

Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame¹

Control of *Scutellonema bradys* in yam tubers by *Streptomyces* spp.

Carla da Silva Sousa^{2*}, Ana Cristina Fermino Soares³, Marlon da Silva Garrido⁴ e Francisco de Sousa Lima⁵

Resumo - O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de estreptomicetos no controle do nematóide *Scutellonema bradys* em túberas de inhame. Em laboratório, foi montado um bioensaio em placas tipo Elisa em delineamento experimental inteiramente casualizado, onde foram adicionados 200 µL de metabólitos de cada um dos cinco isolados de estreptomicetos avaliados ou água potável (tratamento controle), juntamente com 100 nematóides, com oito repetições (cada repetição constituída de uma cavidade da placa). O percentual de nematóides mortos foi determinado após a incubação por 24 horas em metabólitos e 24 horas em água potável. Metabólitos produzidos pelos isolados de estreptomicetos causaram entre 87,2% e 100% de mortalidade de *S. bradys*. Em casa de vegetação, foi instalado um experimento em delineamento experimental de blocos ao acaso, onde túberas-semente de inhame foram imersas por 24 horas em suspensão contendo propágulos dos três isolados de estreptomicetos mais eficientes e em água potável (tratamento controle), com 10 repetições. As túberas-semente foram plantadas em solo estéril e quinze dias após a germinação foi realizada a inoculação de 2.000 nematóides/planta. Após cinco meses, foi realizada a coleta das túberas das quais foram retiradas amostras da casca para a quantificação de nematóides presentes. Constatou-se uma redução de 84,5% a 95,4% no número de nematóides nas túberas inoculadas com os isolados de estreptomicetos. Estes resultados indicam que os isolados de estreptomicetos avaliados apresentam potencial para biocontrole do nematóide *S. bradys*.

Palavras-chave - *Dioscorea cayennensis*. Controle biológico. Actinomicetos.

Abstract - This study aimed to evaluate the effect of streptomycetes on the control of the nematode *Scutellonema bradys* in yam tubers. A bioassay was set in the laboratory using Elisa plates in a completely randomized design. Amounts of 200 µL of metabolites of each of the five isolates of streptomycetes were used with 100 nematodes. Drinking water served as control, in a total eight replicates (each replicate consists of a cavity plate). The percentage of dead nematodes was determined after a period of 24 hours. The mortality rates of *S. Bradys* in the metabolites ranged from 87.2% to 100%. In a greenhouse an experiment was installed in a randomized block design where tubers were immersed for 24 hours in suspension containing seed of each of the three isolated from streptomycetes assessed or in drinking water (control treatment), with 10 repetitions (each replicate consists of a pot with two plants).The tubers-seed were planted in sterile soil and fifteen days after germination was carried out the inoculation of 2000 nematodes per plant. The assessment of nematodes per tuber was conducted five months after inoculation. There was a reduction of 84.5% to 95.4% in the number of nematodes in tubers inoculated with the isolated streptomycetes. These results suggest that the isolates from streptomycetes have a potential biocontrol activity against *S. bradys*.

Key words - *Dioscorea cayennensis*. Biological Control. Actinomycets.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 13/08/2008; aprovado em 09/10/2009

Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

²Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, DEN/UFPE, Av. Prof. Luiz Freire, 1000, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, 50741-110, cssagro@yahoo.com.br

³Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, CCAAB/UFRB, Cruz das Almas-BA, Brasil, acsoares@ufrb.edu.br

⁴Programa de Pós-graduação Tecnologias Energéticas e Nucleares, CCAAB/UFRB, Cruz das Almas-BA, Brasil, garridoms@yahoo.com.br

⁵Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, Departamento de Agronomia/UFRPE, Recife-PE, Brasil, fsousalima@yahoo.com.br

Introdução

O inhame da costa, *Dioscorea cayennensis* Lam var. *rotundata* Poir, também conhecido como cará da costa, vem se destacando no Nordeste Brasileiro pelo grande potencial de exportação (MOURA, 2005). Entretanto, um dos principais problemas encontrados pelos produtores na região do recôncavo baiano é a ocorrência do nematóide *Scutellonema bradys*, que penetra pela epiderme da túbera formando galerias durante o seu processo de alimentação e multiplicação, causando necrose conhecida como casca preta do inhame (MOURA et al., 2001).

A alta incidência destes fitonematóides no Nordeste brasileiro afeta a produtividade, a qualidade e o valor comercial das túberas (GARRIDO et al., 2003). Estes fitonematóides, além de terem uma disseminação permanente por túberas-semente, são de difícil controle no campo. Túberas portadoras do sintoma de casca preta perdem água rapidamente e ficam predispostas ao ataque de microrganismos secundários, além de serem excluídas nas seleções para comercialização e a sua exportação (ACOSTA; AYALA, 1975).

Na cultura do inhame, o controle de nematóides, principalmente de *S. bradys*, limita-se aos controles químico e físico (MOURA et al., 1978). Contudo, esses métodos vêm apresentando algumas restrições quanto ao seu uso. A utilização de nematicidas fumigantes e sistêmicos não é recomendada para a cultura do inhame no Brasil por razões toxicológicas e econômicas (MOURA, 2005). O controle físico através do tratamento hidrotérmico das túberas-semente, vem apresentando restrições quanto à praticidade, principalmente devido às dificuldades dos pequenos produtores em adotar este método (MOURA et al., 1978). Assim, o controle biológico tem se apresentado como alternativa viável para o manejo de fitonematóides, por minimizar o dano ambiental e por ser mais vantajoso economicamente, quando comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA; CAMPOS, 2005).

Os actinomicetos constituem um importante grupo de bactérias, comumente isolados do solo, que durante o processo de compostagem, atuam na degradação de moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilana e lignina, presentes em abundância na biomassa vegetal (DING et al., 2004; PETROSYAN et al., 2003). Além da atuação na decomposição da matéria orgânica, estes microrganismos apresentam grande potencial como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HOSTER et al., 2005; THIRUP et al., 2001) devido à produção de antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana. O gênero *Streptomyces* tem sido o mais estudado com relação

ao controle biológico de fitopatógenos, em razão da diversidade de metabólitos secundários produzidos por esse gênero e da capacidade competitiva por substratos (INBAR et al., 2005).

Estudos demonstraram o potencial dos actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus penetrans* (COIMBRA et al., 2004; JONATHAN et al., 2000; SOUSA et al., 2005; SOUSA et al., 2006). Tendo em vista a importância da cultura do inhame e a eficácia dos actinomicetos no controle de fitonematóides, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame.

Material e métodos

Foram avaliados cinco isolados de estreptomicetos, codificados como AC-26; AC-29; AC-92; AC-95 e AC-103, provenientes da coleção de cultura do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Estes isolados foram previamente selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento de mudas de tomateiro e biocontrole de fungos fitopatogênicos na cultura do inhame (SOARES et al., 2006) e da meloidoginose na cultura do tomateiro (SOUSA et al., 2006).

Obtenção de metabólitos dos estreptomicetos

Os isolados de estreptomicetos foram inicialmente multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido AGS, as quais foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de 28 °C por dez dias. Após este período, foram adicionados sobre as colônias crescidas nas placas 10 mL de água destilada e esterilizada, concedendo-se um repouso de 24 horas. A suspensão obtida foi recolhida e centrifugada a 12.000 rpm, durante 15 min e, em seguida, submetida à filtração em membrana de nitrocelulose Millipore (0,22 µm), para a obtenção de um filtrado livre de células de estreptomicetos, apenas com os metabólitos produzidos por esses microrganismos.

Produção de lipase e quitinase pelos estreptomicetos

A produção de lipase pelos isolados, foi avaliada no meio Sierra (1957), usando Tween 80 como substrato. Os isolados de estreptomicetos foram incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de

28 °C por dez dias. A produção da enzima foi detectada pela formação de um halo branco difuso, constituído de minúsculos precipitados de oleato de cálcio, ao redor das colônias crescidas dos microrganismos.

A atividade quitinolítica foi determinada conforme a metodologia descrita por Renwick et al. (1991), onde os isolados de estreptomicetos foram multiplicados em meio de sais minerais ágar (TUIITE, 1969), suplementado com quitina coloidal, como substrato. As culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de 28 °C por dez dias. Após esse período, a atividade quitinolítica dos isolados foi avaliada pela formação de um halo hialino em torno das colônias crescidas.

Efeito dos metabólitos dos estreptomicetos na mortalidade de *Scutellonema bradys*

Foi montado um bioensaio em placa tipo Elisa, em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições (cada repetição foi constituída por uma cavidade de uma mesma placa). Em cada cavidade foram adicionados 200 µL dos metabólitos produzidos por cada um dos cinco isolados de estreptomicetos, juntamente com 20 µL de uma suspensão aquosa contendo 100 nematóides juvenis. O tratamento controle constituiu-se dos nematóides, juntamente com 200 µL de água potável. Foram utilizadas 48 cavidades (8 repetições x 6 tratamentos) de uma mesma placa tipo Elisa no bioensaio. As placas foram vedadas com parafilme e acondicionadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de 28 °C. Após 24 horas de incubação realizou-se a contagem dos nematóides móveis e imóveis, com auxílio de microscópio de objetiva invertida. Em seguida, os nematóides foram retirados da suspensão de metabólitos e transferidos para água, onde permaneceram por mais 24 horas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura de 28 °C. Foram considerados mortos os nematóides que depois desse período em água, não recuperaram a mobilidade. Os dados obtidos foram transformados em $\arcsen(x/100)^{0.5}$, submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 4.3.

Efeito dos estreptomicetos na infectividade do *Scutellonema bradys* em túberas de inhame

Foi instalado um experimento em delineamento de blocos casualizados, onde foram selecionados os três isolados de estreptomicetos mais eficientes no teste *in vitro* (AC-26; AC-92 e AC-95) mais a testemunha, com 10 repetições (cada repetição foi constituída por um vaso contendo duas plantas). Os estreptomicetos foram

cultivados em arroz esterilizado contido em erlenmeyers os quais foram incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. a temperatura de 28 °C por 12 dias (SOARES et al., 2007). O arroz colonizado pelos estreptomicetos foi lavado com água destilada e esterilizada, e a suspensão do microrganismo então obtida teve sua concentração ajustada para densidade ótica de $A_{560} = 0,4$ em espectrofotômetro UV. Túberas-semente sadias de inhame permaneceram imersas nas suspensões dos estreptomicetos por 24 horas, sendo posteriormente realizado o plantio em vasos contendo 5 kg de solo estéril. No tratamento controle, as túberas-semente foram imersas em água destilada por 24 horas e, em seguida, conduzidas para solo estéril. Quinze dias depois da germinação das plantas, foi realizada a inoculação das túberas tratadas e não tratadas (controle) com cerca de 2.000 nematóides juvenis/planta, depositando o inóculo com o auxílio de uma micropipeta de 1 mL em orifícios feitos no solo próximos às raízes. Cinco meses depois da inoculação, foi realizada coleta das túberas, as quais foram cuidadosamente lavadas em água corrente para total remoção do solo. Retiraram-se, em seguida 5 g das cascas de cada túbera para extração de nematóides, através da trituração em liquidificador, seguida de centrifugação em solução de sacarose e caolim (COOLEN; D'HERDE, 1972). A contagem dos nematóides foi feita sob microscópio óptico, com auxílio de lâmina de Peters. Os dados obtidos foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$, submetidos a análise de variância. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 4.3.

Resultados e discussão

Os metabólitos produzidos pelos cinco isolados de estreptomicetos apresentaram um expressivo efeito nematocida, não diferindo estatisticamente entre si. Metabólitos produzidos pelos isolados de actinomicetos AC-95; AC-92 e AC-26 *in vitro* promoveram 100% de mortalidade (Tabela 1). Observou-se uma taxa de 87,2% e 94,6% de nematóides mortos quando em contato com metabólitos produzidos pelos isolados AC-103 e AC-29, respectivamente. No tratamento controle houve uma taxa de mortalidade de apenas 16,8%. Coimbra e Campos (2005), ao avaliarem o efeito de metabólitos de actinomicetos na motilidade e mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica*, verificaram que seis isolados entre os 37 testados, tinham efeito nematocida, observando valores de mortalidade entre 19% e 100%.

Embora não tenha havido diferença significativa, os metabólitos produzidos pelos estreptomicetos testados

Tabela 1 - Efeito de metabólitos de isolados de estreptomicetos na mortalidade de *Scutellonema bradys*

Isolado	Mortalidade (%)
Controle	16,8 b
AC-26	100,0 a
AC-29	94,6 a
AC-92	100,0 a
AC-95	100,0 a
AC-103	87,2 a

Médias seguidas de letras iguais não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

promoveram uma taxa de mortalidade que variou de 87,2% a 100%, sugerindo que substâncias tóxicas devem ser produzidas por estes microrganismos. Além da diferença intrínseca entre as espécies de estreptomicetos, outras características do meio de crescimento como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, podem interferir tanto na quantidade quanto na composição dos metabólitos produzidos (MOURA et al., 1998). A concentração de metabólitos na suspensão e o período de exposição dos nematóides aos mesmos, também podem influenciar a taxa de mortalidade e devem ser avaliados em estudos futuros.

A infectividade do nematóide *S. bradys* em túberas de inhame, foi afetada pelos isolados de estreptomicetos, em especial pelo isolado AC-92, onde foram observados 52 espécimes do nematóide por grama de raiz, o que significa uma redução de 95,4% em relação ao controle que foi de 1131. Os isolados AC-26 e AC-95, também causaram significativa redução no número de nematóides, sendo observados 175 e 125 nematóides por grama de raiz, respectivamente,

correspondendo a uma redução de 84,5% e 88,9% em relação ao controle (Tabela 2). A produção de metabólitos secundários no solo e/ou na rizosfera da planta pelos estreptomicetos pode ter tido efeito tóxico e provocado a mortalidade do nematóide não ocorrendo, assim, sua infestação nas túberas. Trabalhos têm demonstrado a eficácia dos actinomicetos, principalmente os do gênero *Streptomyces*, na redução da população de fitonematóides. Esnard et al. (1998) observaram redução da população de *Radopholus similis* e de *Helicotylenchus multicinctus* em solo com trigo pré-incorporado com *Streptomyces costaricanus* cultivado em meio líquido.

A orientação e a migração de fitonematóides para raízes dependem de vários fatores, entre eles a natureza dos exsudados radiculares. Os microrganismos, por sua vez, colonizam o sistema radicular e afetam a composição química dos exsudados liberados (MELO, 1998). A transformação dos exsudados radiculares em subprodutos pode fazer com que o nematóide não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até esgotar suas reservas de energia, vindo a morrer sem penetrar na raiz (FREITAS, 2001). Outro possível mecanismo de biocontrole consiste no parasitismo pelos estreptomicetos, os quais utilizam de enzimas como proteases, quitinases e lipases que atuam na destruição da cutícula dos nematóides (PARK et al., 2002).

Todos os isolados de estreptomicetos testados com o Tween 80 demonstraram produzir a enzima lipase e, com exceção do isolado AC-92, apresentaram capacidade de produção de quitinase. Miller e Sands (1977), ao testar os efeitos *in vitro* das enzimas protease, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que, depois de 24 horas, houve modificações na cutícula do nematóide devido à degradação enzimática, resultando na morte dos nematóides.

Tabela 2 - Efeito de metabólitos de isolados de estreptomicetos na redução do número de nematóides em túberas-semente de inhame

Isolado	Nematóide g ⁻¹ de raiz	
	Número	Redução (%)
Controle	1131 a	-
AC 26	175 b	84,5
AC 92	52 c	95,4
AC 95	125 b	88,9

Médias seguidas de letras iguais não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Conclusão

Considerando-se que os estreptomicetos constituem um elevado percentual da população microbiana do solo, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que estes organismos poderão ser utilizados com sucesso na proteção de túberas de inhame contra o nematóide *S. bradys*. Um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação dos estreptomicetos poderá facilitar a seleção de isolados mais patogênicos.

Referências

- ACOSTA, N.; AYALA, A. Pathogenicity of *Pratylenchus coffeae*, *Scutellonema bradys*, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* on *Dioscorea rotundata*. **Journal of Nematology**, v. 07, n. 01, p. 1-5, 1975.
- COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Efeito antagônico de actinomicetos isolados de diferentes culturas na formação de galhas e na reprodução de *M. javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 02, p. 231-234, 2004.
- COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudados de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 03, p. 232-238, 2005.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: Ministry of Agriculture of Belgium, Agricultural Research Administration, 1972. 77 p.
- ESNARD, J.; MARBAN-MENDONZA, N.; ZUCKERMAN, B. Effects of three microbial broth cultures and a organic amendment on growth and populations of tree living and plant-parasitic nematodes on banana. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 05, p. 457-463, 1998.
- DING, C. H. *et al.* High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 01, p. 7-10, 2004.
- FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematóides**. 2001. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2008.
- GARRIDO, M. S. *et al.* Novas tecnologias para a produção do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) no Estado da Bahia. **Revista Bahia Agrícola**, v. 06, n. 01, p. 19-22, 2003.
- HOSTER, F.; SCHMITZ, J. E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of s chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 66, n. 04, p. 434-442, 2005.
- INBAR, E. *et al.* Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomicetes. **Microbial Ecology**, v. 50, n. 01, p. 73-81, 2005.
- JONATHAN, E. L. *et al.* Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v. 30, n. 02, p. 231-240, 2000.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. cap. 1, p. 17-67.
- MILLER, P. M.; SANDS, D. C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 09, n. 03, p. 192-197, 1977.
- MOURA, R. M. Doenças do Inhame. In: KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. Cap. 44, p. 415-419.
- MOURA, R. M.; COELHO, R. S. B.; PIO RIBEIRO, G. Estudo etiológico e efeito de 1,2-dibromo-3-cloropropano no controle da casca preta do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 03, n. 01, p. 47-53, 1978.
- MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S.; NEVES, M. C. P. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 2065-2072, 1998.
- MOURA, R. M.; PEDREGOSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P. Novos dados sobre a etiologia da casca preta do inhame no nordeste do Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 02, p. 235-237, 2001.
- PARK, J. O. *et al.* Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 05, p. 361-365, 2002.
- PETROSYAN, P. *et al.* *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 269-273, 2003.
- RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potencial biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, n. 04, p. 524-532, 1991.
- SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Laeuwenhoek**, v. 23, p. 15-22, 1957.
- SOARES, A. C. F. *et al.* Soil streptomyces with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 04, p. 456-461, 2006.
- SOARES, A. C. F. *et al.* Production of streptomycete inoculum in sterilized rice. **Scientia Agrícola**, v. 64, n. 06, p. 241-244, 2007.
- SOUZA, C. S. *et al.* Atividade nematicida de exsudatos de *Streptomyces* sp. sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 02, p. 207-209, 2005.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, 2006.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; WINDING, A. Succession of indigenous *Pseudomonas spp.* and actinomycetes on barley roots

affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR 54 and the fungicide imazolil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 03, p. 1147-1153, 2001.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969. 239 p.