da sarna comum é o teor de água no solo. Especula-se que em solos úmidos, bactérias não patogênicas colonizam as lenticelas primeiro que linhagens de *Streptomyces* fitopatogênicas. Quando o solo se apresenta mais seco, as bactérias não patogênicas não tem capacidade de alcançar as lenticelas, enquanto que a *Streptomyces scabiei*, que é uma bactéria filamentososa, leva vantagem no processo de movimentação e colonização dos sítios de infecção (BRUEHL, 1987).

2.3. Controle da sarna da batata

Não existe controle da sarna da batata e sim estratégias que visam reduzir a incidência e severidade da doença, essas devem ser utilizadas em conjunto, já que isoladamente não promovem a redução da doença. Dentre elas podemos citar: utilização de batata semente certificada, tratamento químico, rotação de cultura, acidificação do solo, matéria orgânica, irrigação do solo e controle biológico (ZAMBOLIM et al., 2011).

2.3.1. Batata semente certificada

A utilização de batata-semente certificada é uma das estratégias mais importantes, pois afeta diretamente a população inicial do patógeno responsável pelo início da epidemia. A certificação garante que a batata-semente foi inspecionada e encontra-se dentro dos padrões aceitáveis de doenças estipulado pelas normas de certificação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LOPES, 2011).

2.3.2. Tratamento químico

Resultados diversos têm sido verificados na literatura com relação à eficácia do tratamento químico de tubérculos-semente. Fungicidas como Fluazinam, Flusulfamida, Fenipiclonil e Mancozeb proporcionaram controle razoável da sarna em experimentos desenvolvidos na Austrália (WILSON et al., 1999).

Em estudos desenvolvidos em 2003 por Fischer e colaboradores (publicado em 2005), foram avaliados 15 fungicidas (captam, carbendazim, chlorothalonil, fluazinam, iprodione, kazugamycina, mancozeb, oxicloreto de cobre, pencycuron, procimidone, quintozene, tebuconazole, thiram+vitavax e tiofanato metílico), ácido bórico e sulfato de amônia quanto à inibição do crescimento *in vitro* (utilizando meio de cultura Ágar- água) de três linhagens de *S. scabiei*, agentes causais da sarna comum em tubérculos provenientes das cidades de Piedade, São Miguel Arcanjo e Casa Branca, no Estado de São Paulo. Com os resultados obtidos *in vitro* a 1 e 10 ppm de ingredientes ativo (i.a.), foram escolhidos os produtos fluazinam, chlorothalonil e oxicloreto de cobre para serem testados em experimentos *in vivo*, em sacos plásticos contendo 5 kg de solo infestado com *S. scabiei*. Os fungicidas pouco diferiram entre si, apresentando uma baixa eficiência no controle da sarna comum, embora o fluazinam tenha apresentado menor índice de doença nesse experimento. Conclui-se que os fungicidas aplicados no solo e na dosagem maior propiciam uma leve redução na intensidade de sarna comum (FISCHER et al., 2005).

2.3.3. Rotação de culturas

Segundo OHMS; FENWICK (1961), POWELSON e colaboradores (1993), citado por LOPES (2011), a rotação de cultura é uma das principais práticas de controle para reduzir a população de patógenos habitantes do solo, como *Streptomyces* sp. Para o controle da sarna, o que é também válido para várias outras doenças da batata, é sugerida uma rotação por 3 - 4 anos com culturas não suscetíveis como gramíneas (arroz e trigo). A incorporação destas gramíneas como adubo verde também é relatada como eficiente no controle dessa doença, enquanto que, no caso de algumas leguminosas, a incorporação pode resultar no aumento da intensidade da doença. Algumas culturas, como beterraba, rabanete, cenoura, nabo, repolho, salsa, batata-doce, berinjela e cebola são consideradas hospedeiras e não devem ser utilizadas (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

É importante considerar que resíduos de plantas não decompostas e esterco animal aplicado por ocasião do plantio, em contato com tubérculos, favorecem o desenvolvimento da doença.

2.3.4. Acidificação do solo

Um das técnicas mais clássicas para controlar a sarna comum é o monitoramento do pH do solo. Em solos com pH abaixo de 5,5 a doença é eficientemente controlada quando o patógeno associado for *S. scabiei*. Se a espécie dominante for *S. acidiscabiei*, pode se desenvolver bem em pH entre 5,0 e 5,5 (POWELSON et al., 1993). Ainda, essa prática pode levar à redução da produção da batata, uma vez que os nutrientes do solo são melhores disponibilizados em pH maiores, próximos de 6,5 e também limita as espécies vegetais que podem ser empregadas na rotação de culturas (LAMBERT; LORIA, 1989b).

2.3.5. Adubação do solo

O uso da adubação verde para o controle da doença apresenta resultados contraditórios, embora na maioria das vezes, reduza a população de uma ou mais espécies de *Streptomyces*. Estas contradições provavelmente são explicadas pelo grau de decomposição do material por ocasião do plantio, já que a população do patógeno decresce

rapidamente à medida que o material incorporado vai se decompondo no solo (OHMS; FENWICK, 1961).

A adubação do solo com superfosfato triplo reduziu significativamente a doença em testes realizados por Davis e colaboradores em 1976, entretanto, essa técnica não tem sido aplicada na prática, por apresentar resultados divergentes em diferentes condições edafo-climáticas. Havendo incidência da sarna em solos alcalinos, após adequada análise de solo a calagem do mesmo deve ser feita cuidadosamente, de modo a não exceder o limite de pH. Em áreas sujeitas a ataques da sarna, pode-se conseguir a ligeira acidificação do solo pela adubação nitrogenada com sulfato de amônia (DAVIS et al., 1976).

Experimentos realizados por Fischer e colaboradores (2005) mostraram que a adubação com sulfato de amônia e gesso em solos infestados com *S. scabiei* propiciou menor severidade de sarna comum. Resultados intermediários de controle mostraram que o gesso incorporado ao solo foi inferior a sulfato de amônia e superior aos testes utilizando fungicidas.

2.3.6. Manejo de irrigação

Uma técnica considerada de alta eficácia no controle da sarna é o manejo adequado da irrigação. A manutenção da capacidade de campo em 80-90% durante o início da formação dos tubérculos até quatro semanas, período em que as lenticelas estão mais propensas à entrada da bactéria, reduzem drasticamente a atividade do patógeno e conseqüentemente, a severidade da doença (BRUEHL, 1987). O excesso de água, no entanto, poderá favorecer o ataque de outros patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* (podridão de esclerotínia), *Ralstonia solanacearum* (murcha bacteriana), *Pectobacterium* spp. (podridão mole), *Sclerotium rolfsii* (murcha de esclerócio) e *Phytophthora infestans* (requeima) (LOPES, 2011).

2.3.7. Legislação

Para a redução das perdas com doenças são necessárias diversas medidas, desde o emprego de técnicas e insumos no cultivo até a proteção fitossanitária na comercialização, transporte e armazenagem, principalmente de batata semente destinada ao plantio (CORRÊA, 2011).

A instrução normativa nº 12, de 10 de junho de 2005, elaborada pelo MAPA, estabeleceu limites de tolerância para pragas não quarentenárias regulamentadas, como *Streptomyces* sp., danos e misturas da batata semente a ser produzida, importada e comercializada no país. Embora essa instrução normativa tenha estabelecido limites de tolerância para *Streptomyces* sp., ela permite a entrada de tubérculos com uma certa porcentagem da superfície atacada pela bactéria. O nível de tolerância foi estabelecido de acordo com a porcentagem da superfície do tubérculo acometida pelos sintomas de sarna, que podem ser causados por diferentes espécies de *Streptomyces*. Por exemplo, tubérculos certificados com índice abaixo de 1/8 da superfície atacada têm níveis de tolerância de 20% (MAPA, 2005).

Cabe ressaltar que, em nenhum momento do diagnóstico, é realizada a identificação do agente causal, fato esse que pode levar à introdução de bactérias que não estavam, até então, presentes no país (CORRÊA, 2011).

2.4. Controle biológico

Controle biológico é uma forma natural e específica para controle de patógenos e pode melhorar a produtividade da cultura, promovendo o crescimento de micro-organismos favoráveis a agricultura. Baseia-se na redução do inóculo ou da atividade patogênica, devido à presença natural de um ou mais organismos (TARIQ, YASMIN e HAFEEZ, 2010).

O controle pode ser de natureza direta ou indireta (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007; LEELASUPHAKUL et al., 2008). O antagonismo direto, exercido contra os fitopatógenos, pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, entre eles:

- **parasitismo:** é uma simbiose onde dois organismos filogeneticamente independentes coexistem ao longo do tempo. Nesse tipo de associação, um organismo (fisicamente menor) chamado parasita se beneficia de outro chamado hospedeiro. As atividades de um parasita em relação a agentes patogênicos de plantas podem resultar em biocontrole (PAL; GARDENER, 2006).
- **competição:** ocorre quando dois (ou mais) organismos possuem a mesma necessidade de sobrevivência. Assim, os micro-organismos podem competir por nutrientes: um organismo capta a maior parte dos nutrientes para se desenvolver, enquanto o outro, sem nutriente suficiente para sobreviver, morre. Também é possível ocorrer competição por oxigênio, espaço e no caso de autotróficos, luz. Um ponto essencial da definição é a privação de um dos organismos envolvidos (CAMPBELL, 1989).

- **amensalismo ou antibiose:** associação onde a produção de metabólitos por um dos organismos participantes (enzimas, voláteis ou outras substâncias tóxicas) é prejudicial ao crescimento ou atividades metabólicas de outro organismo (CAMPBELL, 1989).

Pesquisadores relataram na década de 80, que algumas linhagens de rizobactérias eram capazes de ativar de alguma forma o sistema de defesa das plantas hospedeiras (ZEHNDER et al., 2001). Portanto, o antagonismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida – RSI.

Existem dois mecanismos de resistência induzida em plantas: resistência sistêmica adquirida mediada por ácido salicílico - AS, e resistência sistêmica induzida, mediada pelo ácido jasmônico e etileno - AJ / Et (HARMAN, 2008). Podem ser ativados a por agentes de biocontrole e/ ou substâncias sintetizadas pelos mesmos, desempenhando ampla ação contra os patógenos (PIETERSE e VAN LOON, 2004; ROMEIRO, et al., 2005). Assim, moléculas sintetizadas por *B. subtilis* podem atuar como eliciadoras de RSI, proporcionando a resposta de defesa contra os patógenos (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007). Em estudos realizados por Ongena e colaboradores (2007) mostraram a síntese de lipopeptídeos da família das surfactinas e fengicinas, pelo isolado 168 de *B. subtilis*, atuando no processo de ativação da RSI em plantas de feijão e tomate. Abrindo assim, possibilidades para a investigação de novas moléculas, ou de um complexo, que estejam envolvidos na expressão de genes de defesa em plantas.

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs) exercem proteção, manifestando a redução dos sintomas da doença e também, a inibição do crescimento do patógeno no hospedeiro, quando ambos se encontram separados espacialmente, denominando esse fenômeno de resistência sistêmica induzida - RSI (VAN LOON et al., 1998). Como comprovam estudos realizados por Wei e colaboradores (1991), onde testaram 94 isolados de RPCPs em pepino para o controle de *Colletotrichum orbicular*, agente causador da antracnose, desses isolados, seis apresentaram a capacidade de reduzir o diâmetro das lesões e seu número nas folhas.

2.5. Vantagens e desvantagens do controle biológico

A utilização dos organismos antagonistas exige cuidados especiais para o manejo adequado e ainda é limitada a consciência dos consumidores sobre os problemas de saúde pública e ambiental causados pelo uso intensivo de agrotóxicos em relação às vantagens do uso de agentes de controle biológico (BETTIOL, 2009).

Segundo Sharma e colaboradores (2013), o controle biológico é mais barato que o controle químico, mais fácil para manusear e aplicar na plantação, dando a proteção para a colheita durante todo o período de safra. Segundo os autores, o uso de agentes de biocontrole é mais segura e inofensiva a seres humanos e animais se tornando ambientalmente mais interessante. Os agentes de controle biológico não só controlam doenças de plantas, como também melhoram o desenvolvimento do sistema radicular e, por consequência, o crescimento das plantas e a produtividade da cultura. Outra grande vantagem é de não causarem toxicidade nas plantas e, ainda, a possibilidade de serem combinados como biofertilizantes.

No Brasil, a disponibilidade de produtos comerciais e de princípios ativos contendo agentes de controle biológico é limitada, apenas uma parte desses produtos é devidamente registrada (BETTIOL, 2009).

O controle biológico de doenças de plantas vem se destacando nos últimos anos devido ao aumento das preocupações com o uso excessivo de agrotóxicos e o desenvolvimento de resistência de patógenos a esses produtos (LASLO et al., 2012).

Embora os testes para encontrar agentes de controle biológico apropriados possam levar vários anos para serem concluídos e tenha um custo elevado, os testes com agrotóxicos muitas vezes demoram o mesmo tempo e também são onerosos. Por outro lado, depois de formulados, os bioprodutos são comercializados a valores menores em relação aos produtos químicos disponíveis no mercado (DAFWA, 2014).

2.6. Controle biológico da sarna da batata

O controle biológico por micro-organismo representa uma alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos. A diversidade de micro-organismos, bem como suas relações antagônicas, surgem como ferramentas importantes para o controle biológico aplicado.

Com relação ao controle biológico da sarna da batata, pesquisas envolvendo seu controle por meio de agentes antagônicos (ex. *Streptomyces melanosporofaciens*, *S. diastatochromogenes*, *S. albidoflavus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp.) têm sido relatadas, embora sem resultados conclusivos (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

Zadeh e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antagonista de duas linhagens de *Streptomyces* (*S. olivaceus* e *S. plicatus*) contra as espécies *S. scabiei* e *S. acidiscabies* e verificaram que os antagonistas apresentaram atividade antibacteriana para ambos os

patógenos em experimentos em casa de vegetação. Ryan e colaboradores (2004) realizaram um estudo envolvendo a atividade antagonista de cinco isolados contra diferentes isolados de *Streptomyces* no controle da sarna em cinco cultivares diferentes de batata e verificaram que o sucesso do biocontrole variou significativamente entre isolados do patógeno, dos antagonistas testados e variedades de batata envolvidas, indicando a dificuldade de controle dessa doença. Lee e colaboradores (2004) avaliaram agentes de biocontrole de *S. scabiei* em testes *in vitro* e *in vivo* e verificaram altos valores de atividade antagonista, com 55 a 60% de controle da sarna. A combinação de *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 e quitosana também revelou resultados promissores no controle da sarna da batata (BEAUSÉJOUR; CLERMONT; BEAULIEU, 2003; PRÉVOST et al., 2006).

Estudos realizados por Hiltunen e Valkonem (2011), mostraram que linhagens de *Streptomyces* sp., não patogênicas apresentaram potencial antagônico para o controle da sarna. Os autores utilizaram as linhagens 346 e K61, as quais mostraram potencial para o controle biológico de *S. scabiei* e *S. turgidiscabies*, inibindo o crescimento dessas linhagens *in vitro*. Ambas as linhagens suprimiram o desenvolvimento de *S. turgidiscabies* em casa de vegetação e foi demonstrado, ainda, que a linhagem 346 reduziu a incidência de *S. turgidiscabies* em campo.

Além do uso de *Streptomyces* não patogênicas no controle da sarna da batata, outros gêneros de bactérias antagonistas deveriam ser estudados, pois possuem grande potencial como agentes de biocontrole (CAMPOS SILVA et al., 2008). Em especial, o gênero *Bacillus* se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, possibilitando assim, sua manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas do fitopatógenos (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

2.7. *Bacillus subtilis* no controle biológico de doenças de plantas

Populações de *B. subtilis* tem como habitat natural o solo, o mesmo que abriga uma complexa comunidade biológica, a qual micro-organismos procaríotos e eucariotos constituem na maioria, tanto em número quanto em diversidade. (ONGENA et al., 2005; CAMPOS SILVA et al., 2008).

Nesse sentido, *Bacillus subtilis* é considerado uma das espécies biocontroladoras mais eficazes por apresentar atividade biológica contra uma série de micro-organismos causadores de doenças de plantas, o que pode ser atribuído em grande parte, à produção

de lipopeptídeos ativos (ASAKA e SHODA, 1996; KILIAN *et al.*, 2000; KONDOH *et al.*, 2001; BERNAL *et al.*, 2002; BAIS *et al.*, 2004; GARDENER, 2004), bem como a habilidade de colonizar a planta.

O endósporo é extremamente resistente a agressões externas, podendo permanecer intacto por milhões de anos (CANO *et al.*, 1995) (Figura 3). Isso o torna muito importante para a sobrevivência das populações de *B. subtilis* (STRAGIER e LOSICK, 1996; HENRIQUES *et al.*, 2000), principalmente quando são expostos a condições ambientais desfavoráveis (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

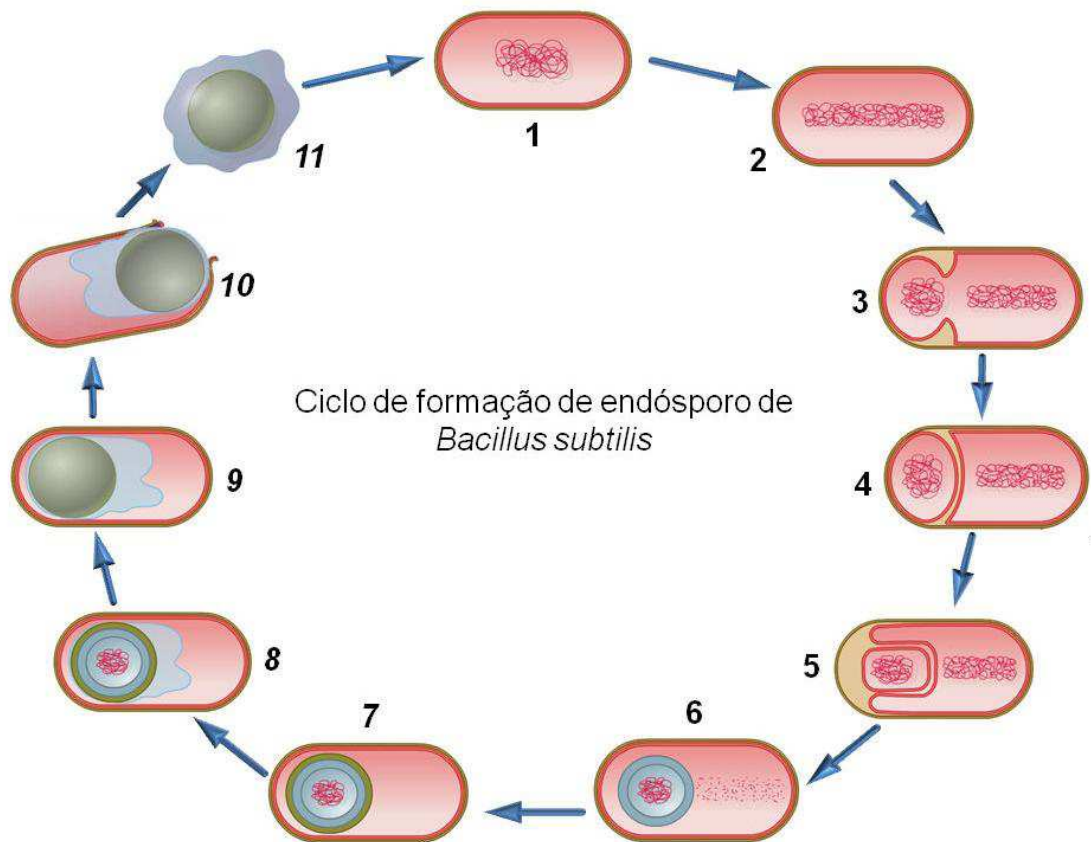


Figura 3. Representação esquemática da formação de endósporo em uma célula da bactéria *B. subtilis* quando as condições nutricionais são limitantes. 1) Célula em condições normais; 2) Condensação e alinhamento do DNA no centro da célula; 3) Invaginação celular e início da divisão do DNA em dois componentes; 4) Separação do DNA em dois componentes e formação do pré-endósporo; 5) Crescimento da porção maior da célula que engloba o pré-endósporo; 6) Envolvimento do pré-endósporo por duas camadas de membrana e degradação do DNA; 7) Formação externa de um revestimento proteico e maturação do endósporo; 8) Formação de uma camada adicional denominada de exosporica; 9) Endósporo maduro, resistente as condições ambientais; 10) Destruição da célula bacteriana por enzimas líticas e liberação do endósporo e 11) Endósporo maduro (Fonte: LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Linhas pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem a capacidade de produzir esporos, (PIGGOT e HILBERT, 2004), isso significa que esses micro-organismos possuem

uma forma de dormência extremamente resistentes, sendo capazes de suportar altas temperaturas, pH desfavorável, falta de nutrientes ou água (CAWOY et al., 2011).

Dentre as espécies do gênero, *B. subtilis* se destaca como agente de biocontrole. Além da capacidade de formação de esporos, possuem algumas características que permitem sua sobrevivência na rizosfera, aumentando sua eficácia como biopesticida (LOSICK e KOLTER, 2008; ROSAS-GARCIA, 2009).

Bacillus subtilis possui em média de 4-5% do seu genoma responsável pela síntese de antibióticos, e tem o potencial para produzir diversos compostos antimicrobianos (STEIN, 2005). Esses compostos apresentam propriedades antibacterianas contra bactérias gram-positivas, entretanto, o envolvimento desses compostos na atividade de biocontrole associadas a plantas não foi demonstrado até o momento (CAWOY et al., 2011). Moléculas simples, tais como dipeptídeo bacilysin (L-Ala ligado ao aminoácido L-anticapsin não proteinogênicos), também exercem forte efeito bactericida e aparentemente estão envolvidas no controle de alguns patógenos de plantas (CHEN et al., 2009).

Segundo dados de literatura, biopesticidas produzidos por *Bacillus* sp., possuem pontos fracos como, oferecer proteção parcial contra patógenos e ataques de pragas e apresentar efeito inconsistente, por ser um organismo vivo a base do ingrediente, sua eficácia depende muito das condições de aplicações em comparação aos pesticidas convencionais. Em contrapartida, possuem pontos fortes como, por exemplo, a ocorrência de interações benéficas entre o micro-organismo, a planta hospedeira, ambiente biótico e abiótico e antagonista contra o patógeno (BUTT et al, 1999; FUENTES-RAMIREZ e CABALLERO-MELLADO, 2006).

Segundo Cawoy e colaboradores (2011), biopesticidas microbianos possuem grande potencial para o futuro da agricultura sustentável. Muito trabalho já foi realizado e muito ainda será conquistado por pesquisadores e indústrias, para melhorar a confiabilidade e eficácia desses produtos para manter o mercado sempre crescente.

Espécies de *B. subtilis*, além de aparecerem como excelentes agentes de biocontrole aparecem também como PGPR - rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (GUPTA et al., 2000; ONGENA et al., 2005).

2.8. Promoção de crescimento em plantas por *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis tem sido considerado um excelente agente de biocontrole possuindo potencial para reduzir diretamente a incidência de doenças, usado comercialmente contra enfermidades de plantas (NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006), e também têm

apresentado outros efeitos positivos sobre as culturas, como a promoção de crescimento de plantas e nutrição (biofertilizantes e fitoestimuladores) e/ ou facilitação a interação entre a planta hospedeira e outros organismos benéficos (ANTOUN e PREVOST, 2006).

A promoção de crescimento ocasionada por *B. subtilis* resulta da consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilizando nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria nas condições do solo (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Além disso, há benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra micro-organismos maléficos (MAJULA e PODILE, 2005).

Estudos realizados por Tsavkelova e colaboradores (2006) e Persello-Cartieaux e colaboradores (2003), mostraram que isolados de *B. subtilis* possuem a capacidade de conduzir a regulação hormonal de plantas, controlando assim, o crescimento radicular pela síntese de auxina, giberelina e citocinina.

Adicionalmente, a associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular às condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes (MANJULA e PODILE, 2005).

Alguns micro-organismos são capazes de produzir e excretar uma variedade de compostos semelhantes a hormônios de plantas, incluindo auxina, giberelinas, citocininas etc. Alguns desses agentes produzem enzimas que degradam o precursor de etileno limitando assim os níveis desse hormônio na planta, aumentando, dessa forma, o crescimento da mesma, especialmente sob condições de estresse (FRANCIS et al., 2010; LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009). Além disso, um micro-organismo que possui uma combinação destas atividades como promoção de crescimento e potencial de biocontrole oferece a vantagem de fornecer a cultura aplicação com um biopesticida e um biofertilizante. Deixando a planta com uma melhor nutrição, muitas vezes aumentando a sua resistência global contra patógenos e outros fatores de estresse (BENT, 2006).

2.9. Síntese de metabólitos

O metabolismo secundário geralmente ocorre na fase de crescimento tardio, causado muitas vezes pela exaustão de um nutriente, ou adição de um indutor e/ ou por uma diminuição na taxa de crescimento, ou por diferentes sinais ambientais produzidos por outros organismos no solo, por exemplo, butirolactonas, produzido pela maioria das espécies de *Streptomyces* e por outros *Actinomycetos* (BIBB, 2005). Assim, resultam na regulação e diferenciação morfológica na produção de metabólitos secundários. A formação

de antibióticos também é regulada por nutrientes (nitrogênio, fósforo e fonte de carbono), metais e na taxa de crescimento (BIBB, 2005).

Bacillus subtilis, por ser uma espécie bacteriana do tipo antagonista, age significativamente por mecanismo de antibiose, ocasionalmente, parasitismo e competição. Micro-organismos que agem pelo mecanismo de antibiose, geralmente possuem amplo espectro de ação, de forma que na inibição de outros micro-organismos, produzem substâncias tóxicas e mais efetivas do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (KUPPER et al., 2003).

Além de *B. subtilis* existem espécies de *Streptomyces* que produzem metabólito secundário, muitos dos quais são antibióticos, havendo assim um interesse em seu ciclo de vida. Essas bactérias são consideradas saprófitas vivendo em solos onipresentes e uma particularidade é que *Streptomyces* são bactérias Gram-positivas, com elevado teor de G+C em seu DNA e possuem uma cadeia linear relativamente grande (~ 8-10 Mb) em seu genoma (SHARON, 2010).

2.10. Diversidade Genética em *Streptomyces scabiei*

Famílias de sequências repetitivas de DNA estão distribuídas pelo genoma de diversas espécies bacterianas. Três famílias têm sido estudadas em maiores detalhes: REP (*Repetitive Extragenic Palindromic sequence*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence*) e BOX (elementos Box) (DE BRUIJN, 1992; LOUWS, et al., 1999).

Sequências repetitivas (rep-PCR) têm sido utilizadas na identificação e diferenciação de diferentes espécies de fitobactérias (RAMUNDO; CLAFLIN, 2005). A identificação de sequências consenso nesses elementos permitiu o desenho de *primers* específicos para as sequências REP e ERIC por Versalovic e colaboradores (1991). Os autores demonstraram que sequências homólogas a REP e ERIC estão presentes em gêneros bastante diversos de bactérias, especialmente em gram-negativas, e que os produtos de REP e ERIC-PCR geram padrões bastante característicos, constituindo um método potencial para *fingerprinting* de genomas bacterianos.

Em 1992, De Bruijn demonstrou a aplicação de perfis de REP e ERIC-PCR no estudo de bactérias isoladas de solo, incluindo os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium* e membros do gênero *Pseudomonas*, confirmando os dados de Versalovic e colaboradores (1991) quanto à aplicação desse método em análises moleculares e taxonômicas de bactérias. De Bruijn (1992) demonstrou que até linhagens de

Rhizobium altamente relacionadas puderam ser diferenciadas com base nesse tipo de análise.

Desse modo, este método vem sendo amplamente aplicado por outros pesquisadores na microbiologia ambiental, incluindo fitobactérias Gram-negativas e Gram-positivas (LOUWS; et al., 1997; RADEMAKER et al., 2000), e actinomicetos associados a plantas (CLARK et al., 1998).

Em bactérias do gênero *Xanthomonas* estas sequências têm sido amplamente utilizadas em estudos de diferenciação e identificação e de relações filogenéticas entre as linhagens (LOUWS et al., 1994; LOUWS et al., 1995; OPGENORTH et al., 1996; POOLER; RITCHIE; HARTUNG, 1996; BOUZAR et al., 1999; RADEMAKER et al., 2000; STOGER et al., 2008).

Com relação a estudos de diversidade genética no gênero *Streptomyces*, os relatos são escassos. Um dos primeiros trabalhos de utilização dessas sequências repetitivas foi realizado por Sadowsky e colaboradores (1996). Os autores investigaram se marcador BOX poderia ser empregado para separar linhagens de *Streptomyces* patogênicas das supressoras da doença e concluíram que essa técnica pode ser empregada na identificação das linhagens, porém não para a diferenciação entre elas, uma vez que no estudo essas duas categorias não puderam ser separadas em grupos distintos.

Estudo envolvendo linhagens de *Streptomyces* associadas à cultura da batata foi realizado por Clark e colaboradores (1998), onde linhagens de *S. ipomoeae*, causando doença em batata doce, foram analisadas por rep-PCR. Nesse estudo, as sequências BOX, ERIC e REP foram empregadas para análise de diversidade de 36 linhagens provenientes de diferentes localizações nos Estados Unidos e Japão e os autores observaram uma alta homogeneidade genômica nessa espécie bacteriana.

Por outro lado, linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata mostraram-se fenotípica e geneticamente muito diversas em estudo envolvendo análises de taxonomia numérica de 80 isolados de *Streptomyces* sp., incluindo 35 associados à sarna em Israel (DOERING-SAAD et al., 1992).

Takeuchi e colaboradores (1996), estudando linhagens de *Streptomyces* sp. associadas à sarna da batata, verificaram uma alta diversidade genética entre as linhagens com relação a sequências do gene 16S RNA ribossomal, concluindo que esse grupo de fitobactérias se mostrou filogeneticamente muito diverso.

Num outro estudo envolvendo experimentos de hibridização DNA-DNA, os autores concluíram que a diversidade genética de linhagens de *S. scabiei* excedeu o nível de diversidade genética esperado para o grau de espécie. Pois algumas linhagens até se mostraram mais relacionadas fenotipicamente com linhagens de *Streptomyces* não patogênicas (HEALY; LAMBERT, 1991).

Wanner (2006) realizou um estudo envolvendo os genes de patogenicidade *txtAB* relacionado à síntese da fitotoxina taxtomina, genes *tomA*, que codifica a enzima tomatinase e *nec1*, que codifica a proteína necrogênica Nec1, descritos por Bukhalid; Chung; Loria, (1998). Nesse estudo ficou demonstrado que as espécies *S. scabiei* e *S. europaeiscabiei*, isoladas de campo de batata em seis locais diferentes nos Estados Unidos, apresentaram esses três genes marcadores, porém o autor verificou diferenças nos perfis populacionais dessas espécies, concluindo que a alta diversidade genética de linhagens de *Streptomyces* pode estar associada as diferenças na incidência e severidade da doença.

Davelos e colaboradores (2004) também demonstraram que há uma grande diversidade genética entre isolados de actinomicetos. Esse estudo empregou a técnica de rep-PCR para demonstrar a variabilidade genética entre espécies de *Streptomyces* coletadas em três locais distintos de pradaria, com quatro diferentes profundidades no Estados Unidos. Os resultados mostraram a ocorrência de linhagens filogeneticamente distintas para cada local e os autores concluíram que a diversidade genética tende a diminuir com o aumento da profundidade do solo e que essa diminuição pode ser atribuída a uma variedade de fatores, incluindo umidade de solo e quantidade de carbono disponível.

Mais recentemente, St-Onge e colaboradores (2008) realizaram um estudo de diversidade genética com 41 linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas de lesões em tubérculos de batata no Canadá. O trabalho envolveu análises de rep-PCR (BOX- e ERIC-PCR); genes de patogenicidade e virulência; e sequenciamento dos genes 16S RNA ribossomal e *rpoB*. Embora a maioria dos isolados tenha se mostrado estreitamente relacionada com a linhagem Tipo de *S. scabiei* e nas análises de sequências dos genes, os autores obtiveram dez grupos genéticos distintos nas análises de rep-PCR.

3. OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram a caracterização da diversidade genética de linhagens de *Streptomyces scabiei* e a avaliação do potencial antagônico de linhagens de *Streptomyces* sp., *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus* sp. no controle da sarna da batata.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterização da diversidade genética de linhagens de *Streptomyces scabiei* isoladas de diferentes regiões produtoras do Brasil por meio da técnica de rep-PCR (BOX, ERIC e REP-PCR);
- b) Avaliação do potencial antagônico de linhagens de *Streptomyces* sp., isoladas de cupinzeiro ou solo, de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus* sp. no controle da sarna da batata por meio de testes *in vitro* empregando-se a técnica de difusão em Ágar, semeadura por estrias, metabolito volátil e pareamento de culturas;
- c) Avaliação de linhagens de *Bacillus subtilis* quanto à capacidade de promoção de crescimento de plantas de batata em testes *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens testadas neste estudo e condições de cultivo

As linhagens de *Streptomyces scabiei* utilizadas neste estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP (Tabela 1). Essas linhagens foram utilizadas nos experimentos de rep-PCR para análise de diversidade genética e três delas, IBSBF 2049^T (linhagem Tipo), IBSBF 2298 (isolada em São Gotardo/MG) e IBSBF 2318 (isolada em Mucugê/ BA) foram empregadas nos experimentos de avaliação do potencial antagônico *in vitro*. Essas linhagens foram selecionadas pelo alto grau de severidade da doença observado em estudo anterior (CORRÊA, 2011).

Nos testes de antagonismo foram avaliadas dez linhagens de *Streptomyces* sp., isoladas de cupinzeiro ou solo, cedidas pela Dra. Fabiana Fantinatti Garbognini, da Divisão de Recursos Microbianos – DRM do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), Campinas-SP (Tabela 2); quatorze (14) linhagens de *Bacillus subtilis* (IBSBF 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 896, 897, 898, 899, 900, 901) e uma linhagem de *Paenibacillus* sp. (IBSBF 2305) cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP. Todas essas linhagens foram testadas contra as três linhagens de *S. scabiei* selecionadas.

As linhagens pertencentes ao gênero *Streptomyces* foram semeadas em meio de cultura YME (extrato de levedo 4 g, extrato de malte 10 g, glucose 4 g, Ágar 20 g, água destilada q.s.p. 1000 mL, pH 7,2), incubadas a 28 °C por aproximadamente sete dias e mantidas no mesmo meio.

As linhagens de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus* sp. foram semeadas em meio de cultivo NA – Nutriente Ágar (peptona 5 g, NaCl 5 g, extrato de carne 3 g, Ágar 18 g e água destilada q.s.p. 1000 mL, pH 7), incubadas a 28 °C por aproximadamente 48 horas e mantidas no mesmo meio.

Tabela 1. Linhagens de *Streptomyces scabiei* analisadas neste estudo.

IBSBF	Procedência	Cultivar
1886	Ibiocara – BA	Monalisa
1936	Itapeva – SP	Monalisa
2049 ^T	Estados Unidos	
2124	Bueno Brandão – MG	Monalisa
2147	Ibicoara – BA	Ágata
2203	Tambaú – SP	Ágata
2204	Tambaú – SP	Monalisa
2228	Ibicoara – BA	Ágata
2239	Ibicoara – BA	Ágata
2242	Ipuiuna – MG	Cupido
2248	Itapetininga – SP	Ágata
2250	Itapetininga – SP	Mondial
2251	Ibicoara – BA	Mondial
2257	Nova Resende – SP	Desconhecida
2282	Quitandinha – PR	Ágata
2292	São Mateus do Sul – PR	Cupido
2293	São Mateus do Sul – PR	Cupido
2294	São Mateus do Sul – PR	Cupido
2298	São Gotardo – MG	Ágata
2308	Mucugê – BA	Ágata
2315	Pinhão – PR	Ágata
2316	Mucugê – BA	Cupido
2317	Mucugê – BA	Cupido
2318	Mucugê – BA	Cupido
2359	Cristalina – GO	<i>Beta vulgaris</i>
2388	Itapetininga – SP	Asterix
2408	Poços de Calda – MG	Ágata
2409	Cristalina – GO	Ágata
2410	Cristalina – GO	Ágata
2411	Cristalina – GO	Ágata
2475	Ibicoara – BA	Ágata
2476	Mucugê – BA	Ágata
2501	Piedade – SP	Monalisa
2502	Bueno Brandão – MG	Ágata
2503	Ibicoara BA	Monalisa
2523	Ibiraiaras – RS	Cupido
2524	Ibiraiaras – RS	Cupido
2528	Indaiatuba – SP	Ágata
2529	Indaiatuba – SP	Ágata
2809	São Francisco de Paula – RS	Asterix
2811	São Francisco de Paula – RS	Asterix
2860	Irineópolis – SC	Ágata
2950	Canoinhas – SC	Asterix
2954	Canoinhas – SC	Asterix

IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil); T = linhagem Tipo.

Tabela 2. Linhagens de *Streptomyces* sp., isoladas de cupinzeiro ou solo.

Código*	Procedência	Solo/Hospedeiro
53	Caatinga	Solo
CDPA 10	Chapada Diamantina, Poço Azul, BA	Solo
LC 03	Lafaiete Coutinho, BA	<i>Cornitermes</i> sp. (cupinzeiro)
LC 16	Lafaiete Coutinho, BA	<i>Cornitermes</i> sp.
LC 32	Lafaiete Coutinho, BA	<i>Cornitermes</i> sp.
LC 40	Lafaiete Coutinho, BA	<i>Cornitermes</i> sp.
MC 25	Morro do Chapéu, BA	<i>Constrictotermes</i> sp. (cupinzeiro)
PA 03	Caatinga	Solo
PA 10	Caatinga	Solo
PA 27	Caatinga	Solo

* Linhagens isoladas por Getúlio Freitas Bonfim, aluno de Mestrado da Universidade Estadual de Feira de Santana, BA.

4.2. Caracterização Molecular

4.2.1. Extração de DNA cromossômico

As culturas de *Streptomyces scabiei* foram submetidas à extração de DNA segundo a metodologia descrita por Pitcher, Saunders e Owen (1989) com algumas modificações.

A pureza e quantificação dos DNAs das amostras foram realizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação Alpha Innotech 2200.

4.2.2. Análise da diversidade genética dos isolados de *Streptomyces scabiei* por rep-PCR

Foram utilizados cerca de 100 ng de DNA de cada amostra em reações de 25 µL e os *primers* utilizados foram: REP1R I (5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3') e REP2 I (5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3'); ERIC 1R (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3') e ERIC2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'); e BOX A1R (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3') (LOUWS et al., 1997).

Os protocolos de amplificação para os diferentes *primers* foram:

REP-PCR: 2,5 U de enzima *Taq* polimerase Fermentas, 1X tampão de reação da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 mM de cada *primer*, 3,0 mM MgCl₂, por reação. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95° C/ 6 min.; seguido de 30 ciclos a 94° C/ 1 min.; 40° C/ 1 min. e 65° C/ 8 min; e um ciclo de extensão final a 65° C/ 16 min.

ERIC-PCR: 2,5 U de enzima *Taq* polimerase Fermentas, 1X tampão de reação da enzima, 0,3 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada *primer*, 3,0 mM MgCl₂, por reação. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95° C/ 7 min.; seguido de 30 ciclos a 94° C/ 1 min.; 52° C/ 1,3 min. e 65° C/ 8 min; e um ciclo de extensão final a 65° C/ 16 min.

BOX-PCR: 2,0 U de enzima *Taq* polimerase Fermentas, 1X tampão de reação da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM do *primer*, 1,5 mM MgCl₂, por reação. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95° C/ 7 min.; seguido de 30 ciclos a 94° C/ 1 min.; 53° C/ 1 min. e 56° C/ 8 min; e um ciclo de extensão final a 65° C/ 16 min.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão TAE 1X. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,1 mg/mL), visualizados em fonte de luz U.V. e fotografados.

4.2.3. Análise dos padrões de *fingerprinting*

Os perfis obtidos por rep-PCR foram analisados através do sistema binário (bandas presentes, 1 ou ausentes, 0 para cada linhagem). Os fragmentos abaixo de 100 pb não foram considerados nas análises. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o programa de similaridade para dados qualitativos (SIMQUAL), com o coeficiente de Dice. Os

dendrogramas foram construídos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do programa NTSYS-PC (ROHLF, 1992).

4.3. Avaliação do potencial antagonico *in vitro*

4.3.1. Teste de difusão em Ágar

Os testes de difusão em Ágar foram realizados de acordo com Romeiro (2001). As linhagens de *S. scabiei* foram semeadas em placa de Petri contendo meio de cultura YME. As placas foram armazenadas em estufa a 28° C durante sete dias.

Foram realizadas suspensões bacterianas na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ em água destilada esterilizada, ajustadas de acordo com a escala de Mc Farland. Cerca de 100 µL dessas suspensões foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Ágar - DIFCO) com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As linhagens de *Bacillus subtilis* foram semeadas em meio de cultura NA e incubadas a 28° C por três dias. Posteriormente, uma massa de células bacterianas foi recuperada com o auxílio de uma alça descartável (10 µL) e inoculada em tubos cônicos de plástico tipo Falcon (15 mL) contendo 5 mL de meio BD (Batata Dextrose Broth). Os tubos foram incubados a 28° C por três dias, sob agitação.

Passado esse período, esses tubos foram centrifugados a 11.000 rpm por cinco minutos. Recuperou-se o sobrenadante em um novo tubo e o mesmo foi mais uma vez centrifugado nas mesmas condições. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para uma seringa descartável de 5 mL e filtrado (0,22 µm). Em seguida foi depositada uma alíquota de 50 µL do filtrado em um orifício de 7 mm de diâmetro localizado no centro da placa de Petri contendo o meio de cultivo.

Nos testes efetuados com as linhagens de *Streptomyces* isoladas de cupinzeiro ou solo, o procedimento foi o mesmo descrito acima, exceto que as linhagens foram cultivadas em meio de cultivo YME a 28° C por sete dias.

Como controle negativo foram depositados 50 µL de água destilada esterilizada.

As leituras dos experimentos foram realizadas medindo-se os halos de inibição (mm), obtendo-se a média para cada linhagem analisada. Esses experimentos foram realizados em triplicata (ROMEIRO, 2001).

4.3.2. Método de semeadura por estrias

Um outro método de análise de potencial antagônico testado foi o de semeadura por estrias (ROMEIRO, 20010. Nesse experimento, foram preparadas placas de Petri de vidro contendo uma camada delgada de meio de cultivo NA para o crescimento das linhagens a serem testadas com relação ao potencial de inibição de crescimento de *S. scabiei*. As linhagens antagonistas foram semeadas em riscas paralelas e equidistantes, de comprimento um pouco menor que o diâmetro da placa (aproximadamente 7 cm).

Após incubação a 28° C por 48 h, procedeu à morte das mesmas. Inverteu-se as placas, adicionou-se 2 mL de clorofórmio à superfície interna da tampa de cada placa e fechou-se com o objetivo do vapor eliminar as células antagonistas. Depois de 1 hora, as placas foram abertas em ambiente asséptico durante 30 minutos para a eliminação dos resíduos de clorofórmio. Para garantir a morte das células, as placas foram, posteriormente, expostas à luz ultravioleta por 25 min, com exposição direta.

Passado esse período, adicionou-se 5 mL de meio de cultivo YME semi-sólido fundente sobre a superfície das placas que continham as colônias previamente inativadas com clorofórmio. Após solidificação do meio de cultura, as linhagens de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T, 2298 e 2318) foram semeadas por meio de estrias paralelas e equidistantes entre si, mas em ângulo reto com as estrias anteriormente efetuadas na camada de baixo. As placas foram incubadas a 28° C por três dias para posterior visualização de linhas de inibição (ROMEIRO, 2001).

4.3.3. Avaliação de produção de metabólitos voláteis

A atividade antagônica pela produção de compostos voláteis foi avaliada inoculando-se linhagens de *S. scabiei* e as linhagens a serem testadas, duas a duas, em ambiente hermeticamente fechado. Após incubação a 28° C por sete dias (*S. scabiei* ou *Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo) e três dias (*Paenibacillus* sp. ou *B. subtilis*), discos com 7 mm de diâmetro foram retirados dos meios contendo o crescimento bacteriano e colocados no centro da superfície de uma nova placa contendo meio BDA. As tampas foram removidas e as placas contendo discos das linhagens a serem testadas para potencial antagônico foram colocadas na parte inferior, enquanto que as placas com o disco de crescimento de *S. scabiei* foram colocadas na parte superior do sistema. As “duplas” de placas (*S. scabiei* + linhagem antagonista) foram seladas com película tipo “parafilm” (Figura 4). Desse modo, na

parte superior das placas ficaram as linhagens patogênicas (*S. scabiei*) e na parte inferior as possíveis linhagens antagonistas (*Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo; e linhagens de *Bacillus subtilis*). Conjuntos de placas controle foram preparados sem bactérias na placa inferior. As placas de Petri foram incubadas a 28° C por sete dias (CHAURASIA et al., 2005).

A porcentagem (%) de inibição de crescimento do teste foi calculada empregando-se a seguinte fórmula: $(r1 - r2 / r1) \times 100$ onde r1, representa o crescimento radial da *S. scabiei* sem a presença das linhagens antagonistas, e r2 representa o crescimento radial de *S. scabiei* em conjunto, ou seja, na presença de linhagens antagonistas (CHAURASIA et al., 2005). Os experimentos foram realizados em triplicata com as linhagens de *Streptomyces* sp. e em duplicata com *B. subtilis*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).

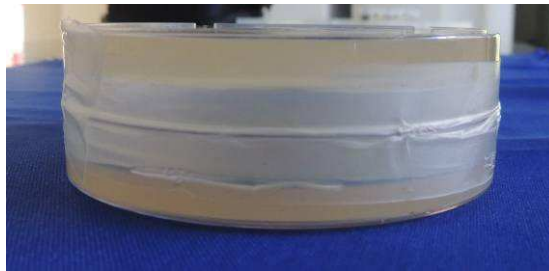


Figura 4. Placas de Petri seladas com película tipo “parafilm” no teste de metabólito volátil.

4.3.4. Teste de pareamento de culturas

O teste de pareamento de culturas foi realizado de acordo com Gomes, Grigoletti Jr., Auer (2001). Após crescimento bacteriano das linhagens de *S. scabiei*, *Streptomyces* sp. (cupinzeiro ou solo) e *B. subtilis* nos respectivos meios de cultivo, discos com 7 mm de diâmetro foram cortados e colocados sobre uma nova superfície de meio de cultivo BDA, sendo que em um dos lados foi adicionado um disco de cultura do patógeno e no outro, um disco de cultura do antagonista, em posições opostas. No teste de *S. scabiei* com linhagens de *B. subtilis*, esses discos foram colocados bem próximos a borda da placa, enquanto que nos testes de linhagens de *S. scabiei* com linhagens de *Streptomyces* sp., esses foram colocados a uma distância de 3 cm da borda da placa, objetivando-se aproximação das mesmas, uma vez que o tempo de crescimento de ambas é mais lento (7-10 dias).

Após a transferência, as placas foram mantidas em estufa a 28° C por sete dias. Como controle negativo foi colocado um disco apenas com meio de cultura BDA nas placas contendo linhagens de *S. scabiei*. Esse teste foi realizado em triplicata.

A avaliação deste teste foi efetuada por meio da medição do diâmetro do crescimento da colônia. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).

4.3.5. Teste de promoção de crescimento *in vivo*

Devido ao fato do presente trabalho ter envolvido diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*, decidiu-se também realizar um teste para se verificar se essas linhagens teriam algum efeito sobre plantas de batata, uma vez que dados de literatura demonstraram que essa espécie bacteriana tem contribuído para a promoção de crescimento de plantas e nutrição (biofertilizantes e fitoestimuladores) e/ ou facilitação da interação entre a planta hospedeira e outros organismos benéficos (ANTOUN e PREVOST, 2006).

Os tubérculos-semente em fase de germinação foram cedidos pela Associação Brasileira da Batata (ABBA). Esses foram desinfetados superficialmente com solução de NaOCl a 0,5% por 15 minutos, sob agitação. Em seguida foram lavados em água destilada por 15 minutos, sob agitação, para a retirada da solução de hipoclorito da superfície dos tubérculos. Após esse procedimento, os minitubérculos foram secos a temperatura ambiente.

Foram preparadas suspensões bacterianas de aproximadamente 10^8 UFC. mL⁻¹ (ajustadas de acordo com a escala de Mc Farland) das linhagens de *Bacillus subtilis*. Em seguida, os tubérculos foram imersos nessas suspensões por aproximadamente cinco minutos e posteriormente plantados em vasos com 15 centímetros de diâmetro preenchidos com substrato Golden Mix Misto (fibra de coco).

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação do Laboratório de Plantas Daninhas, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, SP; e as plantas foram regadas com 100 mL de água por vaso a cada três dias.

Como controles negativos foram utilizados vasos com tubérculos-semente sem adição da suspensão das linhagens de *B. subtilis*.

Após 30 dias do plantio, a parte aérea das plantas foi removida e submetida à secagem em estufa a 65-70 °C, até obtenção de peso constante da massa de matéria seca (MMSPA), em gramas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com um tubérculo-

semente. Os dados obtidos foram submetidos à fórmula $x = x + 1.0$, com análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990) e os resultados foram avaliados segundo a fórmula: valor do peso médio do tratamento - valor do peso médio do controle x 100 / valor do peso médio do controle, para avaliar a porcentagem da promoção de crescimento das plantas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise dos padrões de *fingerprinting*

A diversidade genética de 43 linhagens de *Streptomyces scabiei* foi avaliada por meio da análise comparativa entre os padrões eletroforéticos gerados pela amplificação de seqüências repetitivas do DNA genômico, determinadas pelo emprego dos iniciadores BOX A1R e ERIC R1/ERIC 2.

5.1.1. Análise por BOX-PCR

Os padrões de bandas gerados pela amplificação de seqüências repetitivas do DNA bacteriano com o iniciador BOX A1R encontram-se na Figura 5. O dendrograma de similaridade gerado, considerando-se os fragmentos de 410 a 3000 pb, revelaram a formação de inúmeros grupos, com similaridade de 2 a 100%, observando-se uma alta variabilidade genética entre as linhagens analisadas (Figura 5, 6).

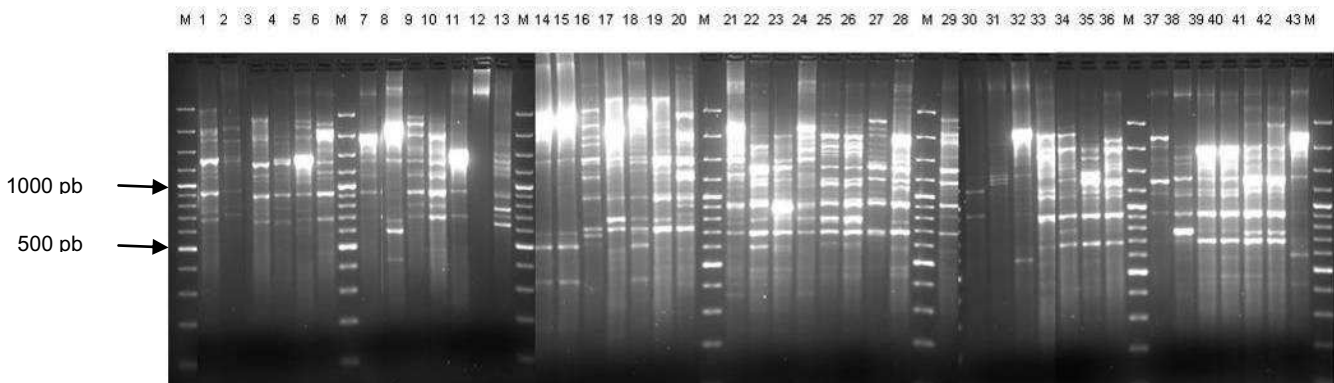


Figura 5. Produtos de amplificação do DNA de linhagens de *S. scabiei* utilizando-se o iniciador BOX A1R. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Linhagens IBSBF (1) 1886, (2) 2049^T, (3) 2124, (4) 2147, (5) 2203, (6) 2204, (7) 2242, (8) 2248, (9) 2250, (10) 2251, (11) 2257, (12) 2282, (13) 1936, (14) 2293, (15) 2294, (16) 2298, (17) 2308, (18) 2315, (19) 2316, (20) 2317, (21) 2359, (22) 2388, (23) 2408, (24) 2409, (25) 2410, (26) 2411, (27) 2475, (28) 2476, (29) 2501, (30) 2502, (31) 2503, (32) 2523, (33) 2524, (34) 2528, (35) 2529, (36) 2809, (37) 2811, (38) 2860, (39) 2950, (40) 2954, (41) 2228, (42) 2239 e (43) 2292.

Após a construção do dendrograma, observou-se que as linhagens IBSBF 2410 e 2411 isoladas do estado de Goiás (GO) apresentaram 100% de similaridade entre si,

similaridade de 100% também ocorreu para as linhagens IBSBF 2950 e 2954, isoladas em Santa Catarina (SC); IBSBF 2228 e 2239, isoladas da Bahia; e IBSBF 2292, 2293 e 2294, isoladas no Paraná (PR).

A linhagem tipo da espécie *S. scabiei* IBSBF 2049^T apresentou similaridade de aproximadamente 50% com a linhagem IBSBF 2503, isolada na Bahia (BA) e aproximadamente 30% com as linhagens restantes. A linhagem IBSBF 2202, isolada no Paraná (PR), se destacou pelo baixo nível de similaridade, com aproximadamente 2% em comparação com as demais.

Nesse experimento não foi possível agrupar as linhagens por região geográfica de isolamento.

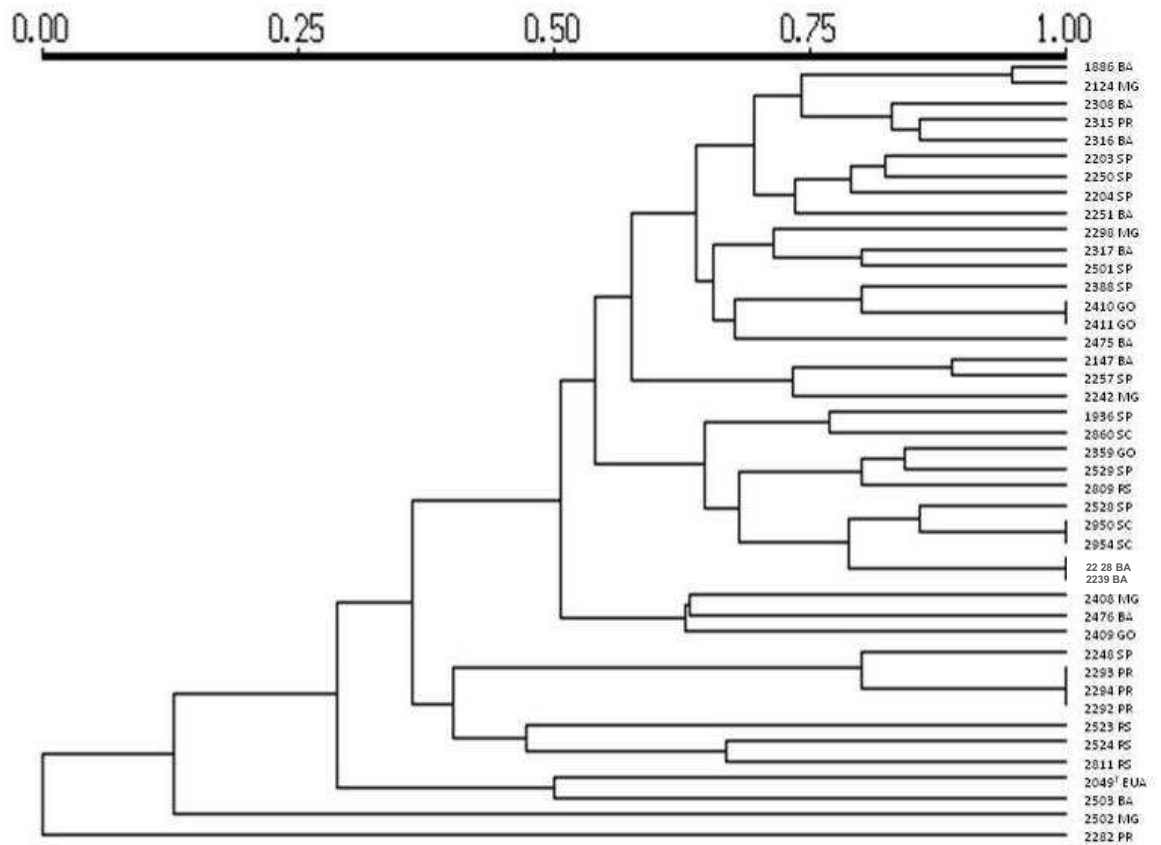


Figura 6. Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação utilizando-se o iniciador BOX A1R.

5.1.2. Análise por ERIC-PCR

Os padrões de bandas gerados pela amplificação de sequências repetitivas do DNA bacteriano com os iniciadores ERIC1R/ERIC2 encontram-se na Figura 7. Nestes experimentos foram considerados fragmentos de 390 a 3000 pb.

Como observado nas amplificações com o iniciador BOX A1R, uma alta diversidade genética foi observada entre as linhagens. O dendrograma de similaridade construído revelou valores de 3 a 100% e, novamente, não foi possível a separação das linhagens por região de isolamento (Figura 8).

Como ilustra o dendrograma, as linhagens IBSBF 2242, 2315 e 2523 apresentaram 100% de similaridade, mas as mesmas são provenientes de estados diferentes Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS), respectivamente. O mesmo ocorreu com as linhagens IBSBF 2282 e 1936, isoladas no Paraná (PR) e São Paulo (SP).

Uma vez que as localidades são bem distantes umas das outras, suspeita-se que pode ter havido troca de material vegetal contaminado entre os produtores, ou obtenção de tubérculo semente infectado pela bactéria.

Nessa análise, a linhagem IBSBF 2502, isolada em Minas Gerais (MG) foi a que se destacou pela baixa similaridade com as demais linhagens com apenas 3%.

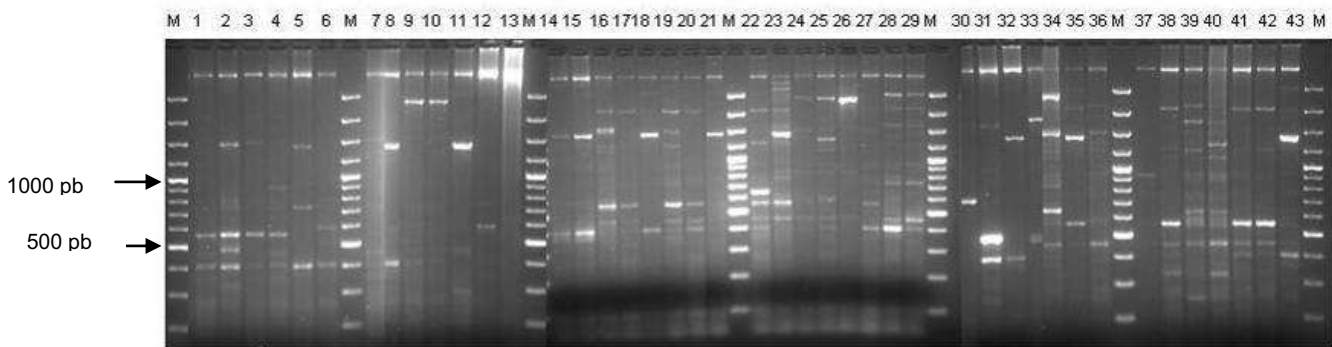


Figura 7. Produtos de amplificação do DNA de linhagens de *S. scabiei* utilizando-se os iniciadores de ERIC1R/ ERIC2 (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Linhagens IBSBF (1) 1886, (2) 2049^T, (3) 2124, (4) 2147, (5) 2203, (6) 2204, (7) 2242, (8) 2248, (9) 2250, (10) 2251, (11) 2257, (12) 2282, (13) 1936, (14) 2293, (15) 2294, (16) 2298, (17) 2308, (18) 2315, (19) 2316, (20) 2317, (21) 2359, (22) 2388, (23) 2408, (24) 2409, (25) 2410, (26) 2411, (27) 2475, (28) 2476, (29) 2501, (30) 2502, (31) 2503, (32) 2523, (33) 2524, (34) 2528, (35) 2529, (36) 2809, (37) 2811, (38) 2860, (39) 2950, (40) 2954, (41) 2228, (42) 2239 e (43) 2292.

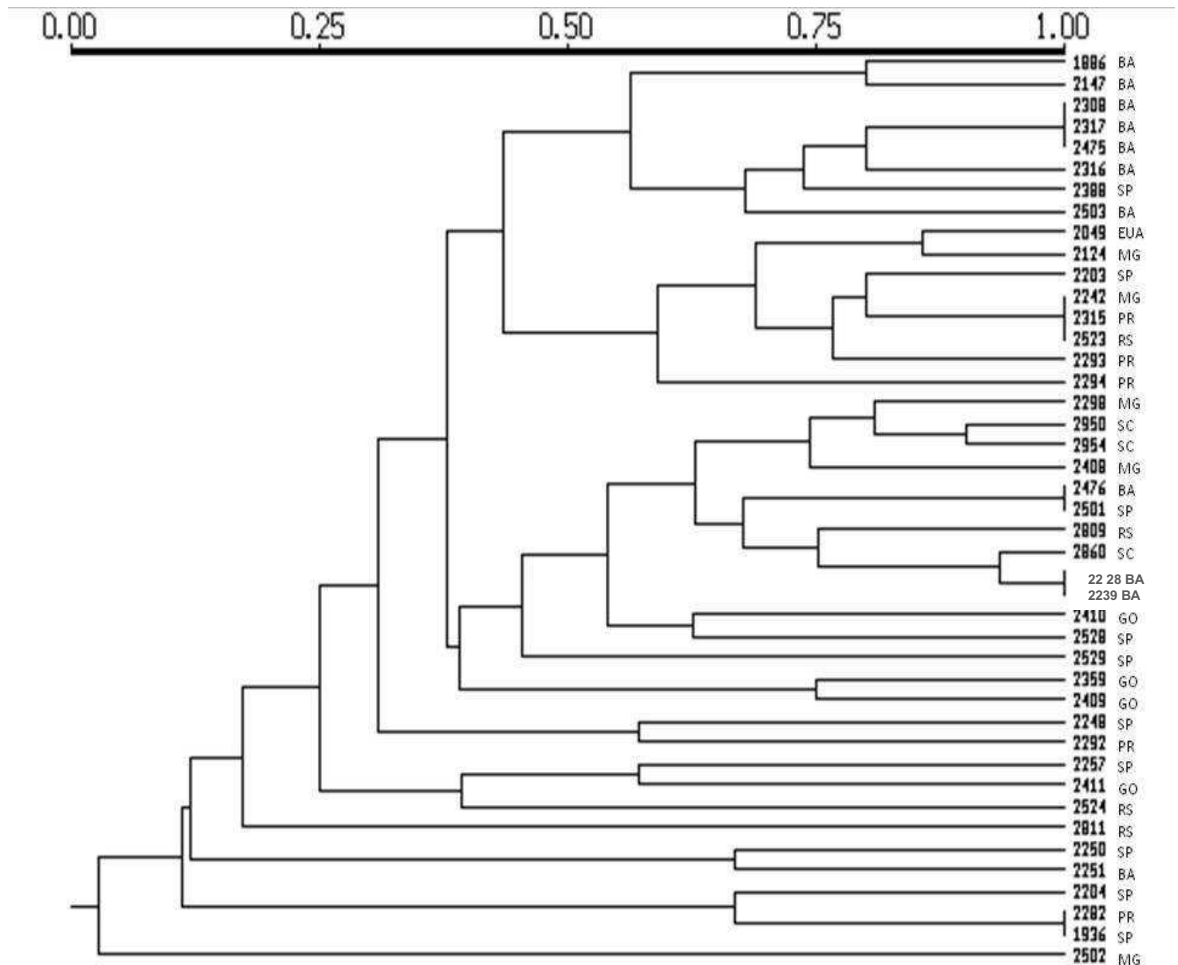


Figura 8. Dendrograma de similaridade gerado de acordo com os perfis de amplificação utilizando-se os iniciadores ERIC1R/ ERIC2.

5.1.3. Análise por REP-PCR

Com relação às análises por REP-PCR, inúmeros testes foram realizados utilizando-se os marcadores REP1R I e REP2 I, porém os perfis obtidos não foram claros o suficiente para serem analisados. Desse modo, optou-se por não incluir esse marcador no presente estudo. Em estudo de diversidade genética de linhagens de *Streptomyces* sp. realizado por St-Onge e colaboradores (2008), somente análises de ERIC- e BOX-PCR foram apresentadas, indicando que, provavelmente, o marcador REP não seja indicado para estudos do gênero *Streptomyces*.

No presente estudo os padrões gerados por BOX- e ERIC-PCR revelaram uma alta variabilidade genética entre as linhagens de *S. scabiei* investigadas, com valores de

similaridade que variaram de 2 a 100%. Nas duas análises as linhagens ficaram distribuídas em diversos ramos, sem possibilidade de agrupamento por região de isolamento.

Em estudos de doença bacteriana em batata doce, Clark e colaboradores (1998) verificaram que linhagens de *S.ipomoeae* isoladas de diferentes localizações nos Estados Unidos e Japão mostraram uma alta homogeneidade genômica nas análises de rep-PCR (BOX-, ERIC- e REP-PCR).

Por outro lado, estudos do gene 16S RNA ribossomal mostraram que linhagens de *Streptomyces* sp. associadas à sarna da batata formam um grupo filogeneticamente muito diverso (TAKEUCHI et al., 1996), assim como estudos de hibridização DNA-DNA (HEALY; LAMBERT,1991), Alta diversidade infraespecífica em *S. scabiei* também já foi relatada em estudos de taxonomia numérica realizados por Doering-Saad e colaboradores (1992), corroborando os dados obtidos nas análises de rep-PCR do presente trabalho.

Linhagens de *Streptomyces* patogênicas e linhagens supressoras da doença não puderam ser separadas por análises de rep-PCR (BOX-PCR), entretanto os autores concluíram que essas estão estreitamente relacionadas entre si e que a técnica de rep-PCR pode ser uma ferramenta útil na determinação da identidade das linhagens (SADOWSKY et al. 1996).

Ainda, uma grande variabilidade genética entre espécies de *Streptomyces* foi relatada por Davelos e colaboradores (2004) em estudo de actinomicetos em solos de pradaria nos Estados Unidos, uma vez que os 153 isolados analisados formaram 102 grupos genéticos diferentes. Esse trabalho envolveu análise de três locais distintos de pradaria, com quatro diferentes profundidades e os resultados indicaram que diferenças na composição e diversidade genética sugerem que há ambientes distintos e que essa diversidade tende a diminuir com o aumento da profundidade do solo.

5.2. Avaliação do potencial antagônico *in vitro*

5.2.1. Teste de difusão em Ágar

Nos testes de difusão em Ágar foram testadas as 14 linhagens de *B. subtilis* (IBSBF 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 896, 897, 898, 899, 900 e 901), a linhagem de *Paenibacillus* sp. IBSBF 2305 e as dez linhagens de *Streptomyces* sp. (53, CDPA 10, LC 03, LC 16, LC 32, LC40, MC 25, PA 03, PA 10 e PA 27) isoladas de cupinzeiro ou solo contra as três linhagens de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T, 2298 e 2318).

Nesses testes, as linhagens de *B. subtilis* e *Paenibacillus* sp. não apresentaram halos de inibição (Figuras 9, 10 e 11).

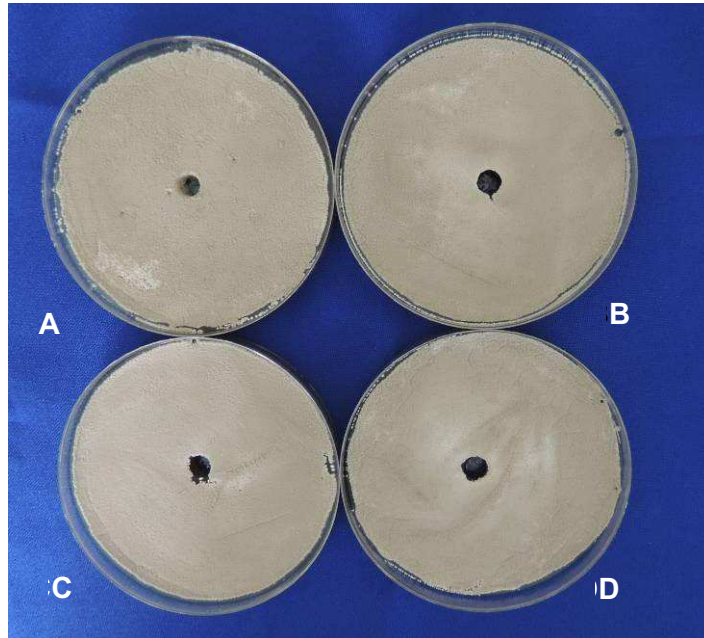


Figura 9. Teste de difusão em Ágar utilizando-se a linhagem de *B. subtilis*. (IBSBF 812) contra linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T. (A) controle somente com água; (B) (C) e (D) Placas contendo 50 µL do filtrado da linhagem de *Bacillus* no orifício central.

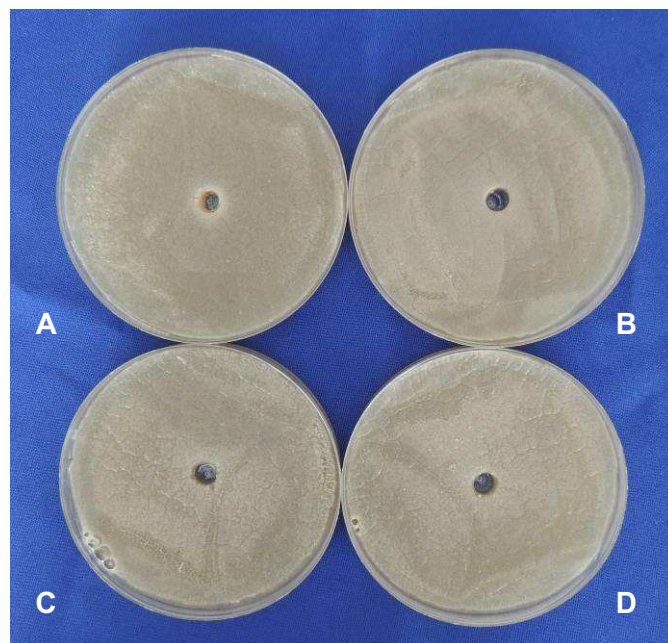


Figura 10. Teste de difusão em Ágar utilizando-se a linhagem de *B. subtilis*. (IBSBF 814) contra linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298. (A) controle somente com água; (B) (C) e (D) Placas contendo 50 µL do filtrado da linhagem de *Bacillus* no orifício central.

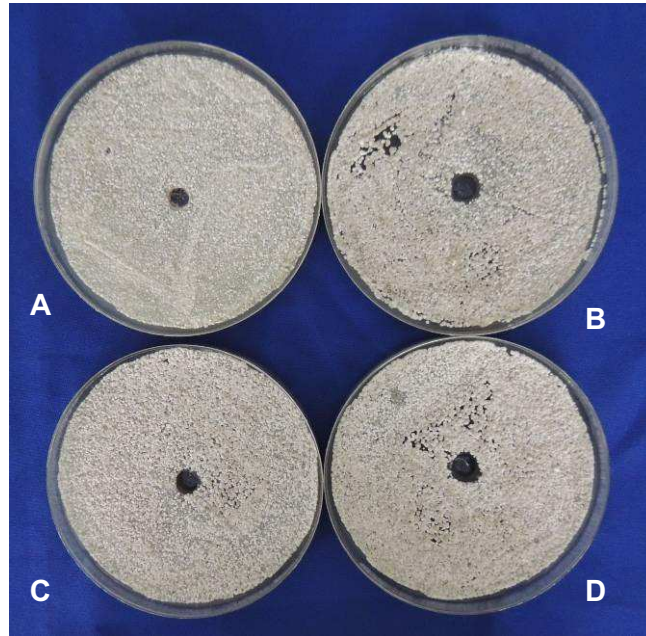


Figura 11. Teste de difusão em Ágar utilizando-se linhagem a de *Paenibacillus* sp. (IBSBF 2305) contra linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318. (A) controle somente com água; (B) (C) e (D) Placas contendo 50 μ L do filtrado da linhagem de *Paenibacillus* no orifício central.

Embora no presente teste as linhagens de *B subtilis* não tenham apresentado qualquer efeito sobre as linhagens de *S. scabiei*, na literatura há vários relatos do emprego de linhagens de *Bacillus* no controle de fitopatógenos.

Testes realizados por Agarry e colaboradores (2005), mostraram que espécies de *Bacillus* sp. foram muito eficientes na inibição do crescimento de *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia* sp. e *Escherichia coli* e concluíram que a atividade antagonista das espécies de *Bacillus* sp. poderia ser atribuída a produção de endósporo, uma vez que esses antagonistas seriam mais adaptados às condições ambientais extremas do patógeno.

Há vários estudos realizados com relação à utilização de *Bacillus subtilis* no controle de doenças, como por exemplo, a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, principal doença bacteriana nas crucíferas. Se a cultura for infectada, recomenda-se a eliminação total, por isso é importante fazer o tratamento preventivo. Em cucurbitáceas, a mancha aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, é responsável por grandes perdas na produção e depreciação dos frutos, e o emprego de *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da doença, sendo recomendado para o tratamento de sementes infectadas, isoladamente ou em condições de associação com outros agentes de controle (D'AGOSTINO, 2009).

Por último, existe um único trabalho relatando a inibição de *Streptomyces* da sarna por *Bacillus* sp. Han e colaboradores (2005) realizaram experimentos também pela

metodologia de difusão em ágar empregando uma linhagem de *Bacillus* sp. para o controle do agente causal da sarna comum em batata e demonstraram que a taxa de infecção diminuiu de 75% de infecção por *S. scabiei* para 35% após tratamento com a linhagem de *Bacillus* sp. Os autores identificaram os compostos iturina A e macrolactina A como os responsáveis por essa inibição. Nos nossos testes não foi verificada inibição das linhagens de *S. scabiei* por linhagens de *B. subtilis*, entretanto, no trabalho realizado por Han e colaboradores (2005) foram testados metabólitos secundários purificados de *Bacillus* sp., enquanto que no presente estudo foram utilizados os produtos brutos apenas filtrados.

Das dez linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo testadas, apenas uma delas, a linhagem PA 03, isolada do solo, apresentou halo de inibição contra as três linhagens patogênicas de *S. scabiei* (Figura 12).

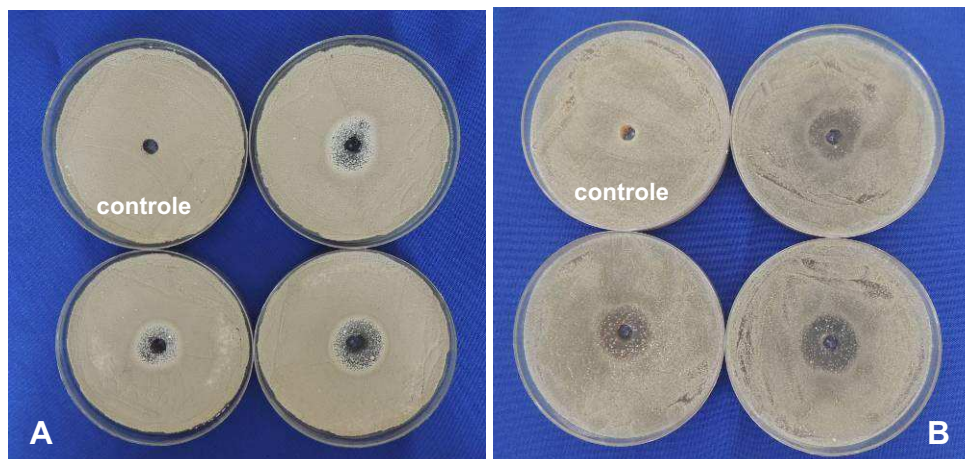


Figura 12. Teste de difusão em Ágar utilizando-se a linhagem de *Streptomyces* sp.. (PA 03) contra linhagens de *Streptomyces scabiei* (A) IBSBF 2049^T e (B) IBSBF 2298.

Estudos realizados por Sharon (2010) mostraram que isolados de solo identificados como *Streptomyces* produziram metabólitos secundários, sendo um processo fundamental para essa espécie de bactéria e que estes metabólitos possuem funções diferentes, como por exemplo, antibióticos. Nesse sentido, o halo de inibição observado nos testes do presente estudo pode ser resultado da ação de um desses metabólitos e por isso, estudos futuros de identificação e caracterização desses compostos deverão ser conduzidos, uma vez esse resultado parece bem promissor para novos testes em casa de vegetação e no campo.

5.2.2. Método de semeadura por estrias

Inúmeros testes foram realizados pelo método de semeadura por estrias, durante o período de abril a julho de 2014 (Figura 13). Mesmo aumentando-se a dosagem de clorofórmio e o tempo de exposição das placas à luz ultravioleta, não ocorreu a inativação das linhagens de *Bacillus subtilis*, inviabilizando a aplicação desse teste no presente estudo.

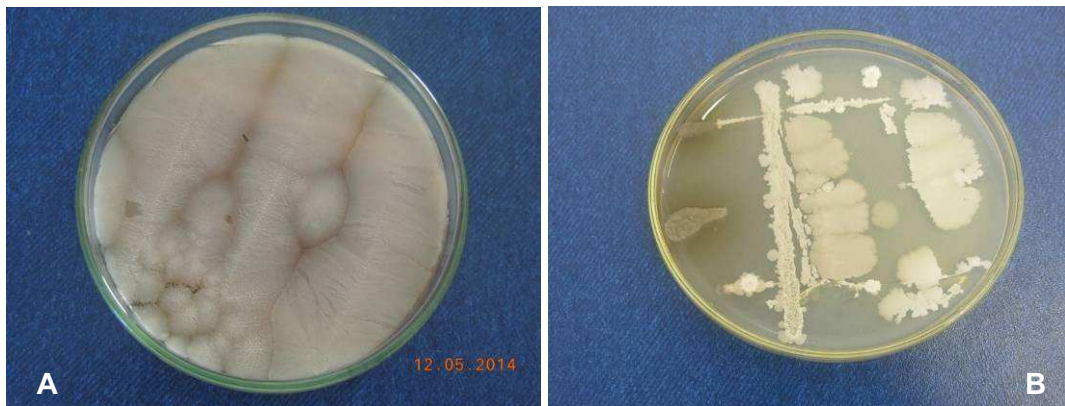


Figura 13. (A) Linhagens de *S. scabiei* semeadas no sentido horizontal (IBSBF 2049^T, 2298 e 2318) e linhagens de *B. subtilis* semeadas na vertical (IBSBF 812 e 813). (B) linhagens de *S. scabiei* semeadas na horizontal (IBSBF 2049^T, 2298 e 2318) e linhagem de *B. subtilis* (IBSBF 810) e de *Paenibacillus* sp. (IBSBF 2305) semeadas na vertical.

Estudos realizados por Cano e colaboradores (1995), mostraram que *Bacillus subtilis* produz endósporo, o que o torna extremamente resistente às agressões externas. Portanto, concluímos que mesmo alterando-se as condições de clorofórmio e luz UV, essa resistência impediu a inativação da linhagem de *Bacillus*, impossibilitando a realização desse tipo de teste.

5.2.3. Avaliação de produção de metabólitos voláteis

As linhagens de *B. subtilis* IBSBF 809 e 810 apresentaram as maiores porcentagens de inibição sobre a linhagem Tipo de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), havendo diferença significativa quando comparada ao tratamento controle. No caso dos ensaios com a linhagem IBSBF 899 a porcentagem de inibição foi de 11,53%, enquanto que com a linhagem IBSBF 809, esse número foi de 24,35%. Os melhores resultados foram obtidos com a linhagem IBSBF 810, observando-se 33,33% de inibição do crescimento do patógeno.

Com relação aos testes com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, embora tenha sido observado 15,15% de inibição com a linhagem IBSBF 810; 24,24% com a linhagem IBSBF 809; 36,36% com a linhagem IBSBF 899 e 37,37% com a linhagem IBSBF 814. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que o coeficiente de variação foi muito alto, ocasionado pelas medidas discrepantes das linhagens IBSBF 809 e 810. Além disso, a execução do experimento foi realizada apenas em duplicata. Em experimentos laboratoriais são recomendadas pelo menos três repetições por tratamento para que possam ser aplicados testes estatísticos, entretanto, o teste de Tukey foi empregado no presente ensaio apenas para dar uma ideia do resultado dos tratamentos em relação ao controle. Novos experimentos serão realizados com maior número de repetições para confirmação dos resultados obtidos.

Por último, nos testes com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318, somente foi observada inibição nos ensaios com a linhagem IBSBF 810, com taxa 22,97% (Tabela 3, Figura 14).

Tabela 3. Medidas do crescimento radial (mm) de linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2049^T, 2298 e 2318 após teste de metabólito volátil com as linhagens de *B. subtilis* IBSBF 809, 810, 814 e 899 e porcentagem de inibição.

Linhagens	2049 ^T	% inibição	2298	% inibição	2318	% inibição
809	14,75 b *	24,35	12.50 a	24,24	19.50 a	---
810	13,00 b	33,33	14.00 a	15,15	14.25 b	22,97
814	21,00 a	---***	10.25 a	37,87	19.50 a	---
899	17,25 ab	11,53	10.50 a	36,36	19.25 a	---
Controle**	19,50 a		16.50 a		18.50 ab	
CV %	6.27		15.93		6.84	

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

** Controle: placas de *S. scabiei* expostas apenas com blocos de meio de cultivo (sem *B. subtilis*).

*** (---) Porcentagem não calculada devido à obtenção de valores de crescimento radial maiores que os obtidos nas placas controle.

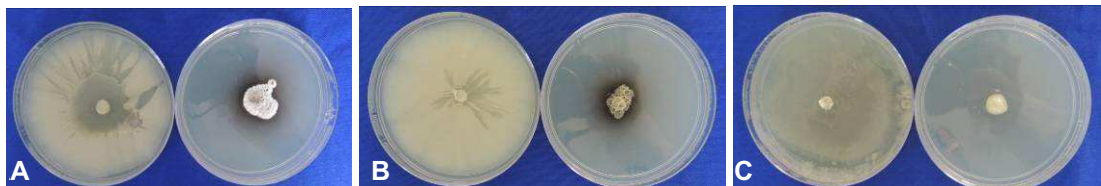


Figura 14. Teste de metabólito volátil utilizando-se (A) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 814; (B) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298 com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 814 e (C) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318 com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 899.

Nos testes de produção de metabólitos voláteis por linhagens de *B. subtilis* verificou-se que os melhores resultados de inibição de crescimento foram de 33,33% para a linhagem Tipo de *S. scabiei* IBSBF 2049^T e de 37,87% para a linhagem nacional IBSBF 2298, proveniente de São Gotardo/MG. Nesses experimentos ficou evidente que a porcentagem de inibição variou de acordo com a linhagem de *B. subtilis* e de *S. scabiei* confrontadas.

Estudos realizados por Chaurasia e colaboradores (2005) demonstraram que o antagonismo pode ser mediado por uma variedade de compostos de origem microbiana, por exemplo, bacteriocinas, enzimas, substâncias tóxicas, metabólitos voláteis, entre outros. As linhagens de *B. subtilis* testadas produziram compostos voláteis que podem induzir anormalidades morfológicas nas estruturas de fungos patogênicos, acarretando efeitos quantitativos variados. Os compostos voláteis produzidos por *B. subtilis* causaram inibição de 31,74% no crescimento de *Cladosporium oxysporum* e de 99,15% para *Paecilomyces lilacinus*.

Analisando a Tabela 3, podemos observar que algumas das linhagens de *B. subtilis* testadas possuem potencial para inibir linhagens de *Streptomyces*, causadoras da sarna da batata. Embora os testes realizados *in vitro* não traduzam a realidade do campo, possibilitam a seleção inicial de linhagens de com potencial de biocontrole de forma mais rápida e menos onerosa.

O teste de produção de metabólitos voláteis, também foi realizado utilizando-se nove linhagens de *Streptomyces* sp., isoladas de cupinzeiro ou solo. Nesses ensaios verificou-se que as linhagens de cupinzeiro não produziram qualquer efeito no crescimento das linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2049^T e 2318. Por outro lado, nos testes com a linhagem IBSBF 2298 observou-se que a linhagem PA 27 causou 14,43% de inibição; as linhagens PA 10 e LC 32 causaram 20,75%; a linhagem MC 25, 23,45%; e o melhor resultado foi de 30,64% utilizando-se a linhagem *Streptomyces* sp. LC 03, isolada de cupinzeiro (Tabela 4, Figura 15).

Tabela 4. Medidas do crescimento radial (mm) de linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2049^T, 2298 e 2318 após teste de metabólito volátil com as linhagens de *Streptomyces* sp.e porcentagem de inibição.

Linhagens	2049 ^T	% inibição	2298	% inibição	2318	% inibição
LC 03	18,33 ab *	---***	12,83 a	30,64	17,33 a	---
PA 27	19,16 a	---	15,83 a	14,43	16,83 a	---
PA 03	15,83 ab	---	18,00 a	---	20,00 a	---
53	16,16 ab	---	21,00 a	---	19,33 a	---
LC 16	17,66 ab	---	17,00 a	---	19,66 a	---
PA 10	16,33 ab	---	14,66 a	20,75	18,00 a	---
LC 32	16,16 ab	---	14,66 a	20,75	20,00 a	---
CDPA 10	16,33 ab	---	16,16 a	---	17,50 a	---
MC 25	14,66 b	---	14,16 a	23,45	17,16 a	---
Controle**	14,50 b		18,50 a		17,00 a	
CV%	8.35		19.49		12.76	

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

** Controle: placas de *S. scabiei* expostas apenas com blocos de meio de cultivo (sem *Streptomyces* sp.).

*** (---) Porcentagem não calculada devido à obtenção de valores de crescimento radial maiores que os obtidos nas placas controle.

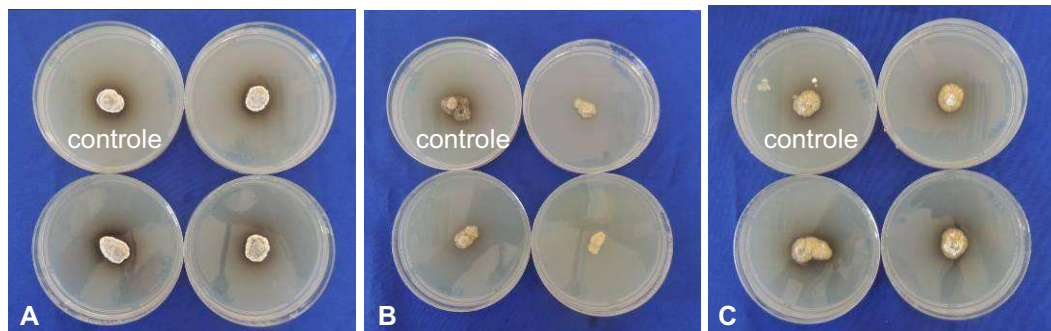


Figura 15. Teste de metabólito volátil utilizando-se (A) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T com a linhagem de *Streptomyces* sp. MC 25; (B) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298 com a linhagem de *Streptomyces* sp. LC 03 e (C) linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318 com a linhagem de *Streptomyces* sp. PA 27.

A diferença de comportamento de inibição de crescimento das linhagens de *Streptomyces* isoladas de cupinzeiro ou solo frente às linhagens de *S. scabiei* deixou claro que a linhagem testada pode apresentar comportamentos diferentes com relação à linhagem a ser controlada. Estudos de biocontrole da sarna da batata realizados por Ryan e colaboradores (2004) mostraram que isolados de *S. scabiei* foram muito resistentes a

inibição da ação de linhagens de *Streptomyces* sp. em testes *in vitro*, porém verificaram redução da severidade da doença na presença do antagonista em teste *in vivo*. As linhagens de *Streptomyces* sp. testadas variaram a eficácia como agentes de biocontrole e entre as cultivares de batata avaliadas no campo. Os autores concluíram, ainda, que a diversidade populacional e agressividade do patógeno representam um desafio significativo para o biocontrole da sarna e ressaltaram a necessidade de mais estudos em diferentes cultivares da batata na presença e ausência de antagonistas.

No presente estudo, as linhagens de *Streptomyces* sp., PA27 e PA 10 (isoladas de solo), LC 32, MC 25 e LC 03 (isoladas de cupinzeiro) mostraram-se promissoras como agentes de biocontrole devendo ser testadas futuramente em casa de vegetação. Lee e colaboradores (2004) testaram 36 isolados de *Streptomyces* com potenciais antagônicos submetidos a testes *in vivo* usando a cultivar Daejima, contra linhagens patogênicas à batata, e desses isolados apenas seis mostraram controle acima de 40% contra *S. scabiei*. Foram testados isolados antagonistas liofilizados misturados com zeolito, bentonite, glucose, farelo de soja e quitina. Nesse estudo também foram testados produtos químicos para comparação dos resultados. Quatro isolados de *Streptomyces* sp., apresentaram atividade de inibição acima de 60% mostrando alta atividade inibitória contra o patógeno *S. scabiei*, e elevada resistência química a antibióticos ou pesticidas. Nesse trabalho os autores concluíram que antagonistas liofilizados foram eficazes no controle da sarna da batata.

5.2.4. Teste de pareamento de culturas

Nesse experimento foram testadas nove linhagens de *B. subtilis* (IBSBF 808, 810, 812, 814, 815, 897, 898, 899 e 900) contra as três linhagens de *S. scabiei*. Para a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2049^T, não foi observada diferença significativa entre as linhagens testadas, embora tenha se verificado que a linhagem IBSBF 814 inibiu o crescimento em 6,68% e as linhagens IBSBF 897 e 900 em 2,68%.

Nos testes com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298, foi observada diferença significativa entre os tratamentos com as linhagens de *B. subtilis*. A linhagem IBSBF 814 apresentou o melhor resultado para esse teste com inibição no crescimento de 22,65%. A linhagem IBSBF 897 causou 20,25% de redução; IBSBF 812 taxa de 19,08%; IBSBF 899 de 10,72%; IBSBF 810 de 8,36%; as linhagens IBSBF 808 e 898 de 4,79% cada e a linhagem IBSBF 900 de 2,40%.

Nos ensaios com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2318 não foi observada diferença significativa entre as linhagens, entretanto a linhagem que apresentou o melhor índice de

inibição foi a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 815 com 23,00% seguida pelas linhagens IBSBF 898 com inibição de 18,42%; IBSBF 814 com 17,25%; IBSBF 810 com 16,11%; IBSBF 897 com 12,66%; linhagens IBSBF 808 e 812 com 11,52% e a linhagem com menor índice de inibição foi a IBSBF 900 com 6,90% (Tabela 5, Figura 16).

Tabela 5. Medidas do crescimento radial (mm) de linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2049^T, 2298 e 2318 após teste de pareamento de cultura com as linhagens de *B. subtilis* IBSBF 808, 810, 812, 814, 815, 897, 898, 899 e 900 e porcentagem de inibição.

IBSBF	2049 ^T	% inibição	2298	% inibição	2318	% inibição
808	27,33 a *	---***	26,66 abc	4,79	25,66 a	11,52
810	25,33 a	---	25,66 abc	8,36	24,33 a	16,11
812	27,66 a	---	22,66 bc	19,08	25,66 a	11,52
814	23,33 a	6,68	21,66 c	22,65	24,00 a	17,25
815	27,33 a	---	26,00 abc	7,15	22,33 a	23,0
897	24,33 a	2,68	22,33 bc	20,25	25,33 a	12,66
898	25,66 a	---	26,66 abc	4,79	23,66 a	18,42
899	25,66 a	---	25,00 abc	10,72	29,33 a	---
900	24,33 a	2,68	27,33 ab	2,40	27,00 a	6,90
Controle**	25,00 a		28,00 a		29,00 a	
CV%	8.82%		7.25%		12.66%	

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

** Controle: placas de *S. scabiei* expostas apenas com blocos de meio de cultivo (sem *B. subtilis*).

*** (---) Porcentagem não calculada devido à obtenção de valores de crescimento radial maiores que os obtidos nas placas controle.

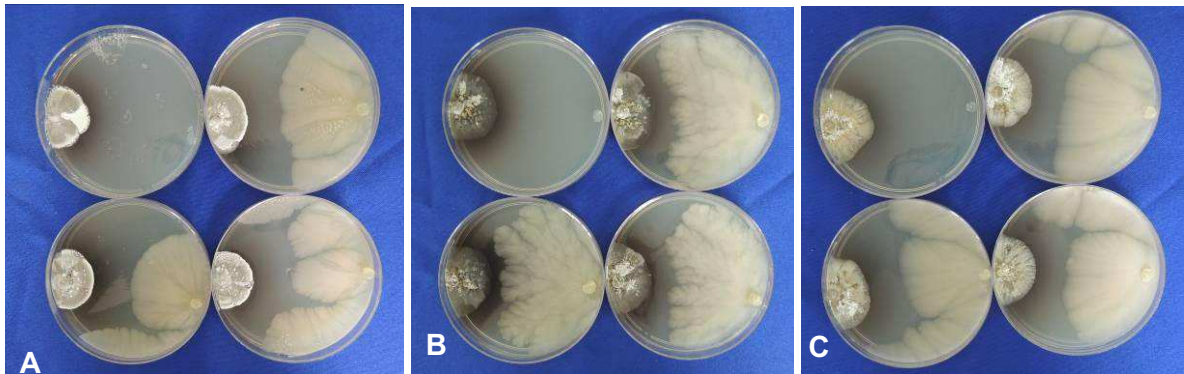


Figura 16. Teste de pareamento de culturas utilizando as linhagens de *Bacillus subtilis* (A) IBSBF 897 contra linhagem patogênica IBSBF 2049^T. (B) IBSBF 815 contra linhagem patogênica IBSBF 2298 e (C) IBSBF 814 contra linhagem patogênica IBSBF 2318.

Nesses testes verificou-se que algumas linhagens de *B. subtilis* puderam ser consideradas como potenciais antagonistas, embora tenha sido observadas diferenças no comportamento dessas linhagens com relação à linhagem de *S. scabiei* testada. Nos testes com a linhagem IBSBF 2318 a porcentagem de inibição foi de 23% quando confrontada com IBSBF 815, entretanto, essa mesma linhagem causou uma inibição de crescimento menor na linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298 e não produziu qualquer efeito sobre a linhagem IBSBF 2049^T. Mais uma vez, ficou claro que a inibição de crescimento dependeu da linhagem patogênica e linhagem antagonista testadas.

A variação de níveis de inibição de crescimento com relação ao fitopatógeno também foi reportada por Kim e colaboradores (2007). Em estudo realizado por esses autores, 20 isolados de *Bacillus* sp. obtidos de compostos de esterco de gado e compostos de algodão, foram testados também pelo método de pareamento de culturas contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* (AG-4) e *Sclerotinia sclerotiorum*. Neste estudo verificou-se que dez isolados apresentaram efeito antagônico sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*, e 12 apresentaram efeitos antagônicos sobre o crescimento micelial de todos os isolados de *P. capsici* testados. Desses 20 isolados, 13 mostraram efeito contra o crescimento micelial de *R. solani* (AG-4), 14 contra *S. sclerotiorum* e dez contra as quatro espécies de fungos testadas. Os mesmos 20 isolados de *Bacillus* sp. citados acima, também foram avaliados contra três linhagens de *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* e *T. viridescens*, causadoras da doença denominada mofo verde do cogumelo e verificou-se que dos isolados testados, apenas dois foram capazes de inibir o crescimento micelial de *T. harzianum*, sete de *T. koningii*, e oito de *T. viridescens* (KIM et al., 2008).

Nos testes com as linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo, apenas a linhagem PA 27 (solo) apresentou 12% de inibição no crescimento da linhagem IBSBF 2318.

5.2.5. Teste de promoção de crescimento *in vivo*

No teste de promoção de crescimento de batata semente, cultivar Ágata, *in vivo* foram testadas 13 linhagens de *B. subtilis* (IBSBF 808, 809, 810, 811, 813, 814, 815, 896, 897, 898, 899, 900 e 901). Nesse ensaio, diferenças no desenvolvimento das plantas foram observadas visualmente (Figura 17), alguns tratamentos se destacaram pelo rápido crescimento das plantas. Esse teste foi avaliado pelo peso de massa seca de parte aérea obtido após um mês de plantio.

Alguns tratamentos não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle: IBSBF 808, 809, 810, 899 e 901. Dentre esses, dois apresentaram crescimento menor que o controle, IBSBF 809 (- 0,19% de massa seca) e IBSBF 901 (- 0,77% de massa seca).

Cinco isolados aumentaram significativamente o crescimento das plantas de batata, conforme dados apresentados na Tabela 6. As linhagens que apresentaram melhor índice de produção de massa seca foram IBSBF 898 com porcentagem de 37,07%; IBSBF 896 com 35,71%; IBSBF 814 com 28,19%; IBSBF 897 com 27,22% e IBSBF 813 com 27,03%.

Tabela 6. Massa média de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de batata, inoculadas com as linhagens de *Bacillus subtilis* e porcentagem de aumento de massa seca.

Tratamento	MMSPA (g)	% de aumento
Controle*	1,036 ± 0,011 d**	---***
808	1,058 ± 0,033 d	2,12
809	1,034 ± 0,009 d	- 0,19
810	1,058 ± 0,028 d	2,12
811	1,138 ± 0,014 cd	9,85
813	1,316 ± 0,040 abc	27,03
814	1,328 ± 0,057 abc	28,19
815	1,170 ± 0,044 bcd	12,93
896	1,406 ± 0,099 ab	35,71
897	1,318 ± 0,066 abc	27,22
898	1,420 ± 0,054 a	37,07
899	1,042 ± 0,029 d	0,58
900	1,166 ± 0,068 cd	12,55
901	1,028 ± 0,006 d	- 0,77
CV	9,07%	

* Controle sem a adição de linhagens de *B. subtilis*.

** Massa média de matéria seca da parte aérea em gramas (fórmula $x = x + 1,0$) ± erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% ($P < 0,05$).

*** Porcentagem do aumento de matéria seca.



Figura 17. Teste de promoção de crescimento de plantas de batata em casa de vegetação empregando-se as linhagens de *B. subtilis* IBSBF 901, 811 e 898.

A promoção de crescimento, proporcionada pelo emprego de *B. subtilis*, pode levar a semente de uma espécie vegetal a uma rápida germinação. Em estudos realizados por Manjula e Podile (2005), sementes de feijão guandu tratadas com formulação a base de *B. subtilis* AF-1 em turfa suplementada com quitina apresentaram aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%.

Segundo ARAUJO (2008), sementes de algodão, milho e soja expostas ao tratamento com bioformulado à base de *B. subtilis* PRBS1 apresentaram incremento na emergência das plântulas. Assim, houve um rápido desenvolvimento da plântula, levando-a a alcançar o estágio adulto mais cedo, e com isso permanecendo menos tempo no campo, o que acarretaria um escape contra os patógenos presentes no solo e no ambiente externo.

O sucesso da utilização de *B. subtilis* na promoção de crescimento de plantas está intrinsecamente relacionado com as características biológicas deste micro-organismo, que apresenta facilidades para a manutenção e sua viabilidade em bioformulados. Assim, a potencialidade para o incremento da produtividade, bem como a redução de doenças, tem se tornado evidente para essa espécie de *Bacillus* (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

No nosso estudo, as linhagens de *B. subtilis* proporcionaram um aumento da massa seca de plantas de batata, indicando que essa possa ser uma alternativa para aumento da produção, entretanto, foram avaliados apenas o aumento de massa da parte aérea. Novos estudo deverão ser conduzidos para se verificar se esse efeito também ocorre na produção ou tamanho dos tubérculos.

6. CONCLUSÕES

- O emprego da técnica de rep-PCR (BOX A1R e ERIC1R/ ERIC2) permitiu verificar uma alta diversidade genética entre as 43 linhagens *Streptomyces scabiei* estudadas, não sendo possível separá-las por região de isolamento ou variedade de batata afetada;
- Nos testes de difusão em ágar, somente foram observados halos de inibição contra as três linhagens de *S. scabiei* nos ensaios envolvendo a linhagem de *Streptomyces* sp. PA-03 (solo);
- A dificuldade em inativar as linhagens de *B. subtilis* impossibilitou a realização do teste de semeadura por estrias;
- Nos testes de avaliação de produção de metabólitos voláteis, verificou-se que a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 810 causou 33,33% de inibição no crescimento da linhagem Tipo de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T). Nos testes com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298, foi observada uma taxa 37,77% de inibição com as linhagens de *B. subtilis* IBSBF 814 e 36,36% com a linhagem IBSBF 899. Nesse ensaio verificou-se que as nove linhagens de cupinzeiro ou solo não produziram qualquer efeito no crescimento das linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2049^T e 2318. Por outro lado, nos testes com a linhagem IBSBF 2298 observou-se que a linhagem PA 27 causou 14,43% de inibição; as linhagens PA 10 e LC 32 causaram 20,75%; a linhagem MC 25, 23,45%. O o melhor resultado foi de 30,64% de inibição causado pela linhagem *Streptomyces* sp. LC 03;
- Nos testes de pareamento de culturas com as linhagens de *Streptomyces* IBSBF 2049^T e 2318 não foram observadas diferenças significativas entre as nove linhagens de *B. subtilis* testadas e o controle. Nos ensaios com a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2298 verificou-se que no tratamento com a linhagem de *B. subtilis* IBSBF 814 a porcentagem de inibição foi de 22,65%, enquanto que com a linhagem IBSBF 897 foi de 20,25% e com a linhagem IBSBF 812 a inibição foi de 19,08%. Nos testes com as linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas de cupinzeiro ou solo, apenas a linhagem PA 27 (solo) apresentou 12% de inibição no crescimento da linhagem IBSBF 2318;
- No teste de promoção de crescimento, a linhagem IBSBF 898 apresentou o melhor resultado de produção de massa seca de parte aérea, com 37,07%, seguido pela linhagem IBSBF 896 com 35,71%.

- Os métodos de difusão em Ágar e semeadura por estrias não se mostraram adequados na caracterização de linhagens de *B. subtilis*.
- Nos ensaios de produção de metabólitos voláteis e pareamento de culturas verificou-se que a porcentagem de inibição de crescimento de diferentes linhagens de *S. scabiei* variou de acordo com a linhagem antagonista testada.
- Os testes de promoção de crescimento *in vivo* apontaram que algumas linhagens de *B. subtilis* podem ser empregadas de forma benéfica, melhorando o desenvolvimento da planta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. J. Potato tuber lenticels: development and structure. **Annals of Applied Biology** 79: 265-273, 1975.
- ADAMS, M. J.; LAPWOOD, D. H. Studies on the lenticels development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils. **Annals of Applied Biology** 90: 335-343, 1978.
- AGARRY, O. O.; AKINYOSOYE, F.A.; ADETUYI, F.C. Antagonistic properties of microorganisms associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) products. **African Journal of Biotechnology**. V.4 (7), pp. 627-632. 2005
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 4th ed. Academic Press, San Diego, 1997.
- AMES, M.; SPOONER, D.M. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. **American Journal of Botany**. N. 95, p. 252-257, 2008.
- ANTOUN, H. ,PREVOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria., In: **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer.Dordrecht Siddiqui, Z.A. (eds), pp. 1-38, 2006.
- ARAUJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**. v.32, p.456-462, 2008.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB 14. **Applied and Environmental Microbioly**, 62, 4081 – 4085, 1996.
- BABCOCK, M. J; ECKWALL, E. C.; SCHOTTEL, J. L. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. **Journal of General Microbiology** 139: 1579-1586, 1993.
- BAIS, H. P.; FALL, R; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis root by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfacton production. **Plant physiology**, 134, 304 – 319, 2004.
- BEAUSÉJOUR, J.; CLERMONT, N. e BEAULIEU, C. Effectos *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF- 76 and of chitosan on common scab of potato. **Plant and soil**, v. 256, p. 463-468, 2003.
- BENT, E. Induced systemic resistance mediated by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Fungi (PGPF), In: **Multigenic and induced systemic resistance in plants**. Tuzun, S. ,Bent, E. (eds), pp. 225-258, Springer.New-York, 2006.
- BERNAL, G. ILLIANES, A.; CIAMP, L.Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Eletronic Journal of Biotechnology**. 5(1), 2002.
- BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas / Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. -- Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 341 p. 2009.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. ***Curr Opin Microbiol*** 8(2):208-215, 2005.

BONDE, M.R; McINTYRE, G.A. Isolation and biology of a *Streptomyces* sp. Causing potato scab in soils below pH 5.0. **Am. Potato J.**, v.45, p. 273-278, 1968.

BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; NORMAND, P.; JOUAN, B. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. ***Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*** 50: 91-99, 2000.

BOUZAR, H., JONES, J.B., STALL, R.E., LOUWS, F.J., SCHNEIDER, M., RADEMAKER, J.L.W., DE BRUIJN, F.J. e JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing bacterial spot diseases on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, 89: 328-335, 1999.

BROWN, C.R. Origin and history of the potato. **American potato Journal**, v. 70, n. 5, p.363-373, 1993.

BRUEHL, G.W.S. Soilborne plant pathogens. **New York: MacMillan Publishing Company**, 368 p, 1987.

BUTT, T.M., HARRIS, J.G., POWELL, K. Microbial Biopesticides: The European Scene., In: **Biopesticides: use and delivery**. Hall, F.R. ,Menn, J.J. (eds), pp. 23-44, Humana Press.Totowa, 1999.

BYRNE, J.M; DIANESE, A.C., JI, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; LOUWS, F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under Weld conditions at several locations in North America. **Biological Control** 32 408–418, 2005.

CAMPBELL, R. Biological control of microbial plant pathogens, 228 p. 1989.

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

CANO, R.J.; BORUCKI, M.K. Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million- Year-Old Dominican Amber. **Science**, v.268, p. 1060-1064, 1995.

CAWOY, H; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. **Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management**. Edited by Margarita Stoytcheva, ISBN 978-953-307-459-7, p. 532, 2011.

CHAURASIA, B.; PANDEY,A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research** 160, p. 75—81, 2005.

CHEN, X.H., KOUMOUTSI, A., SCHOLZ, R., SCHNEIDER, K., VATER, J., SUSSMUTH, R., PIEL, J., BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its

potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, Vol. 140, No. 1/2, pp. 27- 37, 2009.

CLARK C.A., CHEN C., WARD-RAINEY N., PETTIS G.S. Diversity within *Streptomyces ipomoeae* based on inhibitory interactions, rep-PCR, and plasmid profiles. **Phytopathology**, 88: 1179-1186, 1998.

CORRÊA, D.B.A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil. Dissertação defendida pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas/SP, 2011.

CORRÊA, D. B. A; SALOMÃO, D.; RODRIGUES-NETO, J.; HARAKAVA, R.; DESTÉFANO, S. A. L. Application of PCR-RFLP technique to species identification and phylogenetic analysis of *Streptomyces* associated with potato scab in Brazil based on partial atpD gene sequences. **European Journal of Plant Pathology**. Volume 142:1 pp 1-12, 2015.

CULLEN, D. W.; LEES, A. K. Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* sp. on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology** 102: 1082-1094, 2007.

D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M.A.B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B., 2009.

DAFWA. – Department of Agriculture and Food of Western Australia. **Biological control for declared plants**. 2014. <https://agric.wa.gov.au/n/3043>. Acesso: 26 de março de 2015.

DAVELOS, A.L.; XIAO, K.; SAMAC, D.A.; MARTIN, A.P.; KINKEL, L.L. Spatial variation in *Streptomyces* genetic composition and diversity in a prairie soil. **Microbial Ecology**. V. 48. P. 601-612, 2004.

DAVIS, J.R.; McDOLE, R.E.; CALLIHAM, R.H. Fertilizer effects on common scab of potato and the relation of calcium and phosphate-phosphorus. **Phytopathology**, v.66,n.10, p. 1236-1241, 1976.

DE BRUIJIN, F.J. Used of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2180-2187, 1992.

DOERING-SAAD, C.; KAMPFER, P.; MANULIS, S.; KRITZMAN, G.; SCHNEIDER, J; ZAKRZEWSKA- CZERWINSKA, J.; SCHREMPF, H.; BARASH, I. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 58, n° 12, p. 3932-3940, 1992.

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). The statistics division. Disponível em: www.potato2008.org/en/world/index.html. Acesso: 27 de agosto de 2008.

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Strengthening potato value chains: technical and policy options for developing countries. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1710e/i1710e.pdf>. Acesso: 30 de novembro de 2010

- FAUCHER, E.; OTRYSCO, B.; PARADIS, E.; HODGE, N. C.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Quebec. **Plant Disease**, 77: 1217-1220, 1993.
- FAUCHER, E.; PARADIS, E.; GOYER, C.; HODGE, N. C.; HOGUE, R.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing deep-pitted scab of potato in Québec, Canada. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 222-225, 1995.
- FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; MARTINS, M. C. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* sp.p. da batata. **Fitopatologia Brasileira** 28 (6): 650-655, 2003.
- FISCHER, I.H.; MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. S. A.; KIMATI, H. Efeito de fertilizantes e fungicidas na incidência da sarna da batata. **Batata show** n° 11. Ano 5, 2005.
- FISCHER, I. H.; TEIXEIRA, A. P. M.; TOFFANO, L. GARCIA, E. O. Reação de cultivares de batata a *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum profunda. **Summa Phytopathologica** 35 (3): 219-222, 2009.
- FRANCIS, I., HOLSTERS, M., VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. **Environmental Microbiology**, Vol. 12, No. 1, pp. 1-12, 2010.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E., CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. In: **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Siddiqui, Z.A. (eds), pp. 143-172, Springer.Dordrecht, 2006.
- GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and related genera the aerobic endospore forming bacteria. **Phytopathology**. 94 (11), 1245-1248, 2004.
- GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. Bol. Pesq. Fl., **Colombo**, n.43, p.123-138, 2001.
- GOYER, C.; FAUCHER, E.; BEAULIEU, C. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46: 635-639, 1996.
- GUPTA, V.P.; BOCHOW, H.; DOLEJ, S.; FISCHER, I. Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.107, p.145-154, 2000.
- HAN, J.S; CHENG, J.H.; YOON,T.M.; SONG, J.; RAJKARNIKAR, A.; KIM, W.G.; YOO, I.D.; YANG, Y.Y. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. **Sunhua.Journal of Applied Microbiology**. Vol. 99, 213-221, 2005.
- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease** 84, 377 – 393, 2000.
- HARMAN, G. E.; BJÖRKMAN, T.; ONDIK, K; SHORESH, M. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. **Out looks on Pest Management**. Pp. 1-6, 2008.
- HEALY, F. G.; LAMBERT, D. H. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. **International Journal os Systematic Bacteriology**. Vol. 41, n°4, p.479-482, 1991.

HENRIQUES, A.O.; MORAN JUNIOR, C.P. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods**, v.20, p.95-110, 2000.

HILTUNEN, L.; VALKONEN, J. Alternative methods for control of potato common scab. MTT **Agrifood Research Finland. PTDW Hamar Norway** 16-18, 2011.

HOOVER, W.J. Common Scab. In: Compendium of Potato Diseases. W.J. Hoover ed. **American Phytopathological Society**. St. Paul MN. 125 p, 33-34, 1981.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** 23 (11): 1-80, 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/. Acesso: 10 de abril de 2013..

JADOSKI, S. M.; MAGGI, A. S. L.; BRUNETTA, L.; WAZNE, R. Sucessão de culturas na fitossanidade e produtividade da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.). **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia** 2 (1): 161-166, 2009.

KILIAN, M; STEINER, V. JUNGLE, H; SCHMIEDEKNECHT, G. HAIN, R.FZB21. *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Phanzenschutz – Nachrichten Bayer**, 1, 172 – 95, 2000.

KIM, G.W.; WEON, H.Y.; LEE, S.Y. *In vitro* antagonistic effects of Bacilli isolates against four soilborne plant pathogenic fungi. **The plant pathology Journal**. 24(1): 52-57, 2007.

KIM, W.G.; WEON, H.Y.; SEOK, S.J.; LEE, K.H. *In vitro* antagonistic characteristics of Bacilli isolates against *Trichoderma* spp. And three species of mushrooms. **Mycobiology**. 36 (4): 266-269. 2008.

KONDOH, M. HIRAL, M. SHODA, M. Integrated biological and chemical control of damping off using *Bacillus subtilis* 1x B14 – C and Flutolamil. **Journal of Biosciencia and Bioengineering**, 91(2), 173 – 177, 2001.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.251-257, 2003.

LABEDA, D. P.; LYONS, A. J. DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. **Appl Environ Microbiol** 58: 532-535, 1992.

LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 39: 387–392, 1989 a.

LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 39: 393–396 1989 b.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Tópica – **Ciências Agrárias e Biológicas**. V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

LARKIN, R. P.; GRIFFIN, T.S. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green manures. **Crop protection** 26: 1067-1077, 2006.

- LASLO, É.; GYÖRGY, É.; MARA, G.; TAMÁS, É.; ÁBRAHÁM, B.; LÁNYI, S. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. **Crop Protection** 40, p. 43 a 48, 2012.
- LAWRENCE, C. H.; CLARK, M. C.; KING, R. R. Introduction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. **Phytopathology** 80: 606-608, 1990.
- LEE, H - B; CHO, J - W; PARK, D- J; LI, C – T; KO, Y.H.; SONG, J – H.; KOH, J – S.; KIM, B – J; KIM, C – J. In vivo screening for Biocontrol Agents (BCAs) against *Streptomyces scabiei* causing potato common scab. **The plant pathology Journal**. 20 (2): 110-114, 2004.
- LEELASUPHAKUL, W., HEMMANEE, P., CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Vol. 48, No. 1, pp. 113-121, 2008.
- LEHTONEN, M. J.; RANTALA, H.; KREUZE, J. F. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* sp.) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. **Plant Pathology** 53: 280-287, 2004.
- LEMESSA, F., ZELLER, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. **Biological Control** 42, 336 – 344, 2007.
- LEWIS, B. G. Effects of water potential on the infection of potato tubers by *Streptomyces scabies* in soils. **Ann. Appl. Biol.** 66: 83-88, 1971.
- LIU, Z.; SHI, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z. O.; LU, Z.; LI, W.; HUANG, Y.; RODRIGUEZ, C.; GOODFELLOW, M. Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of '*Microstreptospora cinerea*' to the genus *Streptomyces*, *Streptomyces yanii* sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55: 1605-1610, 2005.
- LOPES, C.A. Controle integrado das doenças bacterianas da batata. **In Produção integrada da batata**. Vol 2, 2011.
- LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; FRY, B. A.; KING, R. R. Plant pathogenicity in the Genus *Streptomyces*. **Plant Disease** 81 (8): 836-846, 1997.
- LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. **Annu. Rev. Phytopathol.** 44: 469-487, 2006.
- LOSICK, E., KOLTER, R.. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, Vol. 16, No. pp. 269-275, 2008.
- LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L.W.; STROMBERG, J. L. W.; GHERNA, V.K.; DE BRUIJN, F.J.; LACY, G. H. Rep-PCR genomic fingerprinting of 123 ATCC xanthomonads strains. **Phytopathology**, 87: S60, 1997.
- LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J. L.W. e DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR – based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Ann. Rev. Phytopatol.**, 37: 81-125, 1999.
- LOUWS, F.J., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. e DE BRUIJN, F. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains

- generated with repetitive sequences and PCR. **Appl. Environm. Microbiol**, 60: 2285-2295, 1994.
- LOUWS, F.J., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. e DE BRUIJN, F.J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, 85: 528-536, 1995.
- LUGTENBERG, B., KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting-rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Vol. 63, No. pp. 541-556, 2009.
- MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.
- MANZER, F. E.; McINTYRE, G. A.; MERRIAM, D. C. A new potato scab problem in Maine. **Maine Agric. Exp. Sta. Bull.** 85: 1-24, 1977.
- MANZER, F. E.; STORCH, R. H.; SEWELL, G. H. Evidence for a relationship between certain soil arthropods and acid scab development. **American Potato Journal** 61: 741-746, 1984.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa nº 12, de 10 de Junho de 2005. Disponível em: www.fiscolex.com.br/doc_362873_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_12_10_JUNHO_2005.aspx. Acesso: 15 de Janeiro de 2015.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Projeções do Agronegócio Brasil 2009/10 a 2019/20. Disponível em: <http://www.promoalgo.com.br/documentos/Projecoes%20-%20Mapa%20-%202009.10%20a%202019.20.pdf>. Acesso: 30 de Janeiro de 2012.
- MAYFIELD, C.I.; WILLIAMS, S.T.; RUDDICK, S.M. e HATFIELD, H.L. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of *Streptomyces* in soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.4, p.79-91, 1972.
- MIYAJIMA, K.; TANAKA, F., TAKEUCHI, T.; KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48: 495-502, 1998.
- NGUGIA, H.K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K.S.; SAVELLEA, A.T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, p.32-38, 2005.
- OHMS, R.E.; FENWICK, H.S. Potato scab: symptoms, cause and control. **Idaho Agricultural Extension Service**. Bulletin 346, 1961.
- OLIVEIRA A. G., MURATE, L.S., SPAGO, F.R., LOPES, L.P., BERANGER, J.P.O., SAN MARTIN, J.A.B., NOGUEIRA, M.A., ANDRADE, C.G.T.J., MELLO, J.C.P., ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control** 56, 125 – 131, 2011.
- ONGENA, M.; DUBY, F.; JOURDAN, E.; BEAUDRY, T.; JADIN, V.; DOMMES, J.; THONART, P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p. 692-698, 2005.

- ONGENA, M., ADAM, A., JOURDAN, E., PAQUOT, M., BRANS, A., JORIS, B., ARPIGNY, J.L., THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, Vol. 9, No. pp. 1084-1090, 2007.
- OPGNORTH, D.C., SMART, C.D., LOUWS, F.J., DE BRUJIN, F.J., KIRRK-PATRIC, B.C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease** 80: 868-873, 1996.
- PAL, K. K.; B. MCSPADDEN GARDENER, B. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor** DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.
- PARK, D.H.; KIM, J.S.; KWON, S.W.; WILSON, C.; YU, Y.M.; HUR, J,H, e LIM, C.K. *Streptomyces luridiscabiei* sp.nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 2049-2054, 2003.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.186–199, 2003.
- PERSON, L.H.; MARTIM, W.J. Soil rot of sweet potatoes in Louisiana. **Phytopathology** 30: 913-926, 1940.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.456-464, 2004.
- PIGGOT, P., HILBERT, D. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, Vol. 7, No. 6, pp. 579-586, 2004.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 13. ed. **Piracicaba: Nobel**, 1990. p. 468.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J., Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Lett. Appl. Microbiol.** 8: 151-156, 1989.
- POOLER, M.R., RITCHIE, D.F. e HARTUNG, J.S. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. **Appl. Environm. Microbiol.**, 62: 3121-3127, 1996.
- POWELSON, M.L.; JOHNSON, K.B.; ROWE, R.C. Management of diseases caused by soilborne pathogens. In. ROWE, R.C. (ed). potato health management. **APS plant health management series**. St. Paul: APS Press. p. 149-158, 1993.
- PRÉVOST, K.; COUTURE, G.; SHIPLEY, B.; BRZEZINSKI, R. E BEAULIEU, C. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. **Biocontrol**, v. 51, p. 533-546, 2006.
- RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.;KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 50: 665-677, 2000.

RAMUNDO, B. A., CLAFIN, L. E. Identification of *Burkholderia andropogonis* with a repetitive sequence BOX element and PCR. **Curr. Microbol.**, 50: 52-56, 2005.

RAN, L.X., LI, Z.N., WU, G.J., LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M.. Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. **European Journal of Plant Pathology** 113, 59–70, 2005.

ROHLF, F. J. Computer vision needs in systematic biology. Chapter 24, pp. 365-373 in Fortuner, R. (ed.) **Advances in computer methods for systematic biology**. Johns Hopkins Univ. Press: Baltimore. 560 pp, 1992.

RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L.; SHIMOYAMA, N. Y. A sarna da batata causada por *Streptomyces* sp.p. **Publicação Técnica ABBA**, 31 p., 2008.

ROMEIRO, R. S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. **Editora Universidade Federal de Viçosa**, 2001.

ROMEIRO, R.S.; LANNA-FILHO, R.; VIEIRA, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; CARVALHO, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v.153, p.120-123. 2005.

ROSAS-GARCIA, N. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis* : an environmentally friendly alternative. **Recent Patent in Biotechnology**, Vol. 3, No. pp.28-36, 2009.

RYU, C.M., FARAG, M.A., HU, C.H., REDDY, M.S., KLOEPPER, J.W., PARE, P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in **Arabidopsis**. **Plant Physiology**, Vol. 134, No. 3, pp. 1017-1026., 2004.

RYAN, A.D.; KINKEL, L.L.; SCHOTTEL, L. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. **Biocontrol Science and Technology**, vol. 14; 3: 301-311, 2004.

SADOWSKY, M. J.; KINDLE, L. L.; BOWERS, J.H.; SCHOTTEL, J.L. Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3489-3493. 1996.

SALOMÃO, D. Levantamento e caracterização de *Streptomyces* spp. causadores da sarna em batata nas principais regiões produtoras do Brasil. Dissertação defendida pela Instituto Biológico. São Paulo, 2009.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edition. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, 2001.

SHARMA, A.; DIWEVIDI, V.D. ; SINGH, S.; PAWAR, K. K.; JERMAN, M.; SINGH, L.B.; SINGH S.; SRIVASTAWA, D. Biological Control and its Important in Agriculture. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**. Volume 4, N° 3, pp. 175-180, 2013.

SHARON, G. Secondary metabolite production by Streptomycetes in situ and in vivo, **Dept. of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Tel Aviv University, Tel Aviv, 69978, 2010.

SHIMOYAMA, N. Y. Risco subterrâneo. **Revista Cultivar: Hortaliças e frutas**. 2011/2012.

SHODA, M.. Bacterial Control of Plant Diseases. **Jornal of Bioscience and Bioengineering** 89, 515 – 521. Review., 2000.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, Vol. 56, No. 4, pp. 845-857, 2005.

STOGER, A., BARIONOVI, D., CALZOLARI, A., GOZZI, R., RUPPITSCH, W., SCORTICHINI, M. Genetic variability of *Xanthomonas fragariae* strains obtained from field outbreaks and culture collections as revealed by repetitive-sequence PCR and AFLP. **Journal of Plant Pathology**, 90: 496-473, 2008.

ST-ONGE, R.; GOYER, C.; COFFIN, R.; FILION, M. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. **Systematic and Applied Microbiology** 31: 474-484, 2008.

STRAGIER, P.; LOSICK, R.. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual Reviews of Genetics**, v.30, p.297-341, 1996.

TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRna sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Vol. 46, n° 2, p. 476-479, 1996.

TANAKA, F.; TAKEUCHI, T.; TANII, A.; MIYAJIMA, K.; ABE, H.; KUNINAGA, S. A causal pathogen of scab on potato, *Streptomyces turgidiscabies* n.sp. **Ann. Phytopathol.Soc. Japan**, v.61, p. 253-254 (abstract), 1995.

TARIQ, M.; YASMIN, S.; HAFEEZ, F. Y. Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology** 41, p. 439-451, 2010.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117–126, 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p.453-483, 1998.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, 19: 6823-3631, 1991.

WAKSMAN, S.A.; HENRICI, T.A. Family II. Actinomycetaceae Buchanan and family Streptomycetaceae Waksman; henrici. In: R.S. Breed, E.G.D. Murray; A.P. Hitchens (eds). **Bergey's manual of determinative microbiology**, 6th Ed. Williams e Wilkens, Baltimore, U.S.A., p. 892-980, 1948.

WANNER, L. A. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. **Phytopathology** vol. 96, n° 12, 1363-1371, 2006.

WEI, G.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 81, p.1508-1512, 1991.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 52, No. pp. 487-511, 2001.

WILSON, C.R.; RANSON, L.M; PEMBERTON, B.M. The relative importance of seed-borne inoculums to common scab disease of potato and the efficacy of seed tuber and soil treatment for disease control. **J. Phytopathol.**, v. 147, p. 13-18, 1999.

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

ZADEH, M.K, BONJAR,G.H.S; FARROKHI, P.R; GHASEMI,A.;AGHIGHI, S.;MAHDAVI, M.J. Antagonistic potencial of two native *Streptomyces* strains in biocontrol of the major causals of common scab of potato in Iran. **Asian Journal of Plant Sciences** 5 (1): 5-8, 2006.

ZEHNDER, G. W.; MURPHY, J. F.; SIKORA, E. J.; KLOEPPER, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p.39-50, 2001.

ZAMBOLIM, L.; CASSIA, R. M.; PICANÇO, M.C.; PÁDUA, J.G.; ZAMBOLIM, E.M.; MESQUITA, H.A.; LOPES, C.A.; MANTOVANI, E.C.; QUEIROZ, M. E.; MELO, P.C.T.; PALOCCI NETO, O.; RIBEIRO, J. D. R.; RIBEIRO NET, A.E. Produção Integrada: Base da sustentabilidade da bataticultura. In: **Produção Integrada da Batata**, 2011.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

