



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
ANTAGONISTAS A FITOPATÓGENOS E DETECÇÃO DE
GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS**

DEISE REGINA DOS SANTOS

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

DEISE REGINA DOS SANTOS

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS A
FITOPATÓGENOS E DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador

Dr. Marcelo Ferreira Fernandes

Co-Orientadora

Dra. Èrika Cristina Teixeira dos Anjos

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE-BRASIL**

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237i	Santos, Deise Regina dos Isolamento e seleção de bactérias antagonistas a fitopatógenos e detecção de genes associados à produção de compostos bioativos / Deise Regina dos Santos ; orientador Marcelo Ferreira Fernandes. – São Cristóvão, 2014. 58 f. : il. Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2014. 1. Agrobiodiversidade. 2. Controle biológico. 3. Compostos bioativos. 4. Antagonismo. 5. <i>Plenodomus destruens</i>. 6. <i>Thielaviopsis paradoxa</i>. 7. <i>Xanthomonas campestris</i>. I. Fernandes, Marcelo Ferreira, orient. II. Título CDU: 632.937
-------	--

DEISE REGINA DOS SANTOS

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS A
FITOPATÓGENOS E DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 30 de setembro de 2014

Dra. Ana Andrea Teixeira Barbosa
UFS

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz
UNIT

Dr. Marcelo Ferreira Fernandes
Embrapa Tabuleiros Costeiros
(Orientador)

Dra. Èrika Cristina Teixeira dos Anjos
Embrapa Tabuleiros Costeiros
(Co-Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE-BRASIL
2014

*À Gabrielly e Emanuely por darem um
novo sentido às nossas vidas...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me dar forças para que eu perseverasse até o final do meu objetivo. Aos meus amados pais, pelo apoio e incentivo incondicional e por não medirem esforços a fim de possibilitar a minha formação acadêmica. Aos meus amados irmãos, pelo imenso carinho e companheirismo dedicados e por abraçarem a minha causa durante esses dois anos.

Ao professor Dr. Marcelo Ferreira Fernandes pela orientação, transmissão de conhecimento, sugestões e pela dedicação.

A Dra. Èrika Cristina Teixeira dos Anjos, pelos ensinamentos, pela paciência e pela ajuda principalmente nos momentos de dificuldade.

A professora Dra. Roberta Pereira Miranda pelas valiosas sugestões e pela transmissão de conhecimento.

Ao professor Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz pela contribuição para a realização desse trabalho.

À banca examinadora pela participação na defesa, críticas e sugestões.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Núcleo de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros por fornecer estrutura e profissionais aptos a contribuir para a realização desse trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa.

Às amigas de Pós-graduação, Isabella e Poliana pelo apoio e por sempre estarem disponíveis a ajudar.

Às amigas Adriana e Isis por acreditarem no meu objetivo e encorajar-me para que eu prosseguisse.

A Carlisson pelo companheirismo.

A Diego pelo incentivo e amizade dedicados ao longo de todos esses anos.

À família “LMS”, Bryanne, Thais, Carol, Mayana, Alannah, Wendel, Yasmim e Silvio pela ajuda nos momentos de sobrecarga e pelo incentivo nos momentos de angústia. Vocês tornaram meus dias mais divertidos!

Ao Laboratório de Biotecnologia molecular, em especial a Renata pelo companheirismo, amizade e por me dar forças nos momentos difíceis. Serei eternamente grata!

Ao Laboratório de Controle Biológico, por permitir parte da realização dos experimentos. Em especial, a Francisco por sempre se mostrar solícito.

Ao Laboratório de Fitopatologia, pela disponibilização dos isolados fúngicos utilizados no estudo.

A toda equipe técnica da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em especial a Frederico pela paciência e prontidão.

A Guedes pelo incentivo de todos os dias.

Um agradecimento especial a D. Vera pelo acolhimento e por assumir o papel de uma verdadeira mãe! Jamais esquecerei do seu apoio!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui!

BIOGRAFIA

DEISE REGINA DOS SANTOS, filha de José Augusto dos Santos e Maria das Graças de Campos, nasceu na cidade de São Paulo, no estado de São Paulo, em 25 de Abril.

No ano de 2011, graduou-se em Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Federal de Sergipe, onde foi bolsista de extensão do Laboratório de Ecologia Vegetal entre os anos de 2008 a 2009. Em 2010, foi estagiária do Laboratório de Bacteriologia atuando também em projetos de extensão voltados para o ensino.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. Diversidade microbiana do solo	3
2.2. Metabólitos secundários	4
2.3. Vias biossintéticas da sintase de poliketídios (PKS) e da sintetase de peptídios não-ribossomal (NRPS)	6
2.4. Gênero <i>Bacillus</i>	8
2.5. Importância econômica dos fitopatógenos e perspectivas para seu controle.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta e processamento do solo.....	13
3.2. Cultivo e isolamento	13
3.3. Teste de antibiose e seleção dos antagonistas potenciais.....	14
3.4. Atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares dos isolados antagonistas	15
3.4.1. Teste de antagonismo em meio líquido.....	16
3.4.2. Teste de inibição do crescimento bacteriano.....	17
3.5. Sequenciamento do gene RNAr 16 S	17
3.6. Detecção de genes PKS-1 e NRPS	18
3.7. Análise estatística	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Isolamento e seleção de antagonistas potenciais	21
4.2. Identificação taxonômica dos isolados antagonistas	21
4.3. Efeito da atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares sobre o crescimento micelial fúngico	24
4.4. Efeito da atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares na inibição do crescimento bacteriano	30
4.5. Espectro de ação antimicrobiana dos antagonistas	32
4.6. Detecção dos genes PKS e NRPS.....	33
5. CONCLUSÕES.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito inibitório dos filtrados extracelulares dos isolados contra <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	26
Figura 2. Efeito inibitório dos filtrados extracelulares dos isolados contra <i>Plenodomus destruens</i>	29
Figura 3. Efeito inibitório dos filtrados extracelulares dos isolados contra <i>Xanthomonas campestris</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> selecionados para a amplificação de fragmentos dos genes NRPS e PKS-I	19
Tabela 2. Número total de isolados bioativos na seleção preliminar frente aos fitopatógenos fúngicos <i>Thielaviopsis paradoxa</i> e <i>Plenodomus destruens</i>	21
Tabela 3. Afiliação taxonômica dos isolados antagonistas provenientes de solos supressivos obtida por análises comparativas de sequências do gene RNAr 16S	22
Tabela 4. Espectro de ação antimicrobiana dos filtrados extracelulares dos isolados antagonistas em relação à inibição do crescimento de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> , <i>Plenodomus destruens</i> e <i>Xanthomonas campestris</i>	33
Tabela 5. Efeitos da presença de regiões homólogas aos genes PKS e NRPS nos genomas de bactérias antagonistas sobre o crescimento relativo dos patógenos <i>Thielaviopsis paradoxa</i> , <i>Plenodomus destruens</i> e <i>Xanthomonas campestris</i> , de acordo com análises de contrastes de médias.....	34

RESUMO

SANTOS, Deise Regina. **Isolamento e seleção de bactérias antagonistas a fitopatógenos e detecção de genes associados à produção de compostos bioativos**. Sergipe: UFS, 2014. 58p. (Dissertação-Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).

O solo é um ambiente estruturalmente complexo e um importante reservatório da diversidade microbiana. Somente uma pequena proporção desta diversidade tem sido recuperada e cultivada por técnicas convencionais, o que limita o acesso às informações genéticas e metabólicas desses micro-organismos. Bactérias do solo sintetizam uma ampla variedade de metabólitos secundários, em particular de antimicrobianos. Sintases de policetídeo (PKS) e da sintetases de peptídeo não-ribossomal (NRPS) têm se destacado como importantes sistemas enzimáticos para a biossíntese destes compostos. A detecção de genes associados com estes dois sistemas biossintéticos em isolados de bactérias é uma estratégia para a seleção de antagonistas com alta atividade de controle biológico. Diante disso, o objetivo deste estudo foi isolar e avaliar o potencial dos isolados quanto à atividade antagonista *in vitro* frente a fitopatógenos de interesse agrícola, e analisar em seus respectivos genomas a presença de genes associados à síntese de compostos bioativos. Métodos de pré-tratamentos das amostras de solo com cloramina T e fenol foram utilizados para o isolamento e seguidos por testes de antibiose qualitativos frente aos fitopatógenos fúngicos *Thielaviopsis paradoxa* e *Plenodomus destruens*. Filtrados extracelulares dos isolados selecionados nesta etapa foram quantitativamente avaliados a seguir quanto à capacidade de inibição de *T. paradoxa*, *P. destruens* e *Xanthomonas campestris*, e comparados com o ingrediente ativo de um biofungicida comercial. A afiliação taxonômica dos isolados antagonistas foi realizada com base nas sequências parciais do gene DNAr 16S. Para a detecção dos genes PKS e NRPS foram utilizados *primers* degenerados descritos na literatura. Dos 257 isolados bacterianos obtidos, a grande maioria foi pertencente ao gênero *Bacillus* ou outros proximamente afiliados. Destes, 84 (33%) foram inibitórios de ambos os fungos nos testes qualitativos. Quarenta e oito isolados bacterianos apresentaram filtrados extracelulares com efeitos inibitórios contra *T. paradoxa*, com oito destes com inibições de mais de 80% comparativamente ao controle sem filtrado. *P. destruens* foi inibido pelo filtrado extracelular de 63 isolados, dos quais 10 inibiram mais de 80% do crescimento deste patógeno. O extrato do isolado de *Bacillus* do biofungicida comercial apresentou forte inibição sobre *P. destruens* (95%), mas não afetou *T. paradoxa*. Trinta isolados antagonistas deste estudo não diferiram deste isolado comercial com relação à inibição do crescimento *in vitro* de *P. destruens* pelos extratos. Extratos de 27 isolados inibiram *X. campestris* (inibições entre 45 e 100% do crescimento), dos quais seis suprimiram totalmente o crescimento desta bactéria. A presença dos genes PKS ou a presença conjunta de genes de NRPS e PKS não foram associadas à ação inibitória dos isolados em relação ao crescimento relativo dos três fitopatógenos. Somente a presença do NRPS associou-se ao efeito sobre o crescimento relativo do *Thielaviopsis paradoxa*. O isolamento de bactérias com potencial bioativo promissor associado a experimentos em casa-de-vegetação e em campo que atestem a viabilidade do seu uso possibilitará a obtenção de novos agentes de biocontrole.

Palavras-chave: Antagonismo, compostos bioativos, controle biológico, *Plenodomus destruens*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Xanthomonas campestris*.

Comitê de orientação: Dr. Marcelo Ferreira Fernandes- Embrapa (Orientador) e Dra. Èrika Cristina Teixeira dos Anjos- Embrapa (Co-orientadora)

ABSTRACT

SANTOS, Deise Regina. **Isolation and selection of antagonists bacteria to phytopathogenic and detection of genes associated with the production of bioactive compounds**. Sergipe: UFS, 2014. 58p. (Dissertation-Master in Agriculture and Biodiversity).

Soil is a structurally complex environment and an important reservoir of microbial diversity. Only a small portion of this diversity has been recovered and cultured by conventional techniques, which limits the access to genetic and metabolic information in such microorganisms. Soil bacteria synthesize a wide variety of secondary metabolites, particularly of antibiotics. Polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthetase have been highlighted as important enzymatic systems for the biosynthesis of these compounds. The detection of genes associated with these two biosynthetic systems in bacterial isolates has become a strategy to screening for antagonists with high biological control activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate bacterial isolates for their in vitro antagonistic activity against plant pathogens of agricultural interest and to analyze their genomes for the presence of genes associated with the synthesis of bioactive compounds activity. Methods of soil sample pre-treatment with chloramine-T and phenol were used for selective isolation and followed by preliminary qualitative antibiosis tests of isolates against the fungal pathogens *Thielaviopsis paradoxa* and *Plenodomus destruens*. Extracellular extracts from isolates selected in this previous step were further evaluated for the in vitro antagonist potential against *Thielaviopsis paradoxa*, *Plenodomus destruens* and *Xanthomonas campestris* and compared with the active ingredient of a commercial biofungicide. The taxonomic affiliation of the antagonistic isolates was assessed by sequencing of 16S rDNA gene. For the detection of PKS and NRPS genes, degenerate primers described in the literature were used. Two hundred and fifty-seven bacterial isolates, in their majority belonging to the genus *Bacillus* or similar, were obtained. Out of those, 84 (33%) were simultaneously bioactive for both fungi in qualitative tests. Forty-eight bacterial isolates had extracellular extracts with inhibitory effects against *Thielaviopsis paradoxa*, with eight of these with inhibition $\geq 80\%$, when compared to the control. *Plenodomus destruens* was inhibited by the extracellular extracts of 63 isolates, of which 10 inhibited $\geq 80\%$ of this pathogen growth. The extract of a *Bacillus* isolate from a commercial biofungicide strongly inhibited *P. destruens* (95%), but had no effect on *T. paradoxa*. Thirty antagonistic isolates from this study did not differed from this commercial isolate regarding in vitro growth inhibition of *P. destruens* by their extracts of 27 isolates inhibited *X. campestris* (inhibition rates varying from 45 to 100%), of which six completely suppressed the growth of this bacteria. There was no relationship between either the presence of PKS genes or the joined occurrence of NRPS and PKS and the inhibitory action of the strains on the relative growth of the pathogens. Only the presence of NRPS genes was associated with the effect on the relative growth of *Thielaviopsis paradoxa*. The isolation of bacteria with promising bioactive potential associated with experiments at greenhouse and field attesting to the feasibility of its use, will enable the achievement of new biocontrol agents.

Keywords: Antagonism, bioactive compounds, biological control, *Plenodomus destruens*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Xanthomonas campestris*.

Guidance Committee: Dr. Marcelo Ferreira Fernandes-Embrapa (Major-Professor) e Dra. Èrika Cristina Teixeira dos Anjos- Embrapa (Co-Major Professor).

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente estruturalmente complexo constituindo um importante reservatório da diversidade microbiana. Os diferentes perfis dos solos favorecem a formação de microambientes específicos regulados por condições físico-químicas, as quais influenciam diretamente na diversidade dos micro-organismos. Entretanto, grande parte desta diversidade ainda permanece desconhecida, uma vez que a maioria dos micro-organismos não são recuperados e cultivados por técnicas convencionais.

Diversos fatores podem estar relacionados a não-culturabilidade dos micro-organismos presentes no solo, dentre os quais se destacam as dificuldades em simular as condições do ambiente natural. Os requerimentos nutricionais específicos, condições de temperatura, pH, interações intra e interespecíficas são fatores limitantes do crescimento em condições laboratoriais.

Bactérias do solo representam uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos. Estudos têm revelado que a combinação entre diferentes pré-tratamentos e meios seletivos tem permitido o isolamento de bactérias raras de habitats naturais e possivelmente, de novas fontes de compostos bioativos, entretanto não se pode desconsiderar o potencial bioativo de bactérias de cultivo comum.

O gênero *Bacillus* é amplamente distribuído no solo, e sua versatilidade metabólica permite a síntese de uma ampla variedade de compostos bioativos estruturalmente complexos, a exemplo dos antimicrobianos. Particularmente, as vias metabólicas da sintase policetídeo e da sintetase peptídeo não-ribossomal têm sido associadas à biossíntese desses compostos. A detecção de genes que codificam para essas vias tem constituído uma ferramenta adicional para a identificação de isolados que sintetizam esses compostos.

A atividade antagonica de um micro-organismo a partir da síntese de antimicrobianos tem sido uma estratégia de seleção massal de antagonistas potenciais para o controle de fitopatógenos. Avaliações *in vitro* e *in vivo* têm revelado a eficácia de espécies do gênero *Bacillus* spp. na supressão de diversos fitopatógenos agregada à síntese desses compostos.

Estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre supressividade natural dos solos e a presença de grupos antagonistas específicos. O isolamento de bactérias a partir desses solos pode possibilitar o acesso a agentes promissores de controle biológico.

Diante disso, o isolamento de bactérias de cultivo raro e comum a partir desses solos pode constituir em uma estratégia de seleção de novos antagonistas potenciais. O uso desses micro-organismos pode representar uma alternativa de controle, sobretudo em decorrência da

necessidade de cultivares resistentes e da observada redução da eficácia de muitos defensivos agrícolas, bem como dos problemas de ordem ambiental associados ao uso indiscriminado e prolongado destes.

Nesta perspectiva, o presente estudo teve por objetivo isolar e avaliar o potencial dos isolados quanto à atividade antagônica *in vitro* frente a fitopatógenos de interesse agrícola bem como detectar a presença de genes associados à síntese de compostos bioativos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Diversidade microbiana do solo

O solo é um ambiente altamente heterogêneo e estratificado, o que reflete diretamente na diversidade fisiológica e metabólica da sua biota (KELLER e ZENGLER, 2004). Sua extrema complexidade resulta da interação de vários parâmetros, a exemplo da textura, estrutura, teor de água, pH, variações climáticas e atividade biótica (ROBE *et al.*, 2003). Dessa forma, o solo compreende uma variedade de microambientes, com gradientes físico-químicos e condições ambientais descontínuos. Os micro-organismos apresentam elevada adaptabilidade a esses microambientes (TORSVIK e OVREAS, 2002), resultando na sua ampla diversidade.

A diversidade microbiana do solo é em grande parte desconhecida. Apenas uma pequena proporção da diversidade bacteriana total do solo (0,1-10%) pode ser recuperada e cultivada por técnicas convencionais (TORSVIK *et al.*, 1990). Estudos sugerem que uma parcela significativa (90-99%) dos micro-organismos do solo encontra-se em um estado fisiológico viável, mas não cultivável (RONDON *et al.*, 1999). As células entram nesse estado em resposta a condições de estresse, como uma estratégia de sobrevivência a condições adversas, a exemplo de temperaturas, concentrações de oxigênio e salinidade fora da faixa de crescimento (OLIVER, 2005).

Segundo Moran (2006) alguns micro-organismos em comunidades naturais são obrigatoriamente dependentes de outras espécies de organismos, o que explicaria o fato de apenas uma pequena parcela destes serem cultivados em laboratório. Para Kaeberlein *et al.*, (2002) os mecanismos de sinalização celular intraespecíficas no ambiente natural limitam o cultivo destes em meios artificiais. Baseado nas relações simbióticas, métodos de co-cultivo tem permitido o isolamento de bactérias de cultivo raro (SUBRAMANI e AALBERSBERG, 2013). Fatores como requerimentos nutricionais específicos, pH e temperatura também contribuem para o não-cultivo destes micro-organismos *in vitro*.

Estimativas revelam que um grama de solo pode conter aproximadamente 8,3 milhões de bactérias (GANS *et al.*, 2005). Segundo análises baseadas nos genes 16S RNAr a microbiota do solo é representada por 32 filos bacterianos, dentre os quais predominam

Proteobacteria, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* e *Firmicutes* (JANSSEN, 2006).

A microbiota do solo representa uma importante fonte de compostos biologicamente ativos (DONADIO *et al.*, 2002). A versatilidade metabólica dos micro-organismos do solo permite a síntese de uma variedade de metabólitos secundários, dentre os quais, os antimicrobianos são os mais bem estudados, com grande aplicabilidade na agroindústria (BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

A enorme diversidade de micro-organismos pode representar uma das mais abundantes fontes de novos antimicrobianos (KELLER e ZENGLER, 2004). Segundo Hunter-Cevera (1998) a diversidade microbiana bem como de seus metabólitos secundários são essenciais em processos biotecnológicos.

Diante disso, tem ocorrido um aumento no interesse acerca do conhecimento da diversidade microbiana em solos até então pouco explorados, uma vez que estes podem representar possivelmente o acesso a novos antimicrobianos. Neste sentido, os solos supressivos, que previnem naturalmente o estabelecimento de patógenos ou inibem as suas atividades patogênicas, têm se destacado, sobretudo em decorrência de relatos sobre a supressão destes a uma variedade de fitopatógenos (BETTIOL e GHINI, 2005). Segundo Mazzola (2002), os solos supressivos podem fornecer uma extensa fonte de agentes potenciais para o controle biológico.

2.2. Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos estrutural e quimicamente complexos que apresentam ampla atividade biológica, sendo não essenciais ao crescimento, mas requeridos em situações de estresse, em particular quando há o esgotamento de macronutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo (BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

Metabólitos secundários microbianos incluem antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, inibidores de enzimas, agentes imunomoduladores, antagonistas, agonistas, pesticidas, agentes tumorais e promotores de crescimento. As vias do metabolismo secundário são ativadas pela exaustão de nutrientes, diminuição da taxa de crescimento e adição de um indutor (DEMAIN, 1998).

Antibióticos sintetizados por micro-organismos exibem atividade antimicrobiana, antitumoral e antiviral, sendo produzidos na fase estacionária do crescimento (SENGUPTA *et*

al., 2013), na fase exponencial a síntese de metabólitos secundários ainda é baixa. Os antibióticos podem ser sintetizados ribossomicamente ou sem a participação direta dos ribossomos, configurando as vias biossintéticas das sintases de poliketídeos e sintetase de peptídeos não-ribossomais, respectivamente (TAMEHIRO *et al.*, 2002).

No habitat natural, as diversas comunidades microbianas existem em redes multicelulares que constituem um enorme reservatório de diferentes atividades metabólicas sob constante pressão seletiva, o que reflete diretamente na diversidade dos metabólitos secundários produzidos. Os antibióticos exercem efeitos específicos no ambiente natural sendo necessários para a sobrevivência do micro-organismo, uma vez que oferecem vantagem competitiva (SENGUPTA *et al.*, 2013).

In vitro, os requisitos ideais para a biossíntese de metabólitos secundários não são necessariamente idênticos àqueles do crescimento, sendo a sua otimização influenciada pelas condições de cultivo (KNIGHT *et al.*, 2003) como, por exemplo, alterações na composição do meio, aeração, além da introdução de inibidores enzimáticos (KURTBÖKE, 2012). Carvalho *et al.*, (2010) demonstraram a eficiente síntese *in vitro* de metabólitos secundários por espécies de *Bacillus subtilis* sob limitação de oxigênio, mas na presença de nutrientes essenciais como carbono e nitrogênio. Várias estratégias visando à otimização das condições de cultivo têm sido utilizadas para a melhoria dos processos industriais, proporcionando uma produção em larga escala e conseqüentemente a redução de custos para a comercialização do produto (DEMAIN, 2006).

Estudos demonstram que a síntese dos metabólitos pode ser regulada pela fonte de carbono introduzida no meio de cultura, o qual atua ativando ou reprimindo vias metabólicas associadas à biossíntese (RUIZ *et al.*, 2010). Grande parte desses metabólitos secundários não são sintetizados *in vitro*, uma vez que cerca de 90% dos genes biossintéticos não são expressos (TIWARI e GUPTA, 2012). Análises genômicas podem contribuir para a descoberta de novos metabólitos.

Ao longo das últimas quatro décadas, diversos estudos demonstraram que os metabólitos secundários, em particular os antibióticos produzidos por bactérias provenientes do solo ou associadas a plantas, são fatores-chave na supressão de fitopatógenos. A maioria das bactérias que atua no biocontrole apresenta um amplo espectro de atividade a partir da produção de múltiplos antibióticos, com diferentes graus de ação e que podem sobrepor-se (RAAIJMAKERS e MAZZOLA, 2012).

Inúmeros antibióticos têm sido isolados a partir de agentes de biocontrole representados por diferentes gêneros bacterianos (RAAIJMAKERS *et al.*, 2002). De acordo

com a origem biossintética, estes podem ser atribuídos a diferentes grupos a exemplo dos policetídeos, peptídeos não-ribossomais, ao híbrido policetídeo-peptídeo não-ribossomal, aminoglicosídeos, dentre outros (KANG *et al.*, 2012).

2.3. Vias biossintéticas da sintase de policetídeos (PKS) e da sintetase de peptídeos não-ribossomal (NRPS)

As rotas biossintéticas estão relacionadas à alta diversidade química dos produtos naturais. A especificidade bioquímica e elevada afinidade desses produtos a alvos biológicos têm gerado uma expectativa quanto à busca de novos antimicrobianos (MOLINARI, 2009).

As classes de compostos isolados a partir de micro-organismos incluem os policetídeos e os peptídeos não-ribossomais, os quais são sintetizados por complexos multienzimáticos denominados sintase de policetídeos (PKS) e sintetase de peptídeos não-ribossomal (NRPS), respectivamente.

Os policetídeos são metabólitos secundários estruturalmente complexos sendo produzidos por bactérias, fungos e plantas. As PKSs são complexos multienzimáticos que modulam a estrutura e função desses compostos, catalisando as etapas de alongamento da cadeia assim como as modificações ocasionadas pela adição de grupos funcionais. A ação dessas enzimas em conjunto ou uma expressão diferenciada de algumas delas resulta em diferentes classes de policetídeos (PASTRE *et al.*, 2007). Estudos sugerem que a expressão dessas enzimas em bactérias é regulada pelas condições de cultivo (UEKI *et al.*, 2013). Os policetídeos podem ser classificados em quatro grupos: aromáticos, macrolídeos, poliéteres e polienos. Estes compostos apresentam uma gama de aplicações como bactericidas, fungicidas e promotores de crescimento.

As PKSs podem ser classificadas em três tipos: PKS tipo I, tipo II e tipo III. Na PKS tipo I, os ciclos de extensão da cadeia e processamento do grupo ceto ocorrem dentro de domínios catalíticos de um polipeptídeo multifuncional. Estas se classificam ainda como iterativas ou modulares quando presentes em fungos e bactérias respectivamente. Na PKS tipo II as atividades enzimáticas ocorrem em proteínas separadas e dissociáveis. Quando o comprimento apropriado é atingido, a cadeia policeto resultante é submetida a uma única redução seguida por ciclização, aromatização e outras modificações pós-traducionais. Estas enzimas são muitas vezes referidas como PKS aromáticas, uma vez que a maioria dos metabólitos sintetizados é característico desse grupo. Na PKS tipo III os domínios catalíticos agem diretamente sobre precursores de acil-CoA, não utilizando proteínas transportadoras

(MOSS *et al.*, 2004). Análises moleculares a partir de amostras ambientais demonstraram que os genes PKS tipo I são em geral habitats específicos, sugerindo que o isolamento de micro-organismos de fontes pouco exploradas pode contribuir para a identificação de metabólitos bioativos inéditos (HILL *et al.*, 2014).

Peptídeos não-ribossomais são amplamente produzidos por bactérias, podendo atuar como substrato para a biossíntese de estruturas mais complexas e ainda serem incorporados como ácidos graxos ou policetonas (KLEINKAUF e VON DOHREN, 1996).

Um grande número de oligopeptídeos bioativos é produzido por bactérias e fungos por meio de um mecanismo não-ribossomal. As NRPS são grandes enzimas modulares referidas como sintetases peptídeos não-ribossomais, que catalisam a biossíntese de peptídeos de baixo peso molecular. São divididas em módulos, em que cada um destes é responsável pela incorporação de uma única unidade monomérica. Cada módulo é composto de domínios catalíticos, o de poliadenilação (A), a proteína transportadora de peptídeo (PCP) e o domínio de condensação (C). Um domínio adicional pode ser encontrado, o tioesterase (TE), responsável pela liberação do produto (KOPP e MARAHIEL, 2007). Todos estes complexos enzimáticos multimodulares realizam a iniciação, alongamento e terminação da cadeia (SHALIGRAM e SINGHAL, 2010). Vários metabólitos secundários importantes são sintetizados por essa via como antibióticos, a exemplo das polimixinas, cicloserinas, bacitracinas dentre outras (DEWICK, 2002).

Ferramentas da bioinformática têm permitido a identificação de genes PKS e NRPS em genomas bacterianos e de vias que codificam compostos químicos únicos (BODDY, 2014). Análises de 223 genomas bacterianos demonstraram que cerca de 50% destes contem pelo menos um dos genes que codificam para PKS ou NRPS, existindo uma correlação entre tamanho do genoma acima de 5Mb e o número total de pares de bases destes genes. Em termos de distribuição, as Actinobacteria e as γ -Proteobacteria contribuem com a maioria dos genes (DONADIO *et al.*, 2007). A atividade antimicrobiana de metabólitos associados a essas vias tem sido relatada por diversos autores (ARASU *et al.*, 2013; ARGUELLES-ARIAS *et al.*, 2009; WEBER *et al.*, 2003).

Estudos têm revelado a atuação desses compostos no controle de fitopatógenos. Chen *et al.*, (2009) demonstraram a eficiência de antibióticos sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 no antagonismo *in vitro* e na supressão *in vivo* de *Erwinia amylovora*, agente causal do fogo bacteriano. Análises genômicas de estirpes de *B. amyloliquefaciens* AS 43.3 associadas ao controle da fusariose do trigo identificaram a presença de sete clusters de genes biossintéticos das vias NRPS e PKS. A expressão *in vitro*

dos policetídeos e dos peptídeos não-ribossomais metabolicamente ativos (DUNLAP *et al.*, 2013) comprovaram a atividade antimicrobiana desses compostos contra o fitopatógeno.

A atividade antifúngica de estirpes de *Bacillus thuringiensis* relacionada à ação de antibióticos lipopeptídicos foi reportada por Abderrahmani *et al.* (2011). Kim *et al.*, (2004) relataram o antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* CMB26 associado à síntese de um antibiótico lipopeptídico contra um amplo espectro de fitopatógenos fúngicos.

Guo *et al.*, (2014) relataram o potencial de *Bacillus subtilis* NCD-2 no controle de *Rhizoctonia solani* a partir da correlação direta entre síntese da fengicina e atividade antagonica *in vitro* e supressão *in vivo* do fitopatógeno, agente causal do tombamento de plântulas de algodoeiro.

Mageshwaran *et al.*, (2012) ao caracterizar um lipopetídeo isolado a partir de *Paenibacillus polymyxa* HKA-15, observaram um amplo espectro de inibição *in vitro* contra os fitopatógenos bacterianos *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* M-5, *X. campestris* pv. *phaseoli* CP-1-1, *Xanthomonas oryzae* e *Ralstonia solanacearum*. Choi *et al.*, (2008) relataram o potencial antifúngico do peptídeo não-ribossomal fusaricidina isolado a partir da estirpe *Paenibacillus polymyxa* E681.

O mecanismo de biocontrole mediado pela expressão de genes PKS e NRPS tem se mostrado predominante na supressão de diversos fitopatógenos. Diante disso, a detecção desses genes corresponde a uma estratégia relevante para a seleção de bactérias antagonistas.

2.4. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é fenotípica e genotipicamente heterogêneo (SLEPECKY e HEMPHILL, 2006). Estes micro-organismos são gram-positivos, aeróbios e de ocorrência ubíqua, a sua capacidade de sobreviver em diversos ecossistemas é baseada na produção de endósporos, propriedades fisiológicas e, em particular na produção de antibióticos (HAMDACHE *et al.*, 2013). A produção de esporos favorece a sobrevivência destes micro-organismos em condições ambientais adversas, a exemplo de faixas de temperatura e pH extremos, escassez de nutrientes, dentre outros (DRIKS, 2004).

Espécies do gênero *Bacillus* são metabolicamente versáteis, o que permite a síntese de uma ampla variedade de compostos bioativos estruturalmente complexos, a exemplo dos policetídeos, lipopeptídeos, sideróforos e peptídeos (HAMDACHE *et al.*, 2011) de grande aplicabilidade biotecnológica.

A maior parte dos antibióticos sintetizados por espécies do gênero *Bacillus* são polipeptídeos não-ribossomais. *B. subtilis* sintetiza mais de duas dúzias de antibióticos (MANNANOV e SATTAROVA, 2001; SANSINENEA e ORTIZ, 2011). Em *Bacillus*, a produção de antibióticos é cepa-específico (STEIN, 2005). Análogos sintéticos destes têm sido descritos na literatura (ROBERTSON *et al.*, 2013).

A síntese de antibióticos com atividade antifúngica e antibacteriana, formação de esporos e ampla distribuição nos solos, os tornam excelentes candidatos a agentes de controle biológico (SANSINENEA e ORTIZ, 2011). A sua atividade antagônica tem sido constantemente associada à síntese de metabólitos secundários (ZHAO *et al.*, 2010). Embora, esses micro-organismos sejam portadores de uma multiplicidade de mecanismos de ação (ZHAO *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência de espécies do gênero *Bacillus* como agentes de controle biológico. Ashwini e Srividya (2014) relataram a redução *in vitro* de 65% na severidade da antracnose em pimenta pela atividade antagônica de *B. subtilis*. Kurabachew e Wydra (2013) em testes *in vivo* com *B. cereus* observaram uma redução na incidência da murcha bacteriana de 33,6% e 48,8% respectivamente em duas variedades do tomateiro. Dados semelhantes foram constatados por Lin *et al.*, (2014) em testes *in vivo*, com uma redução na incidência da murcha de fusário em pepino de 41 a 58% por estirpes de *Bacillus*. O amplo espectro de ação das substâncias antimicrobianas sintetizadas por micro-organismos do gênero *Bacillus* possibilita a utilização destes no controle de diversos fitopatógenos fúngicos e bacterianos.

Park *et al.*, (2013) relataram a indução da resistência sistêmica por estirpes de *Bacillus vallismortis* BS07 anteriormente já associadas à síntese de antibióticos. As estirpes foram eficientes na supressão *in vivo* dos fitopatógenos *Pectobacterium carotovorum*, *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum acutatum*, os quais estão relacionados a perdas significativas em culturas da pimenta. Segundo Kloepper *et al.*, (2004) espécies do gênero *Bacillus* que induzem a resistência sistêmica estão intimamente associadas a promoção de crescimento em plantas.

A fim de explorar o seu potencial como agentes de controle biológico, nos últimos anos tem se destacado o desenvolvimento e comercialização de formulações à base destes micro-organismos. Lahlali *et al.*, (2013) relataram a eficiência do biofungicida Seranade® (*Bacillus subtilis* QST 713) na supressão do *Plasmodiophora brassicae* em plantas de canola, com uma redução de 94 a 96% na severidade da doença. Os principais mecanismos de ação de *Bacillus subtilis* QST 713 são a competição por espaço, por nutrientes, e a antibiose por

meio da síntese de iturinas, surfactinas e agrastatinas que em sinergismo, inibem o crescimento dos tubos germinativos, a germinação dos esporos, podendo provocar a destruição da célula do patógeno (MARRONE, 2002). Produtos a base de *Bacillus* spp. correspondem a aproximadamente metade dos agentes bacterianos de biocontrole comercialmente disponíveis no mercado (FRAVEL, 2005).

2.5. Importância econômica dos fitopatógenos e perspectivas para seu controle

Perdas produtivas significantes no setor agrícola têm sido continuamente associadas à crescente incidência de fitopatógenos em culturas de importância econômica. No cenário nacional, diversos fitopatógenos fúngicos e bacterianos merecem destaque em função das extensas perdas econômicas ocasionadas e dificuldades de controle.

A produção de coco no Brasil está distribuída por quase todo território nacional, concentrando-se na região litorânea do Nordeste (FONTES *et al.*, 2000). A resinose do coqueiro foi registrada pela primeira vez no estado de Sergipe, na região do Platô de Neópolis no ano de 2004, sendo observada rápida disseminação a partir desse relato. A doença é ocasionada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* Höhn, o qual está associado a prejuízos significativos na cultura do coqueiro em todo o país. O fungo é um patógeno de ampla variedade de hospedeiros, existindo registros de incidência, além do coqueiro, em plantas de mais de 10 famílias diferentes (MAPA, 2014). Tem como principais sintomas, lesões escurecidas no tronco acompanhadas da liberação de um líquido de coloração marrom-avermelhado, o que pode acarretar na necrose gradual da planta (WARWICK e PASSOS, 2009). Segundo Ferreira *et al.* (2007), a disseminação da doença se dá através de insetos e solos contaminados. Relatos do aparecimento da doença pós-colheita têm sido descritos (PINHO *et al.*, 2013). Na literatura não existem registros de medidas de controle da doença.

No Brasil, a batata-doce é cultivada em todas as regiões, sendo que a maior produção concentra-se na região Sul, com 45% do total, entretanto a maior área cultivada encontra-se no Nordeste com destaque para o estado da Paraíba (PEREIRA *et al.*, 2011). Em Sergipe, a cultura é umas das principais fontes de renda para a agricultura familiar (MELO *et al.*, 2009).

A principal doença da cultura no Brasil é o mal-do-pé, causada pelo fungo *Plenodomus destruens* Harter, o qual pode ocasionar até 80% de perda em variedades susceptíveis (LOPES *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 2011). Em relação à disseminação, o patógeno cresce a partir de raízes contaminadas, infecta as brotações, de onde é propagado durante o transplante para o campo de cultivo. Ventos acompanhados de chuva, insetos,

ferramentas e roupas dos trabalhadores também podem disseminar conídios do patógeno (PEREIRA *et al.*, 2011). Os principais sintomas da doença são um cancro escuro de coloração variando de castanha a preta nas hastes localizadas próximas a região do colete, sendo a principal medida de controle o uso de cultivares resistentes (PEREIRA *et al.*, 2013). Estudos desenvolvidos por Truta *et al.*, (2000) destacaram a Alaô, Canelinha, Dodô e Princesa, resultados semelhantes em relação a esta última cultivar foi observada por Pereira *et al.*, (2013) sendo também relatada a resistência em Brazlândia Roxa e Beauregard. Segundo Xiao *et al.*, (2002) o controle eficaz de fitopatógenos fúngicos requer a integração de diferentes medidas.

Entre as bacterioses, pode-se destacar a podridão negra, cujo agente etiológico é a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pammel . Esta doença acomete culturas da família Brassicaceae, em particular das espécies de repolho e couve-flor (MARIANO *et al.*, 2001). No Brasil, a distribuição do patógeno é generalizada sendo encontrada praticamente em todas as regiões produtoras, cuja principal forma de disseminação ocorre por meio de sementes contaminadas (RODRIGUES-NETO e MALAVOLTA, 1995), podendo causar perdas totais em cultivares susceptíveis (MAPA, 2014). Os sintomas da doença são murcha e queima das folhas e em estágio avançado lesões na nervura principal com uma coloração marrom-clara. As principais medidas de controle são o tratamento de sementes com antibióticos ou tratamento térmico, uso de fungicidas e de cultivares resistentes (MARIANO *et al.*, 2001). Entre as cultivares, pode-se destacar a Master AG-325 (HENZ e MELO, 1994) e a Badger I-16 (JENSEN *et al.*, 2005).

O uso de defensivos agrícolas constitui a principal medida de controle, entretanto em função dos problemas ambientais atrelados ao uso intensivo destes, tem-se buscado alternativas mais eficazes, de menor custo e menos impactantes ao meio ambiente. Diante disso, o controle biológico tem se tornado uma possibilidade viável (ROMEIRO, 2005). Segundo Michereff *et al.*, (2005) o sucesso do controle biológico está no isolamento e seleção de antagonistas potenciais, em um curto período e com baixo custo. De acordo com Bettiol (1991) do ponto de vista ecológico, o sucesso de um antagonista depende da sua adaptabilidade ao habitat inserido. Dessa forma, faz-se necessário o conhecimento acerca da ecologia do antagonista uma vez que fatores edafo-climáticos podem ser limitantes à sua eficiência.

Baseado nas interações antagônicas, os principais mecanismos atuantes no biocontrole são: antibiose, competição por nutrientes e nichos ecológicos, parasitismo direto, proteção cruzada e indução de resistência intrínseca (ROMEIRO, 2005). Em particular, testes de

antibiose *in vitro* têm constituído uma estratégia de seleção massal de candidatos a agentes promissores. Estes se baseiam na interação em que um ou mais metabólitos sintetizados por um micro-organismo têm um efeito danoso sobre o outro, inibindo a germinação e crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (MICHEREFF *et al.*, 2005). Segundo Kupper *et al.*, (2003) micro-organismos que agem por antibiose, em geral, têm amplo espectro de ação, sendo a produção de substâncias antimicrobianas mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido.

Nos últimos anos tem havido um aumento do interesse na obtenção de formulações microbianas, embora no Brasil sejam poucos os produtos que chegam à escala comercial. Isso se deve à dificuldade no desenvolvimento do agente microbiano em quantidade suficiente para aplicação em grandes áreas cultivadas e em concentrações adequadas. Na comercialização de um produto deve-se levar em consideração a eficiência dos isolados, otimização das formulações, baixo custo, inocuidade ao ambiente, aplicação fácil e eficiente (SILVEIRA, 2001). Segundo Schisler *et al.*, (2004) a eficácia desses produtos depende da seleção de agentes potenciais, máxima produção de biomassa e viabilidade do ingrediente ativo. No Brasil, grande parte das formulações microbianas registradas e comercializadas tem como ingrediente ativo bactérias, geralmente importadas da Europa, Estados Unidos e Japão (LOPES, 2009).

O isolamento de bactérias com potencial bioativo promissor associado a experimentos em casa-de-vegetação e em campo que atestem a viabilidade do seu uso possibilitará a obtenção de novos agentes de biocontrole.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e processamento do solo

As amostras de solo com registro de supressividade natural a diferentes doenças foram coletadas em três municípios da região Agreste do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil: 1) Município de Bonito (Solo 1 – S1), em áreas sob cultivo de couve-chinesa e com de supressividade à rizoctoniose, murcha-de-fusário do feijão-caupi e murcha-de-fusário do tomateiro; 2) Camocim de São Félix (Solo 2 – S2), em áreas cultivadas com milho e supressividade à murcha-de-fusário do feijão-caupi e 3) Bezerros (Solo 3 – S3), em área com vegetação secundária supressiva à rizoctoniose e à murcha-de-fusário do feijão-caupi (ANDRIÓN, 2009).

As coletas foram realizadas no período de 14 a 16 de agosto de 2013, sendo as amostras acondicionadas em sacos plásticos de polietileno e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do solo (LMS) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, onde foram mantidas sob refrigeração a 4°C até o processamento. As amostras foram peneiradas com malhas de 2 mm de abertura e secas ao ar por 24 h.

3.2. Cultivo e isolamento

Para o cultivo e isolamento de bactérias foram utilizados dois protocolos descritos por Hayakawa e colaboradores (1997; 1995) com modificações.

No primeiro protocolo (Tratamento 1), 1g dos solos processados foram suspensos em 10mL de água destilada esterilizada contendo cloramina T a 1% com incubação a 30° C por 30 min. Posteriormente, uma alíquota de 0,5mL da suspensão foi transferida para 4,5mL da solução de tampão fosfato (5mM, pH 7,0), sendo serialmente diluída a 10^{-5} e 10^{-6} (HAYAKAWA *et al.*, 1997).

No segundo protocolo (Tratamento 2), 1g dos solos processados foram inicialmente macerados e depois submetidos ao aquecimento em estufa a 110°C por uma hora. Após este período, as amostras foram suspensas em 10mL de água destilada esterilizada contendo fenol a 1% com incubação a 30° C por 30 min. Uma alíquota de 0,5mL da suspensão foi transferida para 4,5mL da solução de tampão fosfato (5mM, pH 7,0), sendo serialmente diluída a 10^{-5} e 10^{-6} (HAYAKAWA *et al.*, 1995).

No controle (Tratamento 3), 1g dos solos processados foram suspensos em 10mL de água destilada esterilizada. Uma alíquota de 0,5mL da suspensão foi transferida para 4,5mL da solução de tampão fosfato (5mM, pH 7,0), sendo serialmente diluída a 10^{-5} e 10^{-6} .

Para todas as diluições obtidas nos diferentes tratamentos, uma alíquota de 100 µL foi inoculada pelo método de espalhamento em placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo seis diferentes meios de cultura, com composição original e diluições, sendo estes: M1) ISP2 (4,0g/L extrato de levedura; 10g/L extrato de malte; 4,0g/L dextrose) (PRIDHAM *et al.*, 1957); M2) ISP2 diluído 1:10, M3) ISP2 diluído 1:100, M4) VL55 (1,95g/L ácido 2-morfolinoetanossulfônico; 0,0493g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0441g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0264g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 1mL/L solução selenito tungstato; 1mL/L solução SL-10; 1mL/L solução de vitaminas 1; 3mL/L solução de vitaminas 2; 5mL/L xilana 5%) (SAIT *et al.*, 2002); M5) YMA (10,0g/L manitol; 0,5g/L K_2HPO_4 ; 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L NaCl; 0,5 g/L extrato de levedura) e M6) YMA diluído 1:10 (pH 6,0). Todos os meios de cultura citados foram solidificados com gelatina (Phytagel, Sigma) na concentração de 1,6%, e suplementados com cicloheximida (10µg/mL), com ajuste de pH 6,0. Posteriormente, as placas foram incubadas a 30°C por um mês, sendo realizadas leituras após 3 dias e 7dias, e a partir de então, a cada 7 dias. Para cada tratamento foram inoculadas 4 repetições (placas).

Após a leitura do 7°, 14° e 30° dias, isolados foram selecionados aleatoriamente e então repicados para novas placas contendo seus respectivos meios de origem. Após a purificação, os isolados foram preservados em meio inclinado (de origem) com óleo mineral a 4°C e em meio líquido com glicerol a 50% sendo armazenados nas temperaturas de -20°C e -80°C.

3.3. Teste de antibiose e seleção dos antagonistas potenciais

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados foi realizada uma seleção primária em meio sólido pelo método de dupla camada (SALAMONI *et al.*, 2010).

Os fitopatógenos utilizados foram os fungos *Thielaviopsis paradoxa* (TC-003) e *Plenodomus destruens* isolados respectivamente do estipe do coqueiro procedente da região do Platô de Neópolis e da batata doce da região de Nossa Senhora da Glória, ambos armazenados no banco do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Para reativação, estes foram transferidos para meio BDA (batata dextrose agar, pH 5,6), sendo então incubados em BOD a 26°C por 7 e 30 dias, respectivamente.

Para o preparo da suspensão fúngica, 5mL de Tween 0,05% foram adicionados às placas e com o auxílio de uma espátula esterilizada, o micélio foi raspado até que todo seu conteúdo se desprendesse, sendo o processo repetido por três ou quatro vezes. Posteriormente, o conteúdo foi filtrado em uma peneira esterilizada, sendo obtido o inóculo. Os conídios da suspensão foram contados em câmara de Newbauer e a concentração da suspensão foi ajustada para 10^6 conídios/mL.

Para a reativação das bactérias obtidas, uma alíquota de 100 μ L dos isolados preservados em glicerol foi inoculada em erlenmeyers contendo 20mL do meio YMA líquido com incubação sob agitação orbital (120rpm/30°C). Após o período de incubação, 1mL dos inóculos foi distribuído em eppendorfs, centrifugados (14000rpm/4°C por 5min) até a obtenção de um *pellet*, sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em água destilada esterilizada e posteriormente homogeneizado em vórtex. A densidade óptica (λ = 500 nm) do *pellet* ressuspensionado foi ajustada para 0,7. Uma alíquota de 10 μ L dos isolados foi inoculada em extremidades opostas (dois spots/placa) em placas contendo YMA, as quais foram incubadas a 30°C por 7 dias.

Para a avaliação dos isolados quanto à eficiência na inibição dos fungos fitopatogênicos, 9mL do meio BDA fundido acrescido de 1mL da suspensão fúngica contendo 10^6 conídios/mL foram vertidos em placas contendo 10mL de YMA inoculados previamente com os dois spots dos isolados-teste e dos controles (cicloheximida e água destilada esterilizada). Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD a 28°C por 72h. Após o período de incubação, a formação de halo de inibição foi observada, sendo este considerado como um indicativo de isolado com potencialidade antagonística.

3.4. Atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares dos isolados antagonistas

Os isolados que formaram halo de inibição na presença de ambos os fitopatógenos no teste qualitativo descrito no item anterior foram submetidos ao teste de antagonismo em meio líquido para fungos e de inibição em placas de microtitulação para bactérias.

Para a obtenção dos filtrados extracelulares, alíquotas de 100 μ L dos isolados preservados em glicerol foram inoculadas em erlenmeyers contendo 70mL do meio YMA (com o extrato de levedura 10X mais concentrado que a composição original) líquido, sendo os frascos submetidos à agitação orbital (120 rpm/30°C) por 7 dias. Após este período, 1mL do conteúdo líquido foi transferido para eppendorfs a fim de avaliar a densidade óptica (λ =

500 nm), sendo preestabelecido uma D.O >2,5 para a coleta dos filtrados bacterianos, a fim de assegurar que todos os isolados atingiram o crescimento estacionário.

Os inóculos que atingiram a leitura da D.O anteriormente estabelecida foram transferidos para tubos falcon esterilizados, centrifugados (14000 rpm/5 min), sendo o sobrenadante filtrado em membrana de nitrocelulose (TPP®) 0,22µm. Os filtrados obtidos foram armazenados a -20°C para posterior avaliação nos testes de antagonismo. Para fins comparativos utilizou-se como controle, isolados de *Bacillus pumilus* (estirpe QST 2808) obtidos de um fungicida comercial, sendo estes submetidos às mesmas condições citadas para obtenção dos filtrados bacterianos.

A fim de garantir a ausência de células livres, uma alíquota dos filtrados obtidos foi inoculada em placas de YMA para observação da presença de possíveis contaminantes.

3.4.1. Teste de antagonismo em meio líquido

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares, foram utilizados como micro-organismos alvo os fungos *Thielaviopsis paradoxa* e *Plenodomus destruens*. Alíquotas de 1mL dos filtrados bacterianos obtidos e 1mL da suspensão do micro-organismo alvo foram adicionados a erlenmeyers de 50mL contendo 5mL do caldo batata dextrose estéril (pH 5,1). A incubação foi realizada sob agitação orbital (120 rpm/28°C) durante 5 dias (VASCONCELLOS, 2008). O controle positivo correspondeu ao filtrado extracelular do *Bacillus pumilus* (comercial) acrescido da suspensão do fungo alvo, como controle negativo utilizou-se os meios caldo batata dextrose e YMA acrescidos da suspensão fúngica sem a adição dos filtrados extracelulares. Todos os tratamentos controle foram submetidos às mesmas condições descritas para os isolados teste.

Após o período de incubação, cada amostra foi filtrada em papel de filtro quantitativo de 9 cm. Anteriormente, os papéis de filtro a serem utilizados foram submetidos à secagem em estufa a 60°C por 48 h, seguida de pesagem em balança analítica. As amostras filtradas foram submetidas ao mesmo procedimento descrito acima. Todos os tratamentos foram realizados com 5 repetições(erlenmeyers).

O crescimento relativo foi avaliado por meio da diferença entre o peso do papel de filtro seco e da massa do filtrado fúngico, sendo esta expressa pela seguinte equação:

$$CR\% = \{1 - [(C - T) / C] \} \times 100$$

Em que CR% corresponde ao crescimento relativo ao controle, C é a massa micelial do controle negativo e T é a massa micelial na presença dos respectivos filtrados.

Nos tratamentos em que se observou inibição total, o pH foi aferido antes da filtração a fim de assegurar que este fator não influenciou no resultado obtido.

3.4.2. Teste de inibição do crescimento bacteriano

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos filtrados sobre o fitopatógeno bacteriano, foi utilizada a bactéria alvo *Xanthomonas campestris* 629 IBSBF proveniente da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas-SP. Esta foi recuperada em 70mL de caldo YM (3g/L extrato de levedura; 3g/L extrato de malte; 5g/L peptona; glicose 10g/L), pH6,0, contido em erlenmeyers de 125mL. O erlenmeyer foi incubado sob agitação orbital (100 rpm/ 28°C) por 24h e a densidade óptica ($\lambda = 500$ nm) do inóculo foi ajustada para 0,5.

Alíquotas de 42,5 μ L dos respectivos filtrados e do inóculo da *X. campestris* foram adicionados aos poços de placas para microtitulação, contendo 215 μ L do meio YM, com incubação a 28°C. Como controle negativo foi utilizado o meio YM estéril acrescido do inóculo do fitopatógeno sem a adição do filtrado extracelular, sendo este submetido à mesma condição descrita anteriormente, neste teste não se utilizou o filtrado do *Bacillus pumilus* (comercial).

As proporções (ou volumes) do filtrado, do inóculo do fitopatógeno e do meio YM foram semelhantes às utilizadas no teste com os fitopatógenos fúngicos. Todos os tratamentos foram realizados com 5 repetições (poços).

A inibição do crescimento bacteriano foi avaliada por meio das leituras da D.O em equipamento leitor de microplacas Expert Plus, realizadas 0, 15, 17, 19 e 21, 24 e 27h após a inoculação da *X. campestris*. Os dados avaliados corresponderam à variação observada na densidade óptica entre o tempo zero e as leituras após 21h de incubação, quando foi observado o final da fase logarítmica no crescimento bacteriano dos controles sem filtrado bacteriano.

3.5. Sequenciamento do gene RNAr 16 S

A afiliação taxonômica dos isolados antagonistas foi realizada com base nas sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas conforme descrição a seguir.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de Birnboim e Doly (1979) com modificações. Alíquotas de 100µL dos isolados em estoque foram inoculados em erlenmeyers contendo 20mL do meio YMA com incubação sob agitação orbital (120rpm/28°C) até a observação da turvação. As amostras foram centrifugadas (4000rpm/4°C/3min), sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* obtido ressuspensionado em 200µL de tampão GTE gelado. Posteriormente, foram adicionados 400µL da solução de NaOH (0,2N) 1% SDS com incubação à temperatura ambiente por 5min. Em seguida, foi acrescida uma alíquota de 300µL de acetato de potássio seguido de centrifugação (13000rpm/4°C/15min). Uma alíquota de 750µL do sobrenadante obtido na etapa anterior foi adicionada a 450 µL de isopropanol gelado, com centrifugação (13000rpm/4°C/15min) a fim de se obter um *pellet*. O *pellet* obtido foi lavado com 1mL de etanol a 70% gelado, sendo posteriormente centrifugado (13000rpm/4°C/1min). Os DNAs genômicos obtidos foram armazenados em 40µL de tampão TE (pH 8,0) sob temperatura de -20°C. Estes foram quantificados em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c).

O DNA extraído foi amplificado por PCR utilizando os *primers* 27F e 1488R (ADERIBIGBE *et al.*, 2011). As reações para PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo: 15,5µL de água ultrapura (Milli-Q); 2,5µL de Buffer; 1,25µL de MgCl₂; 0,5µL de dNTP; 1,0µL de cada *primer*; 0,25µL de Taq polimerase (Neotag); 3,0µL do DNA extraído.

A reação da PCR foi realizada em um termociclador Axygen, com a amplificação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 50°C por 1min, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 10min. Os produtos resultantes da PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio.

Os produtos da PCR foram purificados com o kit GE Healthcare Life Systems, sendo enviados para o sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco, Instituto de Biociências, USP. As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram comparadas às sequências de bactérias de referência depositadas nas bases de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

3.6. Detecção de genes PKS-1 e NRPS

Os isolados selecionados foram submetidos à pesquisa de genes PKS-1 e NRPS. Para isto, foi realizada a amplificação por PCR de sequências conservadas a partir da utilização de *primers* degenerados específicos descritos na literatura (PARSLEY *et al.*, 2011; SACIDO e GENNILOUD, 2005), (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* selecionados para a amplificação de fragmentos dos genes NRPS e PKS-I

Gene	Primer	Sequência 5'3'	Fragmento (pb)	Referência
NRPS	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	700	SACIDO e GENNILOUD, 2005
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGTA		
PKS-I	5LL	GGRTCNCIARYTGIGTICIGTICCTGIGC	750	PARSLEY <i>et al.</i> , 2011
	4UU	MGIGARGCIYTICARATGGAYCCICARCARMG		

As reações da PCR foram preparadas para um volume final de 25µL contendo: 2,5µL de DMSO 10% (dimetilsulfóxido); 11,5 µL de água ultrapura (Milli-Q); 2,5µL de Buffer; 1,25µL de MgCl₂; 1,0 µL de dNTP; 1,0 µL de cada *primer*; 0,25µL de Taq polimerase (Neotaq); 4,0 µL do DNA extraído.

As reações da PCR foram realizadas em um termociclador Axygen nas seguintes condições: para o par A3F/A7R: 5 min a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 2 min a 59°C, 4 min a 72°C, com uma extensão final por 10 min a 72°C (SACIDO e GENNILOUD, 2005). Desnaturação por 2 min a 95°C, seguido de 14 ciclos (95°C por 30 seg, anelamento a 63°C (-1°C por ciclo) por 30 seg, e 72°C por 1min), mais 30 ciclos de amplificação (95°C por 30 seg, 50°C por 30 seg e 72°C por 1 min), com extensão final por 5 min a 72°C para o par 5LL/4UU (PARSLEY *et al.*, 2011).

Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) sendo corado com brometo de etídio, a fim de confirmar a amplificação das regiões gênicas de interesse.

3.7. Análise estatística

Para comparar o efeito dos filtrados das bactérias antagonistas sobre os fitopatógenos tanto em relação ao controle (sem filtrados bacterianos) quanto para o filtrado do *Bacillus* comercial foi utilizado o teste de Dunnet ($p < 0,05$), programa estatístico S-Plus (4.0).

Para avaliar a associação entre efeito inibitório dos filtrados bacterianos e a presença de regiões homólogas aos genes para NRPS e PKS foram utilizados testes de análises de contrastes ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e seleção de antagonistas potenciais

Foi isolado um total de 257 bactérias, destas 40% (102) foram provenientes do solo 2, 31% (80) do solo 1 e 29% (75) do solo 3. Em relação aos tratamentos, o maior número de isolados (56%) foi oriundo do tratamento com cloramina T (T1), sugerindo que este foi mais eficiente na recuperação dos isolados.

A partir do teste qualitativo de dupla camada foi possível observar que 33% (84) do total de isolados apresentaram-se bioativos simultaneamente a ambos os fungos, *T. paradoxa* e *P. destruens*. Testes de antibiose *in vitro* têm demonstrado eficácia na seleção de candidatos a antagonistas potenciais (LI *et al.*, 2012; ROCHA e MOURA, 2013; ZHAO *et al.*, 2013). Dentre os isolados bioativos, 63% (53) e 12% (10) do total foram provenientes do tratamento com cloramina T e fenol respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de isolados bioativos na seleção preliminar frente aos fitopatógenos fúngicos *Thielaviopsis paradoxa* e *Plenodomus destruens*.

Amostra	Nº de isolados bioativos*	Nº de isolados bioativos/pré-tratamento		
		CloraminaT	Fenol	Controle
Solo 1	27	16	3	8
Solo 2	36	25	2	9
Solo 3	21	12	5	4
Total	84	53	10	21

*Atividade antagonista frente aos fitopatógenos fúngicos *Thielaviopsis paradoxa* e *Plenodomus destruens*.

Estudos têm revelado a eficiência de bactérias isoladas a partir de solos supressivos na redução da incidência de doenças ocasionadas por fitopatógenos fúngicos (ALABOUVETTE, 1999; LARKIN *et al.*, 1996; SCHER e BAKER, 1980). Diante disso, é possível sugerir que os isolados obtidos no presente estudo podem constituir novos e candidatos promissores a antagonistas.

4.2. Identificação taxonômica dos isolados antagonistas

Os 84 isolados antagonistas selecionados na etapa preliminar do teste qualitativo de

dupla camada foram afiliados à família *Bacillaceae* (86%), *Staphylococcaceae* (6%), *Paenibacillaceae* (1%) e *Moraxellaceae* (1%) (Tabela 3). Em relação aos tratamentos utilizados, os resultados obtidos no presente estudo diferiram dos observados por Hayakawa *et al.*, (1997) e Hayakawa *et al.*, (1995), que ao utilizarem os pré-tratamentos cloramina T e fenol em solos sob cultivo de legumes, milho, arroz e solo de floresta respectivamente relataram uma predominância de membros da família *Streptosporangiaceae* (75%) e *Thermomonosporaceae* (65%) entre seus isolados. Entretanto, ao se levar em consideração o critério de seleção do estudo no que se refere à atividade antagônica dos isolados, os resultados obtidos foram similares aos de Todorova e Kozhuharova (2010) que ao utilizarem um solo sob cultivo (terra preta) sem pré-tratamento, observaram uma predominância de *Bacillus* spp. entre os antagonistas com um percentual de 81,8% do total.

Embora a família *Bacillaceae* seja amplamente distribuída nos solos, em geral a sua dominância não é encontrada em estudos de isolamentos. Alguns fatores podem ser atribuídos a essa predominância, a exemplo da formação de endósporos que pode ter favorecido o isolamento destes micro-organismos em detrimento de outros durante a etapa de utilização dos pré-tratamentos.

Estudos têm demonstrado uma correlação significativa entre a supressividade do solo e a predominância de populações antagonistas específicas (ALVARADO *et al.*, 2007; POSTMA *et al.*, 2008). Segundo Weller *et al.*, (2002) *Bacillus* spp. predomina entre os gêneros bacterianos com potencial antagonista contra fitopatógenos diversos, o que também pode justificar os resultados obtidos no estudo.

Embora os métodos utilizados visassem o isolamento de bactérias de cultivo raro, foi possível observar uma dominância de bactérias pertencentes a famílias já extensivamente descritas na literatura. Vale ressaltar a alta similaridade de alguns dos isolados obtidos no estudo com a espécie *Bacillus toyonensis*, recentemente descrita por Jiménez *et al.*, (2013), a qual esta intimamente associada ao grupo do *Bacillus cereus*. O isolamento de bactérias de raro cultivo pode representar a acessibilidade a novas fontes de compostos bioativos que podem ser eficazes para o controle de fitopatógenos.

Tabela 3. Afiliação taxonômica dos isolados antagonistas provenientes de solos supressivos obtida por análises comparativas de sequências do gene RNAr 16S

Isolado	Sequência com máxima similaridade*	Similaridade (%)	Família afiliada
DT-1	<i>Bacillus aerius</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>

DT-2	Não-identificado		
DT-3	<i>Bacillus tequilenses</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-5	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-8	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99%	<i>Paenibacillaceae</i>
DT-9	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-12	<i>Bacillus tequilenses</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-14	<i>Bacillus tequilenses</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-24	Não-identificado		
DT-25	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-27	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	<i>Bacillaceae</i>
DT-29	<i>Bacillus cereus</i>	92%	<i>Bacillaceae</i>
DT-34	<i>Bacillus anthracis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-37	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-40	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-42	<i>Bacillus toyonensis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-48	<i>Bacillus toyonensis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-56	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-57	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-60	<i>Bacillus cereus</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-61	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-63	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	<i>Bacillaceae</i>
DT-65	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-68	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-69	<i>Bacillus tequilensis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-72	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-73	<i>Bacillus tequilensis</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-74	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-76	<i>Bacillus cereus</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-77	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-79	<i>Bacillus toyonensis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-80	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-85	<i>Bacillus subtilis</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-86	Não-identificado		
DT-90	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-95	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98%	<i>Staphylococcaceae</i>
DT-98	<i>Bacillus tequilensis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-100	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-106	<i>Bacillus cereus</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-110	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-111	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-114	<i>Bacillus cereus</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-115	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-116	<i>Bacillus cereus</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-117	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-119	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-120	<i>Bacillus cereus</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-122	Não-identificado		
DT-129	<i>Bacillus toyonensis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-130	<i>Bacillus toyonensis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-134	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-136	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-137	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-147	<i>Bacillus toyonensis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-150	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-153	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>

DT-157	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-164	<i>Bacillus metylotrophicus</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-165	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-169	<i>Bacillus tequilensis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-170	<i>Bacillus toyonensis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-175	Não-identificado		
DT-177	<i>Bacillus tequilensis</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-180	<i>Acinetobacter pittii</i>	97%	<i>Moraxellaceae</i>
DT-186	<i>Bacillus tequilensis</i>	95%	<i>Bacillaceae</i>
DT-189	<i>Bacillus subtilis</i>	96%	<i>Bacillaceae</i>
DT-190	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-192	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	95%	<i>Staphylococcaceae</i>
DT-194	<i>Bacillus subtilis</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-202	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-206	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98%	<i>Staphylococcaceae</i>
DT-207	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-210	<i>Bacillus subtilis</i>	82%	<i>Bacillaceae</i>
DT-212	<i>Bacillus pseudomyoides</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-213	<i>Bacillus tequilensis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-214	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-216	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-217	<i>Staphylococcus warneri</i>	97%	<i>Staphylococcaceae</i>
DT-222	<i>Staphylococcus warneri</i>	98%	<i>Staphylococcaceae</i>
DT-223	<i>Bacillus aryabhattai</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-243	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-245	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-253	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-255	<i>Bacillus toyonensis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>

*Similaridade com sequências do banco de dados do NCBI.

4.3. Efeito da atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares sobre o crescimento micelial fúngico

Ao avaliar o efeito dos filtrados extracelulares sobre o crescimento relativo do *Thielaviopsis paradoxa* foi possível observar que dentre os 78 filtrados-teste, 48 diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle (sem filtrado bacteriano), com percentuais de inibição que variaram no intervalo entre 60-80% e percentuais $\geq 80\%$ (Figura 1). O pH desses tratamentos variou de 6,5 a 7,0 assegurando que o resultado observado não foi influenciado por um decréscimo deste.

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que os filtrados apresentaram potencial antifúngico. O potencial antifúngico de espécies do gênero *Bacillus* spp. tem sido constantemente associado à síntese da iturina, surfactina e fengicina (ARREBOLA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014). A atividade antifúngica de *Paenibacillus* spp. é relacionada à síntese da fusaricidina A, B, C e D (RAZA *et al.*, 2009). *Bacillus* spp. e gêneros afins têm

sido reconhecidos como potenciais agentes de controle pela síntese de um amplo espectro de antibióticos peptídicos ativos contra vários micro-organismos (GOVINDASAMY *et al.*, 2011). Estudos adicionais serão realizados posteriormente a fim de identificar os compostos bioativos do presente estudo.

No que se refere aos isolados em que seus respectivos filtrados não apresentaram atividade antifúngica (38%), sugere-se que a síntese de metabólitos bioativos observada no teste preliminar de dupla camada pode estar associada a polímeros da parede celular (CHOI *et al.*, 2008), ou à produção de enzimas, a exemplo das quitinases (MAVINGUI e HEULIN, 1994), os fatores de cultivo também podem ter influenciado neste resultado.

Entre os filtrados que diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle (sem filtrado bacteriano), os mais eficientes na inibição do crescimento relativo do *Thielaviopsis paradoxa* com percentuais acima de 95% foram DT-8, DT-9 e DT-40 (Figura 1). Estes resultados foram similares aos observados por Alvindia e Natsuaki (2009) ao avaliarem o efeito dos filtrados extracelulares de *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Thielaviopsis paradoxa*. Alvindia (2013) ao avaliar o efeito da cultura líquida de *Bacillus* spp. sobre o crescimento *in vitro* do fungo constatou taxas de 46% de inibição. A divergência entre estes resultados pode estar associada ao maior efeito antagônico dos isolados de *Bacillus* spp. por antibiose.

No que se refere ao efeito do filtrado *Bacillus pumilus* QST 2808 (comercial) sobre o crescimento relativo do fitopatógeno constatou-se que este não apresentou efeito significativo em relação ao controle (sem filtrado bacteriano). Corroborando com os resultados do presente estudo, Venturini *et al.*, (2014) verificaram que os metabólitos secundários da estirpe não apresentaram efeito inibitório *in vitro* sobre o crescimento do *Thielaviopsis paradoxa*. Segundo Bettiol *et al.*, (2012) *Bacillus pumilus* QST 2808 produz açúcares aminados com ação antifúngica, os quais competem com as enzimas envolvidas na formação da membrana celular do patógeno e com isso, inibem a formação de novas células.

Dentre os filtrados testados, 44 apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) em relação ao *Bacillus pumilus* (comercial), com percentuais de inibição mais eficientes, com destaque para os filtrados DT-40, DT-9 e DT-8 (Figura 1). Vale ressaltar que a maioria destes isolados apresentou alto grau de similaridade com *Bacillus subtilis*, espécie extensamente descrita na literatura pela ampla síntese de antibióticos (TODOROVA e KOSHUHAROVA, 2010).

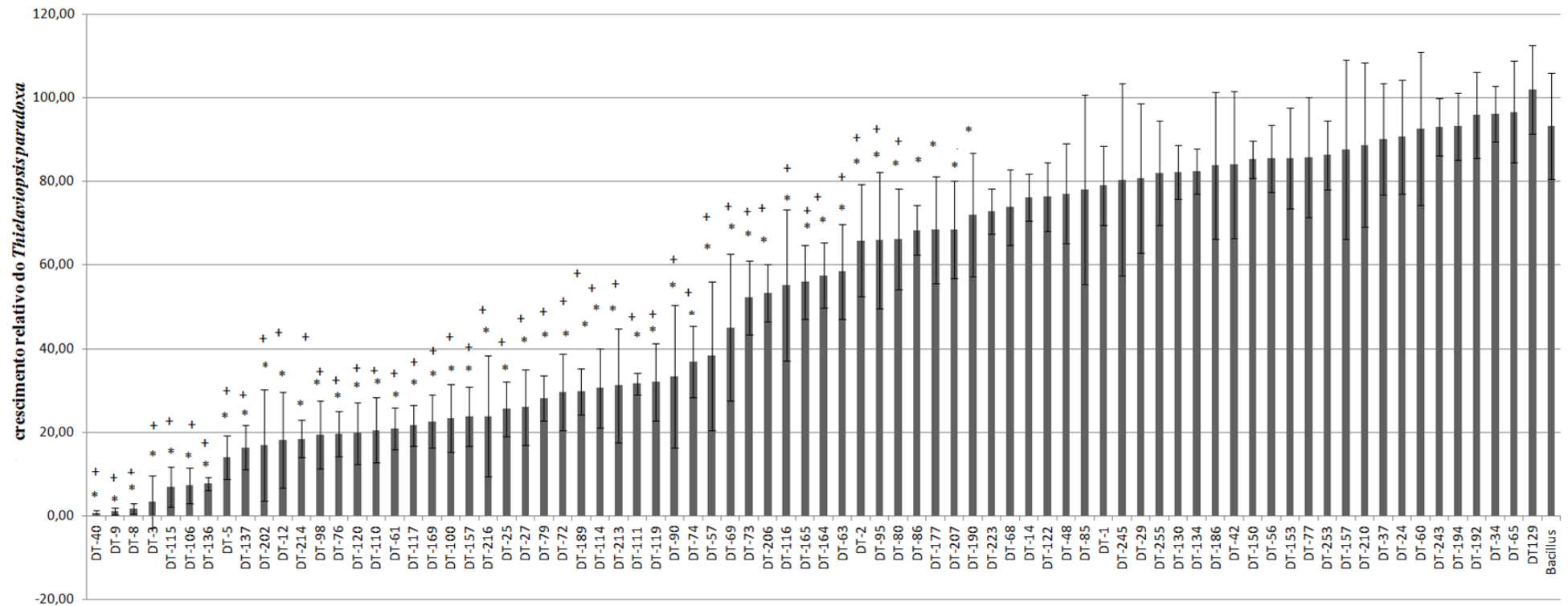


Figura 1. Efeito inibitório dos filtrados extracelulares dos isolados contra *Thielaviopsis paradoxa*. Os resultados representam a % de inibição do crescimento em relação ao controle negativo (sem filtrado bacteriano), como controle positivo foi utilizado o filtrado extracelular do *Bacillus pumilus*. Médias seguidas de * diferem do controle negativo (sem filtrado bacteriano) pelo teste de Dunnet com $p < 0,05$; Médias seguidas de + diferem do controle positivo (*Bacillus pumilus* comercial) pelo teste de Dunnet com $p < 0,05$.

Embora a alta eficiência *in vitro* observada nem sempre reflita em resultados de controle consistentes no ambiente natural, estes podem constituir em um indicativo de candidatos promissores ao controle do fitopatógeno. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2014) não há registros de defensivos agrícolas para o controle da resinose. O uso equivocado e indiscriminado destes para o controle do fitopatógeno pode ocasionar uma série de problemas ambientais, a exemplo do desequilíbrio ecológico, perda de micro-organismos benéficos, resistência do patógeno, contaminação de mananciais, dentre outros. Dessa forma, a busca por agentes de controle biológico pode representar uma alternativa ao uso desses compostos.

Estudos têm apontado que a introdução de espécies do gênero *Bacillus* e similares apresenta um efeito menor sobre a estrutura e função da comunidade microbiana do solo quando comparado com o uso de fungicidas, e que estas diferenças podem ser atribuídas aos baixos níveis de persistência ambiental e efeito tóxico desses micro-organismos (CORREA *et al.*, 2009).

Segundo Pérez-García *et al.* (2011), a eficácia na proteção por agentes de controle depende do estabelecimento adequado destes na planta hospedeira, sendo este um desafio para o biocontrole (KUPPER *et al.*, 2003). A síntese de lipopeptídeos por *Bacillus* spp. pode influenciar na adaptação do micro-organismo, contribuindo para a sua colonização e persistência (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011).

Na avaliação do efeito dos filtrados extracelulares sobre o crescimento relativo do *Plenodomus destruens* verificou-se que dentre os 78 filtrados testados, 62 diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle (sem filtrado bacteriano), com percentuais de inibição que variaram de 80 a 100% (Figura 2). Entre estes filtrados, destacam-se com um percentual de inibição total, os filtrados DT-3 e DT-114. Assim como para o fungo anteriormente submetido ao teste, o pH desses tratamentos variou de 6,5 a 7,0 confirmando a ação antagonica dos filtrados extracelulares das culturas.

Ao contrário do observado para o fungo *T. paradoxa*, o filtrado do *Bacillus pumilus* QST 2808 (comercial) apresentou efeito antagonico significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle (sem filtrado bacteriano), com um percentual de inibição $> 90\%$.

O efeito de 27 filtrados extracelulares não diferiu significativamente ($p < 0,05$) do efeito antagonico de *B. pumillus* (comercial) em relação ao crescimento relativo do *P. destruens* (Figura 2). Diante do resultado observado, pode-se inferir que estes filtrados se comportam, em termos de taxas de inibição *in vitro*, de maneira semelhante ao isolado *B. pumillus*, proveniente de um produto comercial. Na literatura não existem dados sobre o uso de

bactérias para o controle do fitopatógeno, dessa forma estes podem constituir em um prognóstico para prováveis antagonistas.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014) não existem fungicidas registrados para o controle do mal-do-pé da batata-doce. Estudos atuais concentram-se na busca por cultivares resistentes à ação do patógeno (TRUTA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2013), embora estes nem sempre atendam a finalidade de plantio.

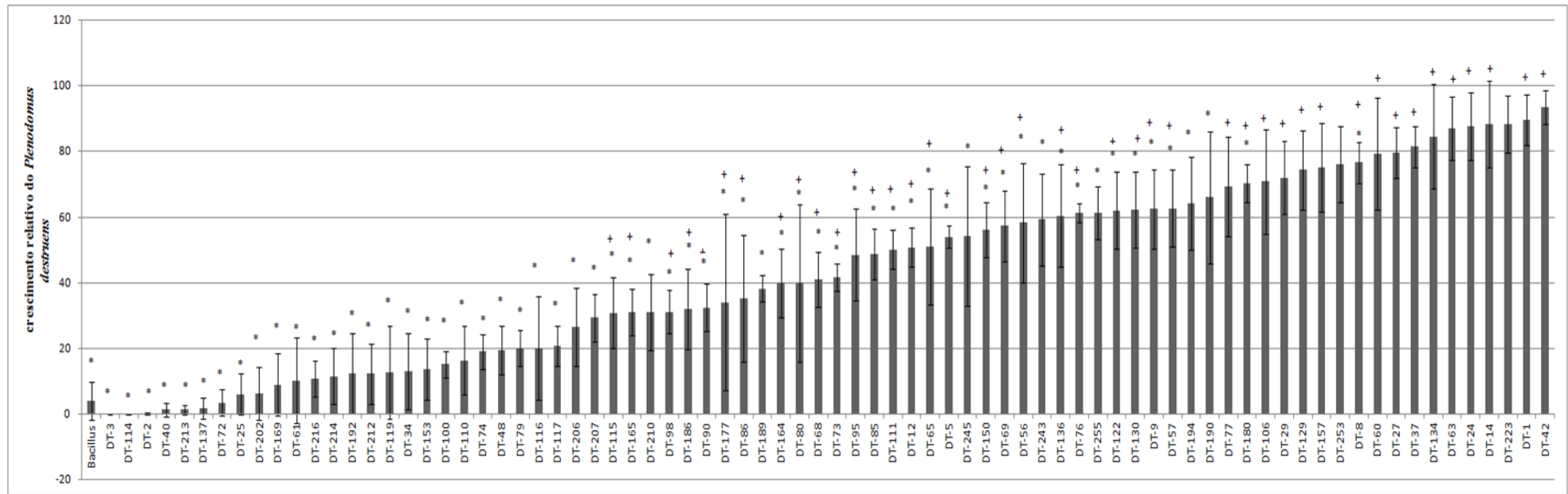


Figura 2. Efeito inibitório dos filtrados extracelulares dos isolados contra *Plenodomus destruens*. Os resultados representam a % de inibição do crescimento em relação ao controle negativo (sem filtrado bacteriano), como controle positivo foi utilizado o filtrado extracelular do *Bacillus pumilus*. Médias seguidas de * diferem controle negativo (sem filtrado bacteriano) pelo teste de Dunnet com $p < 0,05$; Médias seguidas de + diferem do controle positivo (*Bacillus pumilus* comercial) pelo teste de Dunnet com $p < 0,05$.

4.4. Efeito da atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares na inibição do crescimento bacteriano

Ao avaliar o efeito dos filtrados extracelulares sobre o crescimento relativo da *Xanthomonas campestris* foi possível constatar que dentre os 78 filtrados testados, 27 diferiram significativamente ($p < 0.05$) em relação ao controle (sem filtrado bacteriano), com percentuais de inibição que variaram de 45 a 100% (Figura 3).

Esses resultados corroboram o potencial antibacteriano dos filtrados das culturas. Em *Bacillus* spp. o potencial antibacteriano é associado à produção da difícidina, bacilicina e bacitracina (AMIN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2009). A atividade antibacteriana de *Paenibacillus* spp. é relacionada à síntese da polimixina (NIU *et al.*, 2013).

Entre os filtrados testados, destacaram-se o DT-114, DT-74, DT-8, DT-90 com um percentual de inibição total em relação ao controle, a predominância de espécies com máxima similaridade com *Bacillus subtilis* entre os respectivos isolados, atesta a eficiência destes na síntese de antibióticos já descritos na literatura (KUNST *et al.*, 1997). Os resultados obtidos foram similares aos descritos por Mishra e Arora (2012) Mageshwaran *et al.*, (2012) ao utilizarem filtrados extracelulares de *Bacillus* spp. contra a *Xanthomonas campestris*. Entretanto, Wuulf *et al.*, (2002) ao realizarem testes com os filtrados extracelulares e os antibióticos surfactina, acivina e iturina isolados a partir de *Bacillus* spp. não observaram inibição do crescimento da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Yoshida *et al.*, (2001) constataram uma alta eficiência dos filtrados extracelulares de *B. amyloliquefaciens* endofíticos na inibição *in vitro* da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Vale ressaltar o efeito eficiente do filtrado DT-79, com máxima similaridade com o *Bacillus toyonensis*, espécie recentemente descrita (JIMÉNEZ *et al.*, 2013). Estudos adicionais serão realizados a fim de identificar os compostos bioativos isolados a partir deste micro-organismo.

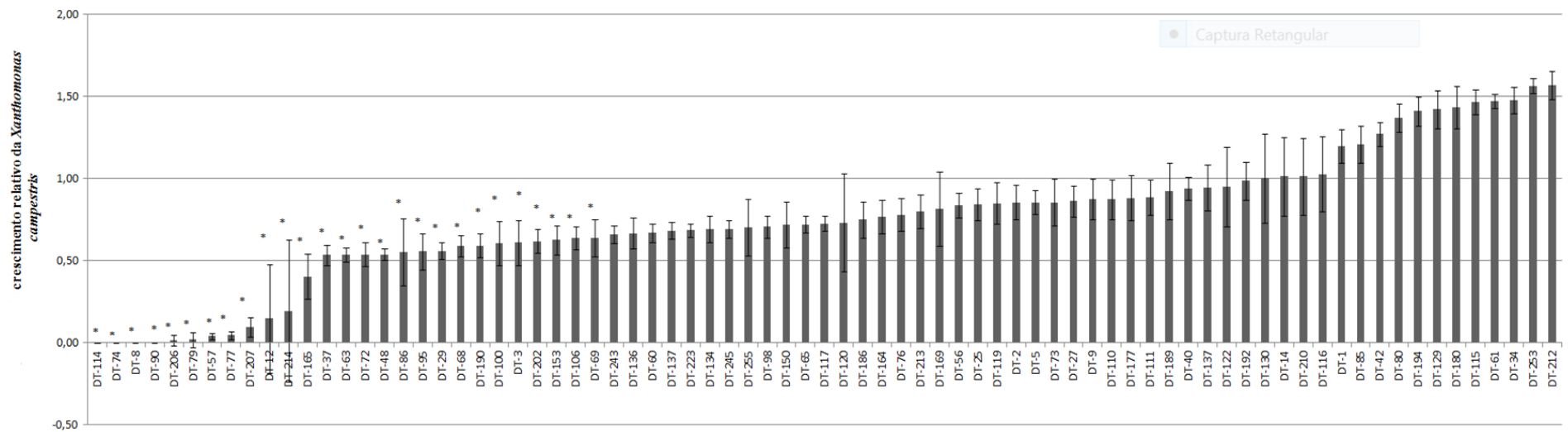


Figura 3. Efeito inibitório dos filtrados extracelulares dos isolados contra *Xanthomonas campestris*. Os resultados representam a % de inibição do crescimento em relação ao controle negativo (sem filtrado bacteriano). Médias seguidas de * diferem controle negativo (sem filtrado bacteriano) pelo teste de Dunnet com $p < 0,05$

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014) o tratamento preventivo de sementes com uso de antibióticos tem sido uma possibilidade de controle da podridão negra, assim como a aplicação de fungicidas cúpricos para proteção no campo. O tratamento de sementes com hipoclorito de cálcio, na concentração de 0,5% por 15 minutos, tem apresentado resultados satisfatórios. Diante dos resultados obtidos quanto à eficiência dos isolados na inibição do crescimento do fitopatógeno, sugerem-se estudos adicionais que atestem a viabilidade do uso desses micro-organismos em condições naturais, uma vez que estes podem constituir uma medida preventiva ao uso de compostos químicos.

4.5. Espectro de ação antimicrobiana dos antagonistas

Em alguns dos filtrados extracelulares com efeito antagônico significativo em relação ao controle (sem filtrado bacteriano) e alta eficiência inibitória ($\geq 70\%$) foi possível verificar que estes apresentaram um espectro de ação antimicrobiano a pelo menos dois dos fitopatógenos testados (Tabela 4).

Os filtrados DT-3, DT-25, DT-40, DT-61, DT-100, DT-110, DT-137, DT-169, DT-202 e DT-216 demonstraram atividade antimicrobiana somente aos fitopatógenos fúngicos, sugerindo que os isolados correspondentes sintetizam apenas compostos antifúngicos, ou que a síntese de compostos antibacterianos é baixa. Os filtrados que apresentaram potencial antifúngico e antibacteriano simultaneamente foram DT-8, DT-12, DT-74, DT-79, vale destacar o DT-114 e DT-214 com efeito antimicrobiano frente aos três fitopatógenos. A síntese de múltiplos compostos bioativos por bactérias do solo bem como a ação sinérgica destes têm sido relatado como um fator preponderante na supressão de fitopatógenos (LI *et al.*, 2012).

Tabela 4. Espectro de ação antimicrobiana dos filtrados extracelulares dos isolados antagonistas em relação à inibição do crescimento de *Thielaviopsis paradoxa*, *Plenodomus destruens* e *Xanthomonas campestris*

Isolado	Inibição do crescimento*		
	<i>T. paradoxa</i>	<i>P. destruens</i>	<i>X. campestris</i>
DT-3	+	+	-
DT-8	+	-	+
DT-12	+	-	+
DT-25	+	+	-
DT-40	+	+	-
DT-61	+	+	-
DT-74	-	+	+
DT-79	-	+	+
DT-100	+	+	-
DT-110	+	+	-
DT-114	+	+	+
DT-137	+	+	-
DT-169	+	+	-
DT-202	+	+	-
DT-214	+	+	+
DT-216	+	+	-

Com efeito inibitório (+), sem efeito inibitório (-)

4.6. Detecção dos genes PKS e NRPS

Ao analisar a relação entre presença dos genes NRPS, PKS ou do efeito aditivo NRPS-PKS nos isolados com efeito inibitório sobre o crescimento relativo dos fitopatógenos *Thielaviopsis paradoxa*, *Plenodomus destruens* e *Xanthomonas campestris* foi possível observar que a presença dos genes PKS ou do aditivo NRPS-PKS não apresentou efeito significativo sobre o crescimento de nenhum dos três patógenos (Tabela 5).

O gene NRPS apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) em relação à inibição do crescimento do *Thielaviopsis paradoxa*, demonstrando a associação deste gene à atividade

antagônica frente ao fitopatígeno. Segundo Hamdache *et al.*, (2013) a síntese de antibióticos por *Bacillus* spp. está intimamente associada a via da sintetase peptídeo não-ribossomal.

Tabela 5. Efeitos da presença de regiões homólogas aos genes PKS e NRPS nos genomas de bactérias antagonistas sobre o crescimento relativo dos patógenos *Thielaviopsis paradoxa*, *Plenodomus destruens* e *Xanthomonas campestris*, de acordo com análises de contrastes de médias.

Efeitos comparados (Contraste)	Isolados antagonistas	Média (Erro Padrão) do crescimento relativo ¹		
		<i>T. paradoxa</i>	<i>P. destruens</i>	<i>X. campestris</i>
Presença de PKS²	Com PKS	45,2 (4,82)	45,0 (4,93)	63,4 (6,04)
$[\mu_{\text{com PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, com NRPS}}]/2 - [\mu_{\text{sem PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{sem PKS, com NRPS}}]/2$	Sem PKS	59,0 (5,31)	43,7 (4,04)	78,7 (7,14)
	p*	ns**	ns	ns
Presença de NRPS³	Com NRPS	42,4 (4,72)	42,5 (4,68)	67,4 (5,56)
$[\mu_{\text{sem PKS, com NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, com NRPS}}]/2 - [\mu_{\text{sem PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, sem NRPS}}]/2$	Sem NRPS	64,5 (5,47)	46,5 (4,25)	76,4 (7,83)
	p	< 0,05	ns	ns
Efeito aditivo dos dois genes, comparativamente aos efeitos simples⁴	Com PKS e NRPS	43,9 (5,12)	42,7 (4,93)	64,5 (5,72)
	Com PKS ou NRPS	45,6 (19,02)	50,3 (4,20)	76,6 (0,03)
	p	ns	ns	ns
$[\mu_{\text{com PKS, com NRPS}}] - [\mu_{\text{com PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, com NRPS}}]/2$				

*p: probabilidade, ** ns: não significativo; 1. Médias seguidas de ns não diferem significativamente de acordo com análises de contrastes de médias ($p < 0,05$); 2. Contraste 1: compara médias (μ) de isolados antagonistas com PKS e isolados sem PKS (Comparou-se as médias de todos os isolados que apresentam PKS com todos que não o possuem. Os que apresentam incluem os que possuem somente PKS e os que possuem PKS e NRPS, os que não possuem incluem os que apresentam NRPS e os que não apresentam nenhum dos dois genes); 3. Contraste 2: compara médias (μ) de isolados antagonistas com NRPS e isolados sem NRPS (Comparou-se as médias de todos os isolados que apresentam NRPS com todos que não o possuem. Os que apresentam incluem os que possuem somente NRPS e os que possuem NRPS e PKS, os que não possuem incluem os que apresentam PKS e os que não apresentam nenhum dos dois genes); 4. Contraste 3: Compara as médias (μ) de isolados antagonistas com NRPS e PKS aditivamente, com os isolados com NRPS ou PKS, isoladamente.

5. CONCLUSÕES

O isolamento de bactérias a partir de solos supressivos possibilita o acesso a novos candidatos a agentes de biocontrole.

É possível isolar bactérias com alta eficiência de controle *in vitro* dos três fitopatógenos avaliados com as técnicas utilizadas.

Isolados obtidos podem apresentar ação contra mais de um patógeno.

A via do PKS bem como a ocorrência conjunta de NRPS-PKS não está associada à inibição de *Thielaviopsis paradoxa*, *Plenodomus destruens* e *Xanthomonas campestris*.

A presença do gene NRPS está associada a um maior efeito inibitório de *Thielaviopsis paradoxa*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDERRAHMANI, A.; TAPI, A.; NATECHE, F.; CHOLLET, M.; LECLÉRE, V.; WATHELET, B.; HACENE, H.; JACQUES, P. Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 571-581, 2011.
- ADERIBIGBE, E. Y.; VISESSANGUAN, W.; SUMPAVAPOL. P.; KONGTONG, K.; Sourcing starter cultures for *Parkia biglobosa* fermentation I: Phylogenic grouping of *Bacillus* species from commercial 'iru' samples. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, v.2, p. 121-127, 2011.
- ALABOUVETTE, C. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. **Australasian Plant Pathology**, v. 28,p. 57-64, 1999.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVARADO,I.C.M.;MICHEREFF,S.J.;MARIANO,R.L.R.;SILVA,A.M.F.;NASCIMENTO, C.W.A. Caracterização de Solos de Pernambuco quanto à Supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 222-228, 2007.
- ALVINDIA, D.G. Improving control of crown rot disease and quality of pesticide-free banana fruit by combining *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 and hot water treatment. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, p. 183-191, 2013.
- ALVINDIA, D.G.; NATSUAKI, K.T. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. **Crop Protection**, v. 28, p. 236–242, 2009.
- AMIN, A.; KHAN, M.A.; EHSANULLAH, M.; HAROON, U.; AZAM, S.M.F.; HAMEED, A. Production of peptide antibiotics by *Bacillus* sp. GU 057 indigenously isolated from saline soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p. 1340-1346, 2012.
- ANDRIÓN, E.E.B. **Supressividade natural de solos do Nordeste brasileiro à murcha-de-fusário e rizoctoniose do caupi**. 2009. 85p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ARASU, M.V.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. **Chemosphere**, v.90, p. 479-487, 2013.
- ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GAI as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, v.8, p.1-12, 2009.
- ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; BACIGALUPO, R.; KORSTEN, L. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. **Crop Protection**, v. 29, p. 369–377, 2010.

ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. **3 Biotech**, v. 4, p. 127-136, 2014.

BARRIOS-GONZALEZ, J. B.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. **Indian Journal of Biotechnology**, v.2, p. 322-333, 2003.

BETTIOL, W. (Org.). **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2012.

BETTIOL, W (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA, 1991.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 1^a ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 2005.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BODDY, C.N. Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p.443-450, 2014.

CARVALHO, A.L.U.; OLIVEIRA, F.H.P.C.; MARIANO, R.L.R.; GOUVEIA, E.R.; SOUTO, A. M. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 643-652, 2010.

CHEN, X.H.; SCHOLZ, R.; BORRIS, M.; JUNGE, H.; MÖGEL, G.; KUNZ, S.; BORRISS, R. Difficidin and bacylisin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. **Journal of Biotechnology**, v. 140, p. 38-44, 2009.

CHOI, SK.; PARK, SY.; KIM, R.; LEE, CH.; KIM, J.F.; PARK, SH. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, p. 89-95, 2008.

CORREA, O.S.; MONTECCHIA, M.S.; BERTI, M.F.; FERRARI, M.C. F.; PUCHEU, N.L.; KERBER, N.L.; GARCÍA, A.F. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p.185-194, 2009.

DEMAIN, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.33, p. 486-495, 2006.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v.1, p. 259-264, 1998.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 2^a ed. London: John Wiley & Sons. 2002.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1073-1109, 2007.

DONADIO,S.;MONCIARDINI,P.;ALDUINA,R.;MAZZA,P.;CHIOCCHINI,C.;CAVALLET ,L.; SOSIO,M.; PUGLIA,A.M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.187-198, 2002.

DRIKS, A. The *Bacillus* spore coat. **Phytopathology**, v. 94, p. 1249-1251, 2004.

DUNLAP, C.A.; BOWMAN, M.J.; SCHISLER, D.A. Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: a biocontrol antagonist of Fusarium head blight. **Biological Control**, v. 64, p. 166-175, 2013.

FERREIRA, J.M.S.; FONTES, H.R.; PROCÓPIO, S.O. **Resinose do Coqueiro - Como Identificar e Manejar**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007.

FONTES, H.R.; FERREIRA, J.M.S.; SIQUEIRA, L.A. **Sistema de produção para a cultura do coqueiro**. 1^a ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2002.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.

GANS, J.; WOLINSK, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, p. 1387-1390, 2005.

GOVINDASAMY,V.;SENTHILKUMAR,M.;MAGHESHWARAN,V.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA,V.;ANNAPURNA, K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. **Microbiology Monographs**, v. 18, p.333-364, 2011.

GUO, Q.;DONG, W.; LI, S.; LU, X.; WANG, P.; ZHANG, X.; WANG, Y.; MA, P. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. **Microbiological Research**, v. 169, p. 533-540, 2014.

HAMDACHE, A.; AZARKEN, R.; LAMARTI, A.; ALEU, J.; COLLADO, I.G. Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. **Phytochemistry Reviews**,v.12, p.685-716, 2013.

HAMDACHE, A.; LAMARTI, A.; ALEU, J.; COLLADO, I.G. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 893-899, 2011.

HAYAKAWA,M.;MOMOSE,Y.;KAJIURA,T.;YAMAZAKI, T.;TAMURA,T.;HATANO,K.; NONOMURA,H. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 287-289, 1995.

HAYAKAWA,M.;IINO,H.;TAKEUCHI,S.;YAMAZAKI,T. Application of a method incorporating treatment with chloramines T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 599-602, 1997.

HENZ, G.P.; MELO P.E. Resistência de cultivares de repolho a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 1411-1415, 1994.

HILL, P.; PIEL, J.; ARIS-BROSOU, S.; KRISTUFEK, V.; BODDY, C.; DIJKHUIZEN, L. Habitat-specific type I polyketide synthases in soils and street sediments. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 75-85, 2014.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p. 278-285, 1998.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A.R.; TAMAMES, J.; KAMPFER, P.; KOLSTO, A.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J.F.; CODOÑER, F.M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p. 383-391, 2013.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science**, v. 296, p. 1127-1129, 2002.

KANG, Q.; BAI, L.; DENG, Z. Toward steadfast growth of antibiotic research in China: from natural products to engineered biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v.30, p. 1228-1241, 2012.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 141-150, 2004.

KIM, P.I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 942-949, 2004.

KLEINKAUF, H.; VON DOHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v.236, p.335-551, 1996.

KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.. **Phytopathology**, v. 94, p. 1259-1266, 2004.

KNIGHT, V.; SANGIER, J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for a drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 446-458, 2003.

KOOP, F.; MARAHIEL, M.A. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 735-749, 2007.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A.M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V.; BERTERO, M.G.; BESSIÉRES, P.; BOLOTIN, A. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v.390, p. 249-256, 1997.

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

KURABACHEW, H.; WYDRA, K.; Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Biological Control**, v. 67, p. 75-83, 2013.

KURTBÖKE, D.I. Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1843-1852, 2012.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1719-1728, 2006.

JENSEN, B.D.; MASSOMO, S.M.S.; SWAI, I.S.; HOCKENHULL, J.; ANDERSEN, S.B. Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). **European Journal of Plant Pathology**, v. 113, p.297–308, 2005.

LAHLALI, R.; PENG, G.; GOSSEN, B.D.; MCGREGOR, L.; YU, F.Q.; HYNES, R.K.; HWANG, S.F.; MACDONALD, M.R.; BOYETCHKO, S.M. Evidence that the biofungicide serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. **Biological Control**, v. 103, p. 245-254, 2013.

LARKIN, R.P.; HOPKINS, D.L.; MARTIN, F.N. Suppression of Fusarium wilt of Watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. **Phytopathology**, v. 86, p. 812-819, 1996.

LI, L.; MA, J.; LI, Y.; WANG, Z., GAO, T.; WANG, Q. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection**, v. 35, p.29-35, 2012.

LIN, Y.; DU, D.; SI, C.; ZHAO, Q.; LI, Z.; LI, P. Potential biocontrol *Bacillus* spp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. **Biological Control**, v. 71, p. 7-15, 2014.

LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2009.

LOPES, C.A.; BOFF, P.; DUARTE, V. Foot rot of sweet potato in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 407-410, 1994.

MAGESHWARAN, V.; WALIA, S.; ANNAPURNA, K. Isolation and partial characterization of antibacterial lipopeptide produced by *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 against phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* M-5. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 909-917, 2012.

MANNANOV, R.N.; SATTAROVA, R.K. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 37, p. 103-108, 2001.

MARRONE, P.G. An effective biofungicide with novel modes of action. **Pesticide Outlook**, v.13, n. 5, p. 193–194, 2002.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; OLIVEIRA, I.S.; NASCIMENTO, A.R.P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R (Ed.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. 1ª ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 2001.

MAVINGUI, P.; HEULIN, T. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p. 801-803, 1994.

MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 557–564, 2002.

MELO, A.S.; COSTA, B.C.; BRITO, M.E.B.; NETTO, A.O.A.; VIÉGAS, P.R.A. Custo e rentabilidade na produção de batata-doce nos perímetros irrigados de Itabaiana, Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, p. 119-123, 2009.

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 1ª ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: AGROFIT**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 12 jul. 2014.

MISHRA, S.; ARORA, N.K. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 693-702, 2012.

MOLINARI, G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology-Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 655, p. 13-27, 2009.

MORAN, N. A. Symbiosis. **Current Biology**, v. 16, p. 866–871, 2006.

MOSS, S.J.; MARTIN, C.J.; WILKINSON, B. Loss of co-linearity by modular polyketide synthases: a mechanism for the evolution of chemical diversity. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 575-593, 2004.

NIU, B.; VATER, J.; RUECKERT, C.; BLOM, J.; LEHMANN, M.; RU, J.J.; CHEN, X.H.; WANG, Q.; BORRIS, R. **BMC Microbiology**, v. 137, p. 1-13, 2013.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 2005.

PARK, J.W.; BALARAJU, K.; KIM, J.; LEE, S.; PARK, K. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. **Biological Control**, v. 65, p. 246-257, 2013.

PARSLEY, L.C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A.M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R. M.; LOPANIK, N.B.; LILES, R.M. Polyketide synthase pathways identified from a

metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 176–187, 2011.

PASTRE, R. MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azadarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, p. 1867-1871, 2007.

PEREIRA, R.B.; CARVALHO, A.D.F.; PINHEIRO, J.B. **Avaliação da resistência de cultivares de batata-doce ao mal-do-pé por meio de diferentes métodos de inoculação**. 1^a ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013.

PEREIRA, R. B.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011. (Embrapa Hortaliças, Comunicado Técnico, 79).

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187-193, 2011.

PINHO, D.B.; DUTRA, D.C.; PEREIRA, O.L. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 152-157, 2013.

PRIDHAM, T.G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L.A.; HESSELTINE, C.W.; BENECICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, p. 947-953, 1957.

POSTMA, J.; SCHILDER, M.T.; BLOEM, J.; LEEUWEN-HAAGSMA, W.K.V. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2394–2406, 2008.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 403-424, 2012.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; SOUZA, J. S. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 537–547, 2002.

RAZA, W.; YANG, X.; WU, H.; WANG, Y.; XU, Y.; SHEN, Q. Isolation and characterisation of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f.sp. *neovium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 471-483, 2009.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

ROBERTSON, K.; MURPHY, C.D.; PARADISI, F. The synthesis and biological testing of bacilysin analogues. **Amino Acids**, v. 45, p. 1157–1168, 2013.

ROCHA, D.J.A.; MOURA, A.B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p. 423-430, 2013.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, V. A. **Doenças causadas por bactérias em crucíferas**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 17, n. p. 56-59, 1995.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2^a ed. Viçosa: Ed. UFV. 2005.

RONDON, M. R. ; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. The earth's bounty: Assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 403-408, 1999.

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p. 146-167, 2010.

SACIDO, A. A.; GENILLOUD, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 10–24, 2005.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H.; Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v.4, p. 654-666, 2002.

SALAMONI, S.P.; MANN, M.B.; CAMPOS, S. F.; FRANCO, A.C.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAND, S.T. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **Word Journal Microbial Biotechnology**, v. 26, p. 1847-1856, 2010.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1523-1538, 2011.

SCHER, F.M.; BAKER, R. Mechanism of biological control in *Fusarium*-suppressive soil. **Phytopathology**, v. 70, p. 412-417, 1980.

SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W.; JACKSON, M.A. Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant diseases. **Phytopathology**, v. 94, p. 1267-1271, 2004.

SENGUPTA,S.;CHATTOPADHYAY,M.K.;GROSSART,H.P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Fronties in Microbiology**, v.47, p.1-13, 2013.

SHALIGRAM, N.S.;SINGHAL, R.S. Surfactin-A review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technology. Biotechnology**, v.48, p. 119-134, 2010.

SILVEIRA, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R (Ed.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. 1^a ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. 2001.

SLEPECKY, R.A.; HEMPHILL, H.E. The genus *Bacillus*-nonmedical. **Prokaryotes**, v. 4, p. 530-562, 2006.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845-857, 2005.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare *Actinomycetes*: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p.9291-9321, 2013.

TAMEHIRO, N.; OKAMOTO-HOSOYA, Y.;OKAMOTO, S.;UBUKATA, M.; HAMADA, M.; NAGANAWA,H.;OCHI, K. Bacilysocin, a Novel Phospholipid Antibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p.315-320, 2002.

TIWARI, K.; GUPTA, R.J. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.32, p. 108-132, 2012.

TODOROVA, S.; KOZHUHAROVA,L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1207-1216, 2010.

TORSVIK, V.; GOSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TRUTA, A. A. C.; ARAÚJO, E.; SILVA, V. F. Reações de cultivares e controle químico do mal-do-pé da batata doce na microrregião do Brejo, Paraíba. **Agropecuária Técnica**, v. 21, p. 18-23, 2000.

UEKI, M.; KOSHIRO, N.; AONO, H.; KAWATANI, M.; URAMOTO, M.; KAWASAKI, H.; OSADA, H. Isolation of new polyketide metabolites, linearolides A and B, from *Streptomyces* sp. RK95-74. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, p. 333-337, 2013.

VASCONCELLOS, R.L.F. **Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial biotecnológico**. 2008. 73p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

VENTURINI, G.; BRANDI, F.; BETTIOL, W. Inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. In: 8º Congresso Interinstitucional-UNICAMP, São Paulo. **Anais...**2014.

WARWICK, D.R.N.; PASSOS, E.E.M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 175-177, 2009.

WEBER, T.; WELZEL, K.; PELZER, S.; VENTE, A.; WOHLLEBEN, W. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. **Journal of Biotechnology**, v.106, p. 221-232, 2003.

WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; GARDENER, B.B.M.; THOMAS, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 309-348, 2002.

WULFF, E.G.; MGUNI, C.M.; MANSFELD-GIESE, K.; FELS, J.; LÜBECK, M.; HOCKENHULL, J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**, v. 51, p. 574-584, 2002.

XIAO, K.; KINKEL, L.L.; SAMAC, D.A. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biological Control**, v. 23, p. 285-295, 2002.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. **Biological Control**, v. 91, p. 181-187, 2001.

ZHANG, H.; CHEN, L. ZHAO, S.; REN, J.; CAO, X. Knockout of *ituD* gene of *Bacillus subtilis* S44 strain and impact of its biocontrol effect to cotton rhizoctoniosis. **Plant Pathology Journal**, v. 13, p. 125-132, 2014.

ZHAO, Y.; LI, P.; HUANG, K.; WANG, Y.; HU, H.; SUN, Y. Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 411-420, 2013.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 292-297, 2010.