



IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES DE
***Streptomyces* ASSOCIADAS À SARNA DA BATATA**

LUCAS VITOR

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Agência
Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio**

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES DE *Streptomyces*
ASSOCIADAS À SARNA DA BATATA**

LUCAS VITOR

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Prof^a. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano.

Campinas

2021

LUCAS VITOR

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES DE *Streptomyces*
ASSOCIADAS À SARNA DA BATATA**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Campinas

2021

Eu, **Lucas Vitor**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico, repositório institucional ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte. Declaro também que os dados contidos nesta dissertação/ tese são inéditos e autênticos, portanto, sem fraudes e/ou derivações de plágio e que tenho pleno conhecimento do Código de Ética e dos Procedimentos referentes à proteção da integridade científica do Instituto Biológico.

Assinatura:  _____ Data: 20/09/2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Secretaria
de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Agência
Paulista de Tecnologia dos Agronegócios Instituto Biológico Núcleo de
Informação e Documentação – IB**

Vitor, Lucas.

Identificação de novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata.
Lucas Vitor. Campinas, 2021. 139 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (Campinas). Programa de Pós-Graduação. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema. Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Prof^a. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano. Versão do título para o inglês: Identification of new species of *Streptomyces* associated with potato scab.

I. Sarna da batata 2. *Streptomyces* sp. nov. 3. *Solanum tuberosum* 4. Taxonomia polifásica 5. Análises genômicas I. Vitor, Lucas II. Destafano, Suzete Aparecida Lanza III. Instituto Biológico (Campinas) IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

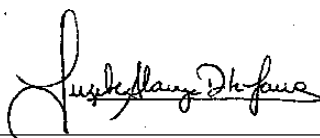
Nome: Lucas Vitor

Título: Identificação de novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata

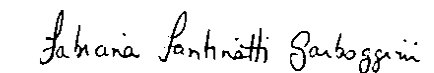
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 20 /09 /2021

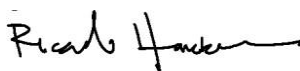
Banca examinadora:



Prof^a. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano
Laboratório de Bacteriologia Vegetal – Instituto Biológico
Julgamento: APROVADO



Prof^a Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini
Divisão de Recursos Microbianos – DRM CPQBA/UNICAMP
Julgamento: APROVADO



Prof^o Dr. Ricardo Harakava
Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada (ULRBMA)/Instituto Biológico
Julgamento: APROVADO

Aos meus pais, Roseli e Francisco, pelo total apoio a minha formação pessoal e profissional, e ao confiarem em mim em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me fazer chegar até aqui, derrubando adversidades e me fazendo superar dia após dia todos os desafios.

À Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, a Suzi, por acreditar no meu potencial, e não medindo esforços para a realização desse trabalho. Muito obrigada por essa linda parceria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa (Processo no. 2017/50334-3) e pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo no. 2019/12999-9).

O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos membros da banca tanto de qualificação quanto da defesa, a Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini pelo auxílio e instruções sobre as análises filogenéticas dispostas no trabalho; e ao Prof. Dr. Ricardo Harakava.

À Associação Brasileira da Batata (ABBA), representada pelo Engenheiro Agrônomo Natalino Yassushi Shimoyama, pelo apoio constante às pesquisas com sarna da batata.

À empresa Solei Papa Brasil, em especial ao Engenheiro Agrônomo Pedro Hayashi, pela disponibilização dos tubérculos de batata para os testes de patogenicidade.

Ao Dr. Danilo Trabuco do Amaral pela valiosa colaboração nas análises genômicas.

Aos meus parceiros de laboratório: Mariana Ferreira Tonin (Marys) pelos melhores cafezinho, bóulos e divisão de histórias; Alex Augusto Tomaseto (Bliuri) pelas inúmeras caronas já oferecidas e por saber tudo de RuPaul; Emanuel Torres Lucon (Migou) que entrou comigo nessa jornada e dividiu as melhores histórias, a Mariana Macedo (Mari 3), a Regiane Pinheiro dos Santos Monteiro (Gigi) e a Dayane (Day), além da ajuda e disponibilidade de me auxiliarem nesse trabalho foram meus companheiros diários. As estagiárias, Ana e Bruna que entraram ao longo do desenvolvimento desse trabalho e que me ajudaram muito também pelo meu crescimento acadêmico. A Msc. Mariana Pereira Appy pela amizade formada profissionalmente que rendeu uma parceria de vida.

Aos meus amigos que não participaram diretamente do trabalho científico, mas que me mantiveram são e motivado a continuar nesse meu sonho. Em especial, Gab e Lari, que seguraram minha mão e me ouviram em momentos tão necessários.

A todos os meus familiares que em nossas reuniões e encontros ficavam preocupados e animados pelos resultados que este trabalho me renderia, agradeço também os conselhos e a esperança que dedicavam a mim.

As minhas avós Pascoa Vitor e Tereza Zanolla, fortes e guerreiras, que me inspiram a conquistar muitas coisas através do carinho e respeito.

Ao meu irmão Glauco, meu grande parceiro de vida e inspiração a muitas das minhas lutas e conquistas. Que sejamos sempre unidos e que possamos comemorar juntos cada vitória em nossas vidas.

Aos meus pais que tenho uma eterna gratidão por serem tão maravilhosos comigo. Sempre presentes em todos momentos, em cada conquista, me ajudando a ter forças e nunca desistir. Obrigada por serem pais batalhadores e por construir essa minha vitória apresentada nessas páginas. Vocês são grandes responsáveis por todas as minhas conquistas. Minha dedicação, determinação e valores foram inspirados em vocês. Agradeço por todo carinho, ajuda, atenção, compreensão e por todo amor, sou muito feliz por ter nascido em uma família tão abençoada.

“I’m a survivor
I’m not gon give up
I’m not gon stop
I’m gon work harder
I’m a survivor
I’m gonna make it
I will survive
Keep on survivin”

Destiny's Child

RESUMO

VITOR, L. **Identificação de novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata**, 2021. 139p. Dissertação Mestrado em Sanidade Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico (Campinas). Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretária de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021.

A sarna da batata é uma doença de ocorrência generalizada nas regiões produtoras do Brasil, tornando-se um fator limitante no cultivo dessa cultura. Essa doença afeta a qualidade da batata devido às lesões na superfície do tubérculo, que diminuem seu valor comercial ou impedem a sua comercialização. Diferentes espécies do gênero *Streptomyces* são responsáveis por essa doença e o levantamento das espécies patogênicas presentes no país é um fator primordial para a realização de medidas de manejo. O presente estudo teve por objetivo caracterizar e identificar 15 linhagens de *Streptomyces* sp. associadas à sarna da batata divididas em três grupos genéticos (G6, G9 e G16) por meio de abordagem polifásica envolvendo cinco parâmetros de caracterização: morfológico, bioquímico, fisiológico, patogênico e molecular. A caracterização morfológica demonstrou alta diversidade de coloração de esporos e de colônias das espécies avaliadas, assim como variação de crescimento em diferentes meios de cultivo. As características bioquímicas evidenciaram diferenças entre as linhagens avaliadas no estudo e as linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à doença. Os dados das avaliações fisiológicas (pH, salinidade e temperatura) permitiram classificá-las em padrões de tolerância. Todas as 15 linhagens se mostraram patogênicas em sementes de rabanete e discos de batata. As análises *in silico* de PCR-RFLP do gene *atpD* juntamente com as análises filogenéticas do gene 16S RNAr e MLSA revelaram a ocorrência de nove novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata no Brasil. Dentre essas, duas linhagens do G6 tiveram seus genomas sequenciados e as avaliações de DDH e ANI confirmaram os dados da ocorrência de novas espécies. Elas foram denominadas *Streptomyces hilarionis* (IBSBF 2807^T) e *Streptomyces hayashii* (IBSBF 2953^T).

Palavras chave: 1. Sarna da batata 2. *Streptomyces* sp. nov. 3. *Solanum tuberosum* 4. Taxonomia polifásica 5. Análises genômicas

ABSTRACT

VITOR, L. **Identification of new species of *Streptomyces* associated with potato scab**, 2021. 139p. Master's Dissertation in Food and Environmental Health in Agribusiness, Biological Institute (Campinas). São Paulo Agribusiness Technology Agency, Secretary of Agriculture and Supply of the State of São Paulo, São Paulo, 2021.

Potato scab is a disease of widespread occurrence in producing areas in Brazil, becoming a limiting factor in the cultivation of this crop. This disease affects the quality of potato due to lesions on the surface tuber, which reduce its commercial value or prevent its commercialization. Different *Streptomyces* species are associated with the disease and the survey of pathogenic species present in the country is a key factor for management measures. The present study aimed to characterize and identify 15 strains of *Streptomyces* sp. associated with potato scab, divided into three genetic groups (G6, G9 and G16) through polyphasic approach involving five characterization parameters: morphological, biochemical, physiological, pathogenic and molecular. The morphological characterization showed high diversity of spore and colony coloration of the evaluated species, as well as growth variation on different culture media. The biochemical characteristics showed differences between the *Streptomyces* sp. and the type strains of *Streptomyces* associated with the disease. Data from physiological tests (pH, salinity and temperature) allowed classifying them into tolerance standards. All 15 strains were pathogenic in radish and potato discs. The *in silico* PCR-RFLP of *atpD* gene analyzes together with the phylogenetic analyzes of 16S rRNA gene and MLSA revealed the occurrence of nine new species of *Streptomyces* associated with potato scab in Brazil. Among them, two strains of G6 had their genomes sequenced and the DDH and ANI analyzes confirmed the new species status. They are named as *Streptomyces hilarionis* (IBSBF 2807^T) e *Streptomyces hayashii* (IBSBF 2953^T).

Key words: 1. Potato scab 2. *Streptomyces* sp. Nov. 3. *Solanum tuberosum* 4. Polyphasic taxonomy 5. Genomic analysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Gráfico de área colhida (ha), produção (t) e rendimento médio (kg/ha) de batata no período de 2010-2018.	4
Figura 2. Sintomas de sarna comum da batata por <i>Streptomyces</i> spp.	5
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp.	7
Figura 4. Ciclo da sarna comum da batata	13
Figura 5. Distribuição do inóculo em placa de Petri para avaliação da utilização de carboidratos	31
Quadro 1: Determinação de valores de virulência de acordo com a porcentagem de crescimento da parte aérea e da raiz das plantas inoculadas comparadas às plantas controle	37
Figura 6. Esquema da avaliação do teste de patogenicidade de linhagens de <i>Streptomyces</i>	38
Figura 7. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Tryptone-Yeast Extract Broth.	42
Figura 8. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Yeast Extract Malt Agar	44
Figura 9. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de aveia (Oatmeal Agar)	46
Figura 10. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Amido Sal Inorgânico (Inorganic Salt-Starch Agar)	48
Figura 11. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Glicerol-Asparagina (Glycerol-Asparagine Agar)	50
Figura 12. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Tirosina Agar (Tyrosine Agar)	52
Figura 13. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA)	54

Figura 14: Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Bennete's Agar.	56
Figura 15. Micromorfologia de hifas ao MO do G16.	58
Figura 16. Micromorfologia de esporos ao MEV do Grupo Genético 6 (G6)	60
Figura 17. Micromorfologia de esporos ao MEV do Grupo Genético 9 (G9)	61
Figura 18. Micromorfologia de esporos ao MEV do Grupo Genético 16 (G16)	62
Figura 19. Avaliação bioquímica com a linhagem IBSBF 3018.	63
Figura 20. Teste de patogenicidade in vitro das linhagens do G6, G9 e G16 em sementes de rabanete.....	71
Figura 21. Teste de patogenicidade das linhagens do G6, G9 e G16 em discos de batata	72
Figura 22. Produtos de amplificação do operon <i>txtAB</i>	73
Figura 23. Produtos de amplificação do gene <i>nec1</i>	74
Figura 24. Produtos de amplificação do operon <i>toma</i>	74
Figura 25. Padrões de bandas de restrição do PCR-RFLP <i>in silico</i> do gene <i>atpD</i> utilizando a enzima <i>CfoI</i> . Gel de eletroforese 1,5% gerado no software online SnapGene	77
Figura 26. Padrões de bandas de restrição do PCR-RFLP <i>in silico</i> do gene <i>atpD</i> utilizando a enzima <i>HaeIII</i> . Gel de eletroforese 1,5% gerado no software online SnapGene	77
Figura 27. Padrões de bandas de restrição do PCR-RFLP <i>in silico</i> do gene <i>atpD</i> utilizando simultaneamente as enzimas <i>CfoI</i> e <i>HaeIII</i> . Gel de eletroforese 1,5% gerado no software online SnapGene.....	78
Figura 28. Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene 16S RNA ribossomal de <i>Streptomyces</i> spp.....	79
Figura 29. Árvore filogenética construída a partir do concatenamento das sequências dos genes <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> e <i>trpB</i> de <i>Streptomyces</i> spp.	81
Figura 30. Árvore filogenética construída a partir do concatenamento das sequências dos genes 16S rRNA, <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> e <i>trpB</i> de <i>Streptomyces</i> spp	83
Figura 31. Valores percentuais de identidade média de nucleotídeos (ANI) e hibridização <i>in silico</i> DNA-DNA (<i>isDDH</i>) das linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953 junto a espécies tipo de <i>Streptomyces</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> spp. e <i>Streptomyces</i> sp. associadas à sarna da batata utilizadas neste estudo	27
Tabela 2. Primers, especificidade, sequência, tamanho do produto e programas de amplificação utilizados neste trabalho.	33
Tabela 3. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Tryptone-Yeast Extract Broth. 41	
Tabela 4. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Yeast Extract Malt Agar (YME) (ISP2).....	43
Tabela 5. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de aveia (Oatmeal Agar) (ISP 3)	45
Tabela 6. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Amido Sal Inorgânico (Inorganic Salt-Starch Agar) (ISP4).	47
Tabela 7. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Glicerol-Asparagina (Glycerol-Asparagine Agar) (ISP 5).	49
Tabela 8. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Tirosina Agar (Tyrosine Agar) (ISP 7).....	51
Tabela 9. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Batata Dextrose Agar 53	
Tabela 10. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Bennete's Agar.	55

Tabela 11. Avaliação de micromorfologia de hifas de linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata e de linhagens dos grupos G6, G9 e G16 ao microscópio óptico (MO).....	57
Tabela 12. Avaliação de micromorfologia de esporos das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)	59
Tabela 13. Avaliação da utilização de diferentes carboidratos pelas linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	64
Tabela 14. Avaliação de crescimento das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 em meio de cultivo YME com diferentes valores de pH.	66
Tabela 15. Avaliação de crescimento das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 em meio de cultivo YME com adição de diferentes concentrações de NaCl (%).	67
Tabela 16. Avaliação de crescimento das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 em meio de cultivo YME em diferentes temperaturas (°C).	68
Tabela 17. Avaliação de teste de patogenicidade in vitro em sementes de rabanete	70
Tabela 18. Avaliação da amplificação de genes de patogenicidade	73

LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

16S - RNA ribossomal em procariotos

16S-23S - região espaçadora entre os RNAs ribossomais 16S e 23S

AA - ágar-água

ABBA - Associação Brasileira da Batata

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

atpD - gene codificante da cadeia β da ATP sintase

BDA – batata dextrose agar

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

CBMEG - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

cm - centímetro

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNAr - ácido desoxirribonucléico ribossomal

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA - ácido etilenodiamino tetracético

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

g - gramas

G - grupo genético

gyrB - gene estrutural da subunidade B da DNA girasse

h - hora

ha - hectare

HCl - ácido clorídrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBSBF - Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico

ISP - International Streptomyces Project

Kb - Kilobases

Kg - Kilograma
L - litro
LiCl - cloreto de lítio
LMG - Laboratorium voor Microbiologie
M - molar
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mb - Megabase
MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg - miligrama
MgCl₂ - cloreto de magnésio
min - minuto
mL - mililitro
MLSA - Multilocus Sequence Analysis
MLST - Multilocus Sequence Typing
mm - milímetro
mM - milimolar
µg - micrograma
µL - microlitro
µM - micromolar
NaCl - cloreto de sódio
NaOCl - hipoclorito de sódio
nec1 - gene que codifica proteína necrogênica Nec1
ng - nanograma
OMB - oatmeal broth
PAI - pathogenicity
pb - pares de base
PCR - Polymerase Chain Reaction

pH - potencial hidrogeniônico

ppm - partes por milhão

pg - picograma

qsp - quantidade suficiente para

recA - gene codificante da recombinase A

rep - repetitive elements

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA - ácido ribonucléico

RNase - ribonuclease

RNAr - ácido ribonucléico ribossomal

rpm - rotações por minuto

rpoB – gene codificante da subunidade da RNA polimerase

s - segundo

SDS - dodecil sulfato de sódio

syn - synonym

T - linhagem Tipo

t - tonelada

TAE - Tris - Acetato - EDTA

Taq - *Thermus aquaticus* (enzima DNA polimerase)

TE - Tris - EDTA

toma - gene que codifica a tomatinase

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

trpB - gene codificante da subunidade B da triptofano sintase

txtAB - operon com os genes txtA e txtB que codificam sintetases da taxtomina A

U - Unidade

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

YME - Yeast Malt Extract

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. A cultura da batata.....	2
2.2. Sarna da batata.....	4
2.3. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> e as espécies causadoras da sarna da batata.....	6
2.3.1. <i>Streptomyces scabiei</i>	8
2.3.2. <i>Streptomyces acidiscabies</i>	8
2.3.3. <i>Streptomyces caviscabies</i>	9
2.3.4. <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	9
2.3.5. <i>Streptomyces reticuliscabiei</i>	10
2.3.6. <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> e <i>S. stelliscabiei</i>	10
2.3.7. <i>Streptomyces luridiscabiei</i> , <i>S. puniscabiei</i> e <i>S. niveiscabiei</i>	11
2.3.8. <i>Streptomyces ipomoeae</i>	11
2.3.9. <i>Streptomyces brasiliscabiei</i>	11
2.3.10. Outras espécies associadas à sarna da batata	12
2.4. Ciclo da doença.....	12
2.5. Estratégias de manejo da sarna da batata.....	14
2.5.1. Uso de cultivares resistentes	14
2.5.2. Batata-semente certificada	16
2.5.3. Tratamento de tubérculos.....	17
2.5.4. Umidade do solo.....	17
2.5.5. Acidificação do solo.....	18
2.5.6. Rotação de culturas	19
2.5.7. Controle químico.....	19
2.5.8. Controle biológico.....	21
2.5.9. Interferência na síntese de taxtomina	22
2.5.10. Identificação das espécies patogênicas	23
2.6. Caracterização de <i>Streptomyces</i> spp	23
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Linhagens	27
4.2. Caracterização morfológica.....	28
4.2.1. Crescimento bacteriano em diferentes meios de cultivo	28
4.2.2. Micromorfologia de hifas e esporos.....	29
4.3. Caracterização fisiológica	30

4.4. Caracterização bioquímica	30
4.5. Caracterização molecular	31
4.5.1. Extração de DNA cromossômico	31
4.5.2. Amplificação por PCR	32
4.5.3. Sequenciamento	35
4.5.4. Análise de PCR-RFLP do gene <i>atpD</i>	35
4.5.5. Análise de filogenéticas.....	36
4.6. Caracterização patogênica.....	36
4.6.1. Amplificação dos genes de patogenicidade.....	36
4.6.2. Teste de patogenicidade em sementes de rabanete.....	36
4.6.2. Teste de patogenicidade em discos de batata	37
4.7. Análise genômica	38
4.7.1. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma	38
4.7.2. Análises de identidade de nucleotídeo média (ANI) e hibridização <i>in silico</i> DNA- DNA (isDDH).....	39
4.8. Boletim Técnico.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Caracterização morfológica.....	40
5.1.1. Crescimento bacteriano em diferentes meios de cultivo	40
5.1.2. Micromorfologia de hifas	57
5.2. Caracterização bioquímica	63
5.3. Caracterização fisiológica	66
5.4. Caracterização patogênica.....	69
5.4.1. Teste de patogenicidade em sementes de rabanete.....	69
5.4.2. Teste de patogenicidade em discos de batata	71
5.4.3. Avaliação da presença dos genes de patogenicidade <i>txtAB</i> , <i>necl</i> e <i>tomA</i>	72
5.5. Caracterização molecular	75
5.5.1. Análise PCR-RFLP do gene <i>atpD</i> <i>in silico</i>	75
5.5.2. Análise filogenética.....	78
5.5.2.3. Análise de MLSA dos genes 16s RNAr, <i>atpD</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i> e <i>trpB</i>	82
5.6. Análise genômica	84
5.6.1. Análises de identidade de nucleotídeo média (ANI) e hibridização <i>in silico</i> DNA- DNA (isDDH).....	84
5.7. Boletim Técnico.....	86
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
7. CONCLUSÕES.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	90
9. MATERIAL COMPLEMENTAR	116

1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) pertence à família das solanáceas, é originária da região andina e encontra-se na quarta colocação como alimento mais produzido do planeta (FIERS et al., 2012). Devido às suas características nutricionais, sua participação como uma das inúmeras culturas difundidas pelo globo, além de pertencer à programas de erradicação da fome no mundo por organizações responsáveis (STARK; THORNTON; NOLTE, 2020).

Em 2018, a produção brasileira de batata foi de aproximadamente 3,7 milhões de toneladas (t), em uma área de 118,5 mil hectares (ha) gerando, assim, um rendimento de 31,1 t/ha. Analisando os dados médios de produção entre os anos de 2010 a 2018 verificou-se uma estagnação na produção devido à redução de áreas de plantio notada a cada safra, porém com o avanço das tecnologias houve aumento no rendimento produtivo da batata (FAO, 2018).

De forma geral, o rendimento produtivo da cultura em solo brasileiro está aumentando, porém ainda é considerado pequeno levando-se em consideração o crescimento da produtividade dos países asiáticos e europeus. Essa inferioridade de produção pode estar associada a diversos fatores, dentre eles, os problemas fitossanitários que são de grande importância, pois causam aumento de custo na produção e perdas significativas da cultura (ZAMBOLIM et al., 2009).

A cultura da batata é acometida por diversas doenças, tendo suas causas associadas a bactérias, fungos, vírus, nematoides e insetos (MULDER; TURKENSTEEN, 2005; FIERS et al., 2012).

As bacterioses aparecem em destaque perante as demais doenças ocasionadas na cultura da batata devido às dificuldades no seu controle, uma vez que não há, até o momento, uma medida eficaz de contenção dos patógenos bacterianos (LOPES; DUVAL, 2007). Dentre elas, podemos citar a sarna da batata, uma doença que afeta as partes subterrâneas da planta, principalmente os tubérculos. Os sintomas externos causados afetam a qualidade do produto interferindo no seu valor comercial devido à rejeição estética no caso do consumo *in natura*, sendo vetada também para a produção de batatas-semente (DEES; WANNER, 2012).

No Brasil, é crescente a preocupação em relação à frequência com que a sarna da batata vem ocorrendo nas lavouras e o controle químico, atualmente preconizado no Brasil, tem se mostrado insatisfatório no manejo dessa doença (ZAMBOLIM et al., 2009).

Desta forma, um conjunto de medidas deve ser adotado como estratégia preventiva e dentre estas podemos citar a utilização de sementes sadias certificadas, áreas de plantio livres da doença, rotação de culturas e manejo na irrigação. No período atual onde as áreas estão cada

vez mais escassas e cultivadas com frequência, o produtor dificilmente consegue realizar todas essas medidas, ocasionando o descontrole da doença (LOPES; ZAMBOLIM, 2007).

Para que um programa de manejo seja considerado eficiente é de suma importância que inicialmente seja efetuado um levantamento das espécies patogênicas causadoras da sarna presentes na região ou país de interesse, uma vez que os agentes causais podem variar dependendo da localidade assim avaliada (DEES; SLETTEN; HERMANSEN, 2013; DEES; WANNER, 2012).

Diversos estudos demonstraram que o passo inicial e mais crucial para o desenvolvimento de uma estratégia de controle da sarna deve ser o levantamento das espécies patogênicas presentes na área de produção e os mecanismos que envolvem sua patogenicidade. Nesse sentido, estudos taxonômicos de diferentes espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata vem sendo realizados com o objetivo de elucidar as relações filogenéticas e diferenciar as principais espécies causadoras da doença facilitando, assim, o processo de identificação dos patógenos presentes em diferentes países produtores de batata (DEES; WANNER, 2012; FIERS et al., 2012; LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

No Brasil, estudos de levantamento e caracterização de linhagens de *Streptomyces* sp. associadas à sarna da batata provenientes das principais regiões produtoras do país revelaram a ocorrência de novas espécies de *Streptomyces*. Essas linhagens se mostraram geneticamente distintas quando comparadas com as 12 espécies Tipo de *Streptomyces*, já descritas, associadas à sarna da batata (CORRÊA 2015).

O fato do patossistema das espécies de *Streptomyces* no desenvolvimento da sarna da batata envolver fatores ainda não conhecidos ou pouco estabelecidos faz com que a comunidade científica reflita que somente novas pesquisas possam trazer respostas mais definitivas para esse sistema patogênico. Dessa forma, a caracterização e identificação dessas no país se faz necessária para que medidas corretas de manejo sejam adotadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.A cultura da batata

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.), ficou conhecida após as expedições dos exploradores espanhóis pelas Américas no início de 1500. A descoberta da sociedade andina surpreendeu não só pela sua numerosa população, que consistia de aproximadamente 10 milhões de pessoas, como também pelo seu complexo agrícola de uma cultura ainda

desconhecida, mas difundida pela sociedade sul-americana antiga, a batata (STARK; THORNTON; NOLTE, 2020).

Esta cultura diversa e adaptável se espalhou desde sua origem na região andina para todas as zonas de elevação em regiões temperadas de todos os continentes. Com o interesse em sua domesticação, a sua produção tem aumentado em regiões de clima quente, úmido e tropical. Os avanços na área de melhoramento genético têm tornado a batata uma cultura cada vez mais importante e diversificada em termos de produção e consumo. Estudos sobre o uso desse tubérculo continuam não apenas com relação à sua característica como fonte energética da alimentação básica, mas também para gerenciamento de saúde e bem-estar, incluindo a prevenção do aparecimento de doenças crônicas (ZAHEER; AKHTAR, 2016).

Em 2014, os dados de produção de batata foram relatados em 159 países (82% dos países do mundo) pelo Banco de Dados Estatísticos das Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO 2017), demonstrando status da batata como uma cultura com relevância global (WIJESINHA-BETTONI; MOUILLÉ, 2019).

O plantio anual de batata ocupa cerca de 20 milhões de hectares (ha) distribuídos no planeta, o que resulta numa produção mundial de mais de 320 milhões de toneladas. A produtividade média varia entre 10 e 50 toneladas/hectare e está relacionada a fatores climáticos (chuvas e temperaturas), geográficos (luminosidade), fitossanitários (pragas e doenças), genéticos (cultivares), tecnológicos (insumos, máquinas, pesquisas) e políticos (legislações e fiscalizações) (AGRIANUAL, 2018).

Em 2018, a produção brasileira de batata foi de aproximadamente 3,7 milhões de toneladas (t), em uma área de 118,5 mil hectares (ha) gerando assim um rendimento de 31,1 t/ha. Analisando os dados médios da produção dessa cultura dos anos de 2010 a 2018 houve uma estagnação na produção devido à redução de áreas de plantio notada a cada safra, porém com o avanço das tecnologias houve aumento no rendimento produtivo das safras sem aumento de área plantada (FAO, 2018) (FIGURA 1). Esse aumento se deve principalmente aos avanços tecnológicos, profissionalização dos produtores, melhorias nas condições de cultivo (nutrição e irrigação) e qualidade da batata-semente (JADOSKI et al., 2009).

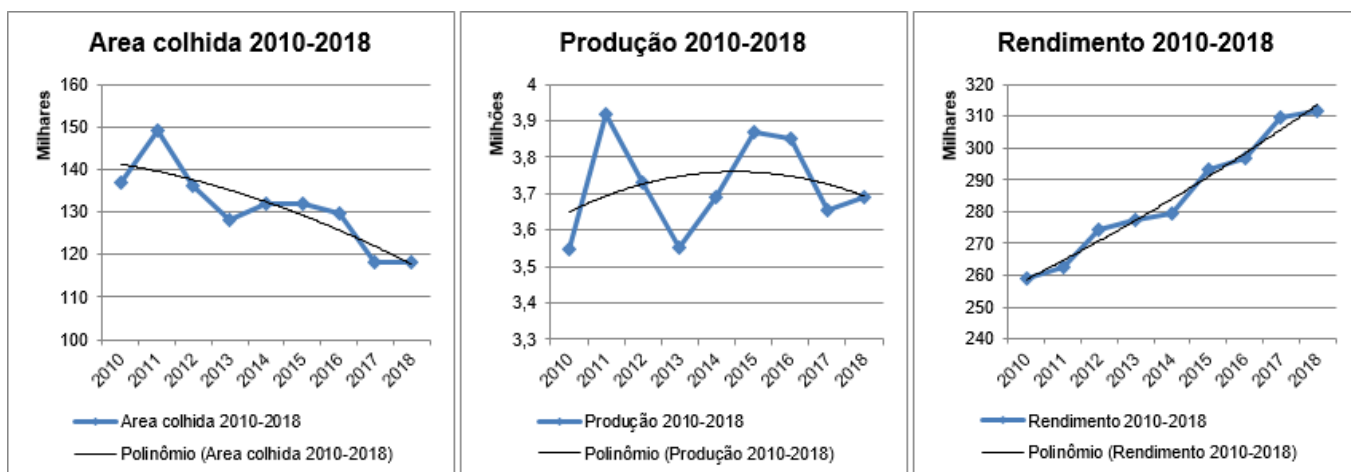


FIGURA 1. Gráfico de área colhida (ha), produção (t) e rendimento médio (kg/ha) de batata no período de 2010-2018. Fonte dos dados FAO (2018).

De forma geral, o rendimento produtivo da cultura em solo brasileiro está aumentando, porém ainda é considerado pequeno levando-se em consideração o crescimento da produtividade dos países asiáticos e europeus. Essa inferioridade de produção pode estar associada a diversos fatores, dentre eles, os problemas fitossanitários que são de grande importância, pois causam aumento de custo na produção e perdas significativas da cultura (ZAMBOLIM et al., 2009).

A cultura da batata pode ser acometida por mais de 40 pragas e doenças causadas por fungos, vírus, bactérias, nematoides e insetos, podendo afetar todas as partes da planta. Esses organismos causam danos e perdas significativas na cultura, elevando os custos de produção e dificultando a comercialização (FIERS et al., 2012). De acordo com a Associação Brasileira de Batata (ABBA), as perdas por descarte e problemas fitossanitários podem passar de 10% da produção (SHIMOYAMA, 2014).

2.2. Sarna da batata

Dentre as doenças mais recorrentes nas regiões produtoras do Brasil está a sarna da batata, doença causada por diferentes espécies do gênero *Streptomyces*, caracterizada por lesões na superfície do tubérculo, que levam a diminuição do seu valor comercial ou até impedem sua comercialização, tanto para consumo quanto para uso de batata-semente (DEES; WANNER, 2012; JANSKY et al. 2017).

A sarna da batata é uma doença bacteriana complexa com grande diversidade de sintomas e número de agentes causais associados. A severidade da doença e a ocorrência dos

sintomas podem variar de acordo com o ambiente, suscetibilidade da cultivar plantada e a virulência do patógeno (LORANG et al., 1995; TOTH et al., 2001; CLARK et al., 2020). O ambiente tende a determinar as condições favoráveis ou desfavoráveis ao desenvolvimento do potencial patogênico e a cultivar tem influência no desenvolvimento da doença de acordo com sua resistência ou suscetibilidade à infecção pelo patógeno (CORRÊA, 2011; CLARK et al., 2020; LI et al., 2019b). Ainda, as principais variações nos sintomas e na severidade são determinadas pelo patógeno associado e seu grau de virulência (LINDHOLM et al., 1997), no entanto, linhagens dentro de uma mesma espécie patogênica variam em sua agressividade e tipo de sintoma apresentado (WANNER, 2004; WANNER; HAYNES, 2009). Embora não há bases fisiológicas ou genéticas diretas para explicar as diferenças na agressividade, estudos genômicos e metabolômicos da interação planta-patógeno passam a ser discutidas (WANNER; HAYNES, 2009; LI et al. 2019b). A variação dos sintomas permite uma classificação em diferentes tipos de sarna, como sarna superficial, reticulada, erupente ou profunda (CULLEN; LESS,2007; CORREA, 2011) (FIGURA 2). Outra sintomatologia raramente encontrada e descrita em relatos na América do Norte (HARRISON, 1962) e no Japão (ONIKI et al., 1986) é a sarna avermelhada, aparentando as mesmas características dos sintomas do aspecto reticulado, porém com coloração das lesões de tons avermelhados (FAUCHER et al., 1993).

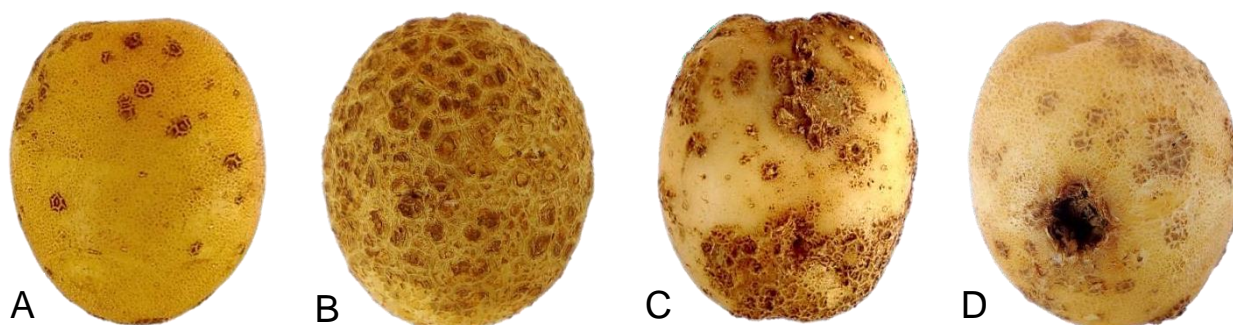


FIGURA 2. Sintomas de sarna comum da batata causada por *Streptomyces* spp.

A–Lesão superficial; **B** – Lesão reticulada; **C** – Lesão erupente; **D** – Lesão profunda.

Fonte: Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LBV)/CAPSA/Instituto Biológico, Campinas, SP.

A sarna da batata é uma das doenças mais devastadoras da cultura, causando prejuízos econômicos aos países produtores no mundo (AL-MUGHRABI et al., 2016; BENCHEIKH et al., 2007). O patógeno se espalhou devido à sua natureza saprófita, podendo sobreviver a invernos rigorosos ou períodos sem cultivo da planta hospedeira, tornando-se

assim uma fonte permanente de inóculo para as próximas temporadas de plantio (WANNER; KIRK 2015). Essa doença já foi relatada em diversas regiões do globo como Alemanha, Espanha, França, Holanda, Reino Unido (FLORES-GONZÁLEZ; VELASCO; MONTES, 2008; LEIMINGER et al., 2013), China (ZHANG et al., 2013), África do Sul (SLABBERT et al., 1994), Canadá (ST-ONGE et al., 2008), Coreia do Sul (SONG et al., 2004), Paquistão (AHMAD et al., 2020), Irã (KALANTAR et al., 2006) Rússia (LYSENKO et al., 2005), Estados Unidos (WANNER, 2006; WANNER, 2007), dentre outras nações.

No Brasil a sarna da batata é uma das doenças mais importantes economicamente e está amplamente distribuída nas regiões produtoras da cultura, tornando-se um fator limitante no seu cultivo (CORRÊA et al., 2011).

2.3. Ciclo de vida de *Streptomyces* e as espécies causadoras da sarna da batata

O gênero *Streptomyces* está composto por 1008 espécies (<https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>) e a maior parte delas é composta por organismos saprófitos que vivem no solo, produzindo enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de polímeros derivados de planta e/ou animais, como celulose, lignina e quitina, realizando um dos papéis fundamentais do ciclo do carbono na natureza (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Esses organismos são particularmente conhecidos pela produção de numerosos metabólitos bioativos com aplicações úteis aos humanos, na medicina veterinária e na agricultura (CHATER, 2016). No ambiente natural, as espécies de *Streptomyces* produzem esses metabólitos como uma estratégia para aquisição de nutrientes, na sinalização e comunicação intercelular ou até mesmo matando ou inibindo o crescimento de outros microrganismos (WIETZ et al., 2013).

As espécies do gênero *Streptomyces* são conhecidos por formar relações simbióticas com diferentes organismos eucarióticos como plantas, insetos e animais marinhos, e foi proposto que os diversos metabólitos especializados produzidos por linhagens de *Streptomyces* podem ter evoluído como resultado direto de tais interações (SEIPKE et al., 2013). A capacidade de algumas espécies de *Streptomyces* em estabelecer interações antagonistas com plantas levou ao desenvolvimento de doenças agrícolas economicamente importantes. Este é um atributo raro entre as espécies do gênero, pois apenas cerca de aproximadamente dezesseis espécies das centenas das demais descritas são conhecidas por apresentarem ação fitopatogênica (BIGNELL; FYANS; CHENG, 2014).

O genoma das espécies de *Streptomyces* possui um único cromossomo linear com longas sequências terminais repetidas invertidas (*long terminal inverted repeats*), que protegem o DNA da degradação das nucleases do solo (LIN et al., 1993; WANNER; KIRK, 2015). O tamanho total do genoma dessas espécies está entre 8 a 12 Mb, onde aproximadamente 4,5 a 6 Mb correspondem aos genes conhecidos como *housekeeping*, que são necessários para o crescimento e metabolismo. Por outro lado, os cassetes de genes ou operons que codificam uma ampla variedade de metabólitos secundários estão, em sua maioria, nos 2 a 3 Mb finais de cada extremidade do cromossomo (CHATER et al., 2010; WANNER; KIRK, 2015).

Essas bactérias são caracterizadas também pela estrutura filamentosa e formação de esporos. A rede de filamentos secreta enzimas catabólicas que degradam o substrato orgânico quebrando-o em micromoléculas assimiláveis que promovem, assim, o crescimento da colônia. A privação de nutrientes ou fatores ambientais ativam o desenvolvimento de hifas aéreas, que se fragmentam formando uma cadeia de esporos. Os esporos são resistentes à dessecação e podem ser carregados pelo vento, pela água ou transportados por animais presentes no solo. Esses esporos germinam independentemente de nutrientes e formam micélios ramificados multinucleados, completando o ciclo de vida da bactéria (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). A senescência do micélio vegetativo é a fase na qual há uma grande produção e secreção de metabólitos secundários incluindo compostos antimicrobianos (HORINOUCI, 2002; LI et al., 2019b) (FIGURA 3).



FIGURA 3. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.

A sarna da batata pode ser causada por um grupo polifilético de espécies do gênero *Streptomyces* que apresentam diferenças na morfologia, fisiologia e características moleculares. Essas espécies foram bem caracterizadas e vêm sendo encontradas em diferentes países causando uma diversidade de sintomas. São elas:

2.3.1. *Streptomyces scabiei*

A primeira espécie descrita como causadora da sarna foi *S. scabiei* (sin. *S. scabies*) (LAMBERT; LORIA, 1989a). Essa espécie é considerada a espécie patogênica mais predominante e presente em diversas regiões produtoras do mundo, principalmente em solos secos, de pH neutro a alcalino (DEES; WANNER, 2012). Córrea e colaboradores (2015) demonstraram, pela técnica de PCR-RFLP, a presença desta espécie em todos os campos de produção brasileira de batata. Evidências sugerem que *S. scabiei* é uma espécie heterogênea carregando grupos genéticos diferentes, com variação no grau de patogenicidade (GOYER; BEAULIEU 1997; LIANG et al., 2019). Essa espécie causa sintomas de sarna comum e apresenta filamentos miceliais muito finos que se ramificam a partir de um eixo central e assim formam uma cadeia espiral de esporos. Linhagens dessa espécie são caracterizadas por coloração cinza, com produção pigmentos melanoides em meio de cultivo contendo tirosina e utilizam todos os carboidratos estabelecidos nos testes bioquímicos pelo ISP (*International Streptomyces Project*) (LAMBERT; LORIA, 1989a; SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

2.3.2. *Streptomyces acidiscabies*

Descrita por Lambert e Loria (1989b), esta espécie bacteriana tem como característica principal o crescimento em substratos com pH abaixo de 5,2 causando, assim, os sintomas de sarna em tubérculos cultivados sob solos ácidos. Foi detectada antes mesmo de sua caracterização em 1953, ocorrendo em solos com valores de pH 4,5 na região de Maine (EUA) (BONDE; McINTYRE, 1968; MANZER; McINTYRE; MERRIAM, 1977). Estudos demonstraram predominância de *S. acidiscabies* sobre *S. scabiei* em isolamentos realizados em tubérculos de campos de produção na Coréia do Sul (MUN et al., 2007). *S. acidiscabies* possui micélios aéreos ramificados de cadeias flexuosas com esporos de coloração branca, rósea, laranja-palha, amarelo-palha ou laranja-cinza-palha. Produz pigmento solúvel vermelho em pH acima de 8,3 e amarelo-dourado em pH abaixo desse valor, porém não produz pigmentos

melanóides nos meios específicos para essa caracterização. Dos carboidratos do ISP, essa espécie utiliza todos, exceto a rafinose (LAMBERT; LORIA 1989b).

2.3.3. *Streptomyces caviscabies*

Streptomyces caviscabies foi observada causando sintomas de sarna profunda na região de Quebec, Canadá (FAUCHER; SAVARD; BEAULIEU,1992; FAUCHER et al., 1995). Essa espécie foi caracterizada e descrita posteriormente por Goyer, Faucher e Beaulieu (1996). Recentemente seu primeiro relato causando sintomas nas regiões produtoras da China, acendeu um alerta sobre esta espécie (GONG et al., 2017). No Brasil, Corrêa e colaboradores (2015) demonstraram a presença de *S. caviscabies* em amostras de batata colhidas em solo nacional. Essa espécie apresenta micélios aéreos com cadeia de esporos do tipo flexuosa e de coloração branca a amarelada, não é produtora de melanina no meio de tirosina ágar, não cresce em pH inferior a 5 e utiliza apenas rafinose como fonte de carbono, segundo o ISP. Com base em sequências do gene ribossomal 16S foi proposto que *S. caviscabies*, *S. setonii* e *S. griseus* pertençam a uma mesma espécie genômica com características morfológicas e quimiotaxonômicas comuns. Dessa forma, *S. caviscabies* e *S. setonii* foram propostas como sinônimos de *S. griseus* (LIU et al., 2005).

2.3.4. *Streptomyces turgidiscabies*

Essa espécie bacteriana foi observada na Ilha de Hokkaido no Japão (TAKEUCHI et al., 1995) e descrita posteriormente por Miyajima e colaboradores (1998). É causadora de lesões do tipo erupente e causa sintomas que diferem daqueles usuais de sarna superficial ou profunda. Além disso, apresenta baixa similaridade em nível de DNA comparado com outras espécies causadoras da sarna comum (MIYAJIMA et al., 1998; KIM et al., 1998). Relatadas na China (ZHAO et al., 2008), Espanha (SARWAR; LATIF; CABALEIRO, 2017), Finlândia e Coreia do Sul (SONG et al., 2004) apresentaram alta similaridade do gene ribossomal 16S e região espaçadora 16S-23S DNAr com isolados do Japão, indicando a ocorrência desta espécie nesses países. *S. turgidiscabies* apresenta micélios aéreos com ramificações formando cadeias de esporos flexuosas de coloração cinza. Não produz pigmentos melanóides ou outros pigmentos difusíveis e utiliza todos os carboidratos (ISP) como fonte de carbono. Assim como *S. acidiscabies*, essa espécie é tolerante às condições de pH ácido (MIYAJIMA et al., 1998).

2.3.5. *Streptomyces reticuliscabiei*

Espécie isolada na França, *S. reticuliscabiei* é descrita como causadora de um novo tipo de sarna, a reticulada (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000). É genomicamente muito similar à *S. turgidiscabiei*, porém são consideradas espécies distintas devido às diferenças na virulência e patogenicidade (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2006). *S. reticuliscabiei* possui cadeias de esporos flexuosas com coloração cinza, não é produtora de melanina em meio de tirosina e utiliza todos os açúcares ISP como fonte de carbono (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

2.3.6. *Streptomyces europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*

Bouček-Mechiche e colaboradores (2000) observaram fenotipagem heterogênea em análises morfológicas e fisiológicas de linhagens de *S. scabiei* demonstrando uma divisão em três genomoespécies, *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*, ou seja, essas espécies apresentavam características fenotípicas distintas e também podiam ser separadas por características bioquímicas.

A espécie *S. europaeiscabiei* foi descrita na França (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000) e relatada em diferentes países da Europa. Um levantamento realizado em diferentes campos de produção de países como Alemanha, Espanha, França, Holanda e Reino Unido indicou que *S. europaeiscabiei* foi a principal espécie associada à sarna da batata, constituindo-se, portanto, em patógeno emergente naquela região da Europa (FLORESGONZALES; VELASCO; MONTES, 2008). Esta espécie bacteriana também já foi relatada no Canadá, Uruguai, Coréia do Sul e Estados Unidos (SONG et al., 2004; LAPAZ et al., 2017; WANNER, 2006). *S. europaeiscabiei* produz esporos em cadeias espiraladas de coloração cinza, é produtora de melanina em meio com tirosina e utiliza todos os carboidratos ISP. Além de tubérculos de batata, esta espécie também foi detectada em beterraba, cenoura e rabanete (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

A espécie *S. stelliscabiei* possui características muito semelhantes à *S. europaeiscabiei*, no entanto, foi isolada de lesões de sarna comum em forma de estrela, diferenciando-a e dando nome a espécie (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

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

O avanço nas técnicas de biologia molecular, tais como o sequenciamento da região espaçadora 16S-23S DNAr e hibridização DNA-DNA, possibilitou a caracterização de três novas espécies de *Streptomyces*, isoladas na Coréia do Sul, que induziam sintomas erupentes em batatas cultivadas em solos ácidos (PARK et al., 2003). A designação dada a essas espécies deu-se principalmente pela sua coloração apresentada. *S. luridiscabiei* apresenta esporos de coloração amarelo claro em cadeias flexuosas simples e retas; *S. puniscabiei* produz esporos alaranjados, em cadeias retas e *S. niveiscabiei* produz esporos brancos e cadeias de esporos simples, flexuosas e retas. Essas espécies utilizam todos os carboidratos do ISP. Somente a espécie *S. niveiscabiei* não produz melanina (PARK et al., 2003).

2.3.8. *Streptomyces ipomoeae*

Essa espécie é causadora de sarna em batata-doce e foi descrita no início da década de 40 por Person e Martin (1940) e Waksman e Henrici (1941). Os esporos apresentam-se em cadeias curtas, espiraladas abertas, envolvidas por uma bainha (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). *S. ipomoeae* apresenta morfologia e fisiologia distintas de outras espécies causadoras da sarna. Normalmente as espécies tem sua associação patogênica à cultura da batata, podendo atingir casualmente outras culturas de tubérculos, porém, *S. ipomoeae* foi descrita, e é a principal espécie causadora de sarna em plantios de batata doce e outros membros da família Convolvulaceae (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

2.3.9. *Streptomyces brasiliscabiei*

Essa é a primeira espécie fitopatogênica do gênero identificada na América do Sul que causa sarna da batata, proveniente de lesões típicas da doença em tubérculos de batata do estado de Santa Catarina, Brasil. Possui cadeias de esporos do tipo espiral com coloração creme/cinza amarronzada, coloração das colônias marrom escura com bordas avermelhadas, produz melanina em meio de tirosina e utiliza todos os açúcares ISP como fonte de carbono (CORRÊA et al. 2021).

2.3.10. Outras espécies associadas à sarna da batata

Streptomyces alkaliscabies foi isolada em batatas cultivadas no deserto ocidental do Egito. A descrição dessa espécie foi baseada na comparação da região espaçadora 16S-23S DNAr com a das demais linhagens patogênicas. Sua principal característica é o crescimento e potencial patogênico em valores altos de pH (ABDEL-RAHMAN et al., 2012).

Streptomyces sampsonii e *S. setonii* foram relatadas no trabalho de Millard e Burr (1926). Ambas espécies estão presentes em algumas regiões de produção de batata no Brasil (CORREA et al., 2015). Recentemente, foi publicado um estudo de manejo da sarna da batata causada por *S. setonii*, porém os autores relataram que uma das dificuldades encontrada foi a pouca exploração na descrição dessa linhagem (KAUR et al., 2018).

Streptomyces aureofaciens é considerada um organismo de solo, mas que eventualmente pode incitar doenças em batata, causando lesões superficiais (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

Streptomyces sp. *IdahoX* foi descrita como um isolado saprofítico e endêmico de regiões dos estados de Idaho, Washintgon e Wisconsin que adquiriu a capacidade fitopatogênica através de transferência horizontal de genes de patogenicidade por meio de outras espécies de *Streptomyces* que infectavam essas regiões de plantio (WANNER, 2007).

2.4. Ciclo da doença

Esporos de *Streptomyces* contém um envoltório externo com parede mais espessa, que lhe conferem maior resistência às adversidades naturais (KUMAR; JADEJA, 2016). Os esporos permanecem de forma aglomerada no solo e as hifas crescem de forma radial e assim se propagam em sua forma vegetativa de crescimento, podendo viver saprofiticamente no solo (MAYFIELD et al., 1972).

As disseminações dos esporos no ambiente podem ocorrer através do vento, pela água, insumos ou até mesmo tubérculos infectados, sendo este último um dos principais fatores responsáveis pela introdução de espécies patogênicas de *Streptomyces* em campos de produção sadios (MANZER; STORCH; SEWELL, 1984; WHARTON et al., 2011).

Os esporos podem permanecer viáveis no solo por uma década (KRITZMAN et al., 1996) ou até 20 anos sem qualquer cultivo de batata (DIPPENAAR, 1933). Eles germinam e entram nos tecidos do tubérculo através de feridas, inserção radial das raízes, estômatos ou lenticelas (LOCCI, 1994; AGRIOS, 2005). As lenticelas mais jovens provavelmente

representam a maior porta de entrada para *Streptomyces*, pois ainda não há formação de uma camada de suberina protetora (LOCCI, 1994). Loria e colaboradores (2006) demonstraram que a penetração pode ocorrer também através das paredes celulares durante as etapas de crescimento. Tubérculos jovens são mais suscetíveis durante a terceira e quarta semana após o início da tuberização (KHATRI et al., 2011; AGRIOS, 2005). Conforme as células hospedeiras morrem, elas acabam fornecendo nutrientes para o desenvolvimento bacteriano. Posteriormente, as células hospedeiras vivas ao redor da área da infecção dividem-se e produzem camadas de células corticosas formando uma lesão no estilo de crosta no tubérculo (WHARTON et al., 2011) (FIGURA 4).

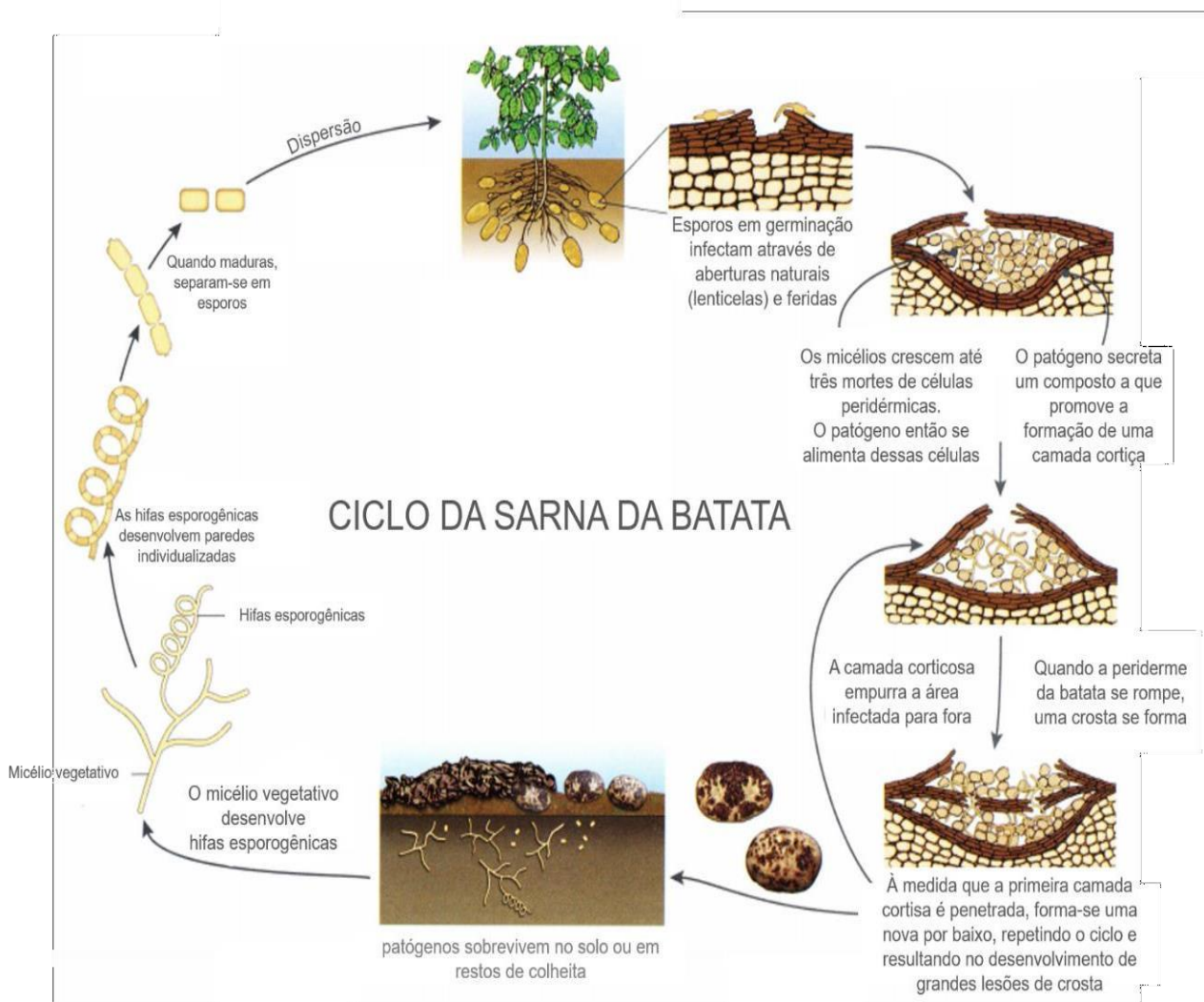


FIGURA 4. Ciclo da sarna comum da batata. Fonte: WHARTON et al., 2011. Traduzido nesse trabalho.

Os diferentes tipos de lesões discutidos nessa revisão podem ser observados no mesmo tubérculo, podendo coalescer formando grandes áreas afetadas na superfície da batata.

Os tipos de lesões formadas e a extensão que afeta o tubérculo são influenciados por fatores ambientais, suscetibilidade da cultivar plantada e complexidade da microbiota do solo, incluindo os perfis de virulência da linhagem de *Streptomyces* envolvida, pois infecções mais precoces acarretam uma maior extensão das lesões (LOCCI, 1994; LORIA et al., 1997; BOUCHECK-MECHICHE et al., 2000b; RODRIGUS NETO; DESTEFANO; SHIMOYAMA, 2008).

O aumento da incidência da sarna da batata nos campos de produção pode ser devido a diversos fatores como adaptação ou predominância de espécies de *Streptomyces* fitopatogênicas, aumento de áreas de plantio com variedades de batata suscetíveis à doença, plantio contínuo em áreas de conhecida infestação, dispersão de espécies patogênicas através de batata-semente contaminada; e práticas culturais que possam promover condições favoráveis à sarna, como a compactação de solo ou alteração da microbiota do solo devido ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas (RODRIGUS NETO; DESTEFANO; SHIMOYAMA, 2008).

2.5. Estratégias de manejo da sarna da batata

Diferentes estratégias de manejo são discutidas a fim de se reduzir a incidência e severidade da sarna como o uso de cultivares resistentes à doença, a certificação de batata-semente, o tratamento dos tubérculos, manutenção da umidade do solo para o aumento de ação microbiana de antagonistas, acidificação do solo, rotação de culturas com espécies vegetais não hospedeiras e uso de produtos químicos e biológicos (BRAUN et al., 2017; RODRIGUS NETO; DESTEFANO; SHIMOYAMA, 2008).

2.5.1 Uso de cultivares resistentes

O uso de cultivares resistentes é apontado como a forma de controle mais eficaz para a sarna da batata, evitando impacto ambiental com defensivos agrícolas e reduzindo o custo da produção final (DEES; WANNER, 2012; WANNER; KIRK, 2015; CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995).

O mecanismo de tolerância à sarna da batata é complexo e um dos principais fatores que determinam a resistência é a morfologia das lenticelas que o tubérculo apresenta. Nas variedades mais tolerantes as lenticelas são menores e com maior acúmulo de parênquima. O mecanismo tem uma relação com a quantidade de ácido clorogênico e tirosinase presentes na

periderme do tubérculo, uma vez que, por ocasião de injúrias no tecido vegetal, haverá oxidação desses compostos gerando substâncias tóxicas a microrganismos, como as quinonas (LUTMAN, 1914).

Os mecanismos e a base genética envolvidos na tolerância à sarna ainda são muito discutidos. Alguns estudos genéticos indicaram que múltiplos genes estão envolvidos na resistência ou na suscetibilidade das cultivares. A resistência das plantas à sarna comum não parece seguir o típico modelo de resistência, não havendo evidências comprobatórias de expressão de genes relacionados à defesa em tubérculos com sintomas de sarna comum (DEES; WANNER, 2012; FLINN et al. 2005).

Em testes de patogenicidade em casa de vegetação com condições controladas, tanto ambientais quanto de inóculo aplicado de *Streptomyces*, foram verificadas variações de sintomas de sarna comum (de ausência à severidade máxima) em tubérculos de uma mesma planta, em um mesmo vaso. Essa variação dificulta as análises dos dados, seleção por linhagens resistentes por fenotipagem e o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência (DEES; WANNER, 2012).

Clarke e colaboradores (2019) demonstraram que as cultivares podem apresentar resistência a uma determinada espécie de *Streptomyces*, porém não são resistentes a todas as linhagens bacterianas patogênicas.

Tem sido proposto como um mecanismo de resistência entre as cultivares o conteúdo de açúcares redutores na casca do tubérculo que está positivamente correlacionado com a severidade da sarna comum e a capacidade de glicosilação da taxtomina (fitotoxina), inativando-a parcialmente (GOTO, 1981; ACUÑA et al., 2001).

Alguns estudos têm se mostrado promissores utilizando a taxtomina A como agente seletivo para eliminação de progênies sensíveis à sarna comum em populações de melhoramento genético de batata (HILTUNEN et al., 2011). Há também estudos na seleção de células somáticas para isolar variantes de batata da cultivar Russet Burbank com resistência à sarna (WILSON et al. 2010).

No Brasil, as cultivares Àgata e Asterix, que representam 60% e 15% da produção brasileira, respectivamente, são consideradas suscetíveis à sarna da batata (IMARK, 2007; GARCIA, 2008; FISHCER et al., 2009; HAYNES et al., 2010; NAVARRO et al., 2015). As cultivares Mondial e Voyager são consideradas tolerantes à doença no Brasil, porém ocupam menos de 2% das áreas de produção na bataticultura nacional (ANDREATTE, 2007; GARCIA, 2008; FISHCER et al., 2009). As cultivares Mondial e Atlantic foram indicadas como as mais apropriadas para plantio em regiões com histórico de sarna comum da batata, uma vez que

mostraram menor incidência dos sintomas da doença (GARCIA, 2008).

São muitos os fatores limitantes para o desenvolvimento de cultivares resistentes à sarna: **1)** faltam estudos na área de fisiologia da planta visando a resposta dessa às diferentes linhagens de *Streptomyces* e suas fitotoxinas, ou seja, se há produção de moléculas na planta que induzem a produção de compostos pela bactéria; **2)** mapeamento de genes de resistência ou suscetibilidade para o uso em programas de melhoramento; **3)** identificação de novas melhores fontes de resistência partindo de espécies selvagens (WANNER; KIRK, 2015).

O desenvolvimento de novas estratégias de controle se torna difícil devido à falta de entendimento sobre as bases genéticas e fisiológicas das diferenças de severidade da doença, observadas nas cultivares de batata. No que se refere ao patógeno, faltam estudos direcionados à compreensão das diferenças de agressividade de isolados de *Streptomyces* (DEES; WANNER, 2012).

2.5.2. Batata-semente certificada

Linhagens fitopatogênicas de *Streptomyces* podem sobreviver nos tecidos de plantas infectados (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008). Tubérculos semente contaminados podem ser considerados importante fonte de disseminação de novas linhagens ou espécies patogênicas de *Streptomyces* para regiões até então sadias (WILSON; RANSON; PEMBERTON, 1999).

A sarna comum da batata foi apontada como a doença bacteriana mais frequente em tubérculos semente importados de países do Norte da Europa, estando em 30% dos lotes espanhóis. Em 2003, 83% dos lotes importados apresentavam sintomas da doença, com lesões que cobriam mais de 50% da superfície do tubérculo (FLORESGONZÁLEZ; VELASCO; MONTES, 2008).

No Brasil, grandes prejuízos aos produtores foram associados a uma disseminação propagativa de *Streptomyces* oriunda da importação de tubérculos semente de outros países ou até mesmo proveniente de outros estados, fato esse que ressalta a necessidade de limitações fitossanitárias para o intercâmbio desse material. Dessa forma, a certificação dos tubérculos tem representado uma medida importante de garantia da sanidade do material vegetal adquirido (ZAMBOLIM et al., 2009).

Elaborada pelo MAPA, a Instrução Normativa (IN) nº 25 de 27 de junho de 2017 estabeleceu limites de tolerância das porcentagens de potencial de inóculo de linhagens de *Streptomyces* spp., consideradas pragas não quarentenárias regulamentadas, em batata-semente

a serem produzidas, importadas e comercializadas no país (MAPA, 2018). Embora estabelecidos tais limites de tolerância para as espécies causadoras de sarna da batata, essa IN tem possibilitado a entrada de tubérculos com certa porcentagem de sintomas da sarna sob a superfície de tubérculos importados, que podem estar contaminados por diferentes espécies de *Streptomyces* (CORRÊA, 2011).

As medidas legais são de suma importância para a proteção fitossanitária de um país, porém a legislação vigente para o controle da sarna da batata não exige a devida identificação dos agentes causais. Côrrea e colaboradores (2015) demonstraram a presença de *S. scabiei* em todas as regiões de produção brasileira, como também a de espécies até então não identificadas no país como *S. europaeiscabiei*, *S. caviscabiei* e *S. setonii*.

2.5.3. Tratamento de tubérculos

O tratamento dos tubérculos pode ser utilizado como prevenção da disseminação de *Streptomyces* para outras áreas de cultivo ou de potenciais linhagens patogênicas presentes no campo (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

Fungicidas como Fluazinam, Flusulfamida, Fenpiclonil e Mancozeb proporcionaram controle em porcentagens significativas da sarna em experimentos desenvolvidos na Austrália (WILSON; RANSON; PEMBERTON, 1999). Por outro lado, somente o fungicida Flusulfamida mostrou-se promissor em experimentos realizados na África do Sul (GOUWS, 2006). Al-Mughrab e colaboradores (2015) relataram que, em testes preliminares em campos de produção canadense, os tratamentos dos tubérculos semente com o fungicida Fludioxonil acrescido de um biopesticida contendo *Bacillus subtilis* representaram alternativas potenciais para o manejo da sarna da batata, apontando mais de 50% de redução em relação a severidade de *S. scabiei*.

2.5.4. Umidade do solo

Uma das medidas clássicas para a redução da sarna da batata é o aumento da irrigação, principalmente no período de tuberização, pois solos úmidos propiciam elevada taxa do crescimento de antagonistas, maior disponibilização de manganês e concentrações reduzidas de oxigênio. Essas condições desfavorecem o crescimento de linhagens de *Streptomyces* fitopatogênicas, além de ajudar os microrganismos antagônicos, pois, estes se desenvolvem mais rápido, colonizando e protegendo as lenticelas da infecção. Em condições de baixa

umidade as bactérias antagônicas aos patógenos, normalmente presentes nas lenticelas, desaparecem facilitando a colonização das espécies de *Streptomyces*. Além disso, durante o crescimento dos tubérculos os solos secos sensibilizam a parede celular, causando estresse hídrico sistemático da planta que a deixa mais suscetível às infecções (LEWIS, 1971).

Estudos sobre essa prática, mostraram que a sarna causada por *S. europaeiscabiei* e *S. turgidiscabies* pode ser reduzida por irrigação durante o início da formação dos tubérculos (JOHANSEN; DEES; HERMANSEN, 2015). Porém, há trabalhos que apresentaram resultados contrários, indicando maior severidade da sarna com o aumento da umidade do solo (LARKIN et al., 2011; SCHOLTE; LABRUYÈRE, 1985; WILSON et al., 2001). Ainda, há relatos de surtos da doença em solos úmidos e irrigados no Canadá, Europa e Israel (DOERING-SAAD et al., 1992; GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996; LINDHOLM et al., 1997).

2.5.5. Acidificação do solo

A redução dos valores de pH do solo abaixo de 5,2 é uma das medidas recomendadas principalmente para o manejo da sarna comum da batata causada pela espécie *S. scabiei*. Entretanto, outras espécies patogênicas que estão distribuídas no mundo, como *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*, toleram valores baixos de pH e para esses casos essa estratégia não se torna eficiente (LINDHOLM et al., 1997).

Marques (2019) demonstrou, por testes em casa de vegetação, que as espécies *S. acidiscabiei* e *S. scabiei* apresentaram diferenças nas porcentagens de incidência e severidade da doença quando submetidas a diferentes valores de pH. Apenas *S. acidiscabiei* apresentou sintoma de sarna em pH 4, porém a produtividade de batata em valor de pH tão baixo foi inferior aos demais pH testados. De acordo com Lambert e Loria (1989b), a redução de produtividade está relacionada a melhor disponibilidade de nutrientes em valores de pH mais neutros, próximos de 6,5. Há também que se considerar que solos mais ácidos limitam as espécies vegetais que podem ser empregadas na rotação de culturas.

Outro ponto a ser levantado é que o fertilizante sulfato de amônio, utilizado para diminuição dos valores de pH do solo, pode levar ao aumento da concentração de alumínio solúvel, o que estimula o crescimento de comunidades de organismos antagônicos às espécies de *Streptomyces* patogênicos à batata. Entretanto, a eficácia desse composto depende do tipo de solo, bem como da temperatura e umidade (MIZUNO; YOSHIDA; TADANO, 2000; STURZ et al., 2004).

2.5.6. Rotação de culturas

A rotação de culturas é uma medida importante a ser considerada no planejamento de lavouras de produção de batata, podendo ser utilizada como estratégia para reduzir a quantidade de inóculo de *Streptomyces* no solo. Não somente relacionado às propostas fitossanitárias, como também, com a fertilidade e estruturação do solo. O uso da técnica de rotação com cereais e gramíneas considerados não hospedeiros de *Streptomyces*, como arroz e trigo por exemplo, possibilitaram a redução da população dos patógenos e aumentaram a difusão de oxigênio, muito consumido pelo sistema radicular da batata (JADOSKI et al., 2009).

Estudo utilizando a rotação com canola e colza combinadas, e com o centeio de cobertura reduziu a severidade da sarna de 20 a 33%, quando comparada ao cultivo contínuo de batata sem cultura de cobertura (LARKIN; GRIFFIN; HONEYCUTT, 2010). Outro estudo recente empregando além da técnica de rotação de culturas, como também, a inserção de um tratamento com período de repouso, demonstrou uma redução de 100% em relação a incidência de sarna comum da batata por *S. scabiei*. As rotações com tais resultados foram: repouso-arroz-batata, feijão-mungo-arroz-batata e crotalária-arroz-batata (HUNJAN; SABHIKHI, 2020).

É importante ressaltar que essa medida nem sempre é utilizada com sucesso no manejo da sarna, pois os patógenos podem manter-se por muito tempo em uma diversidade de culturas e até mesmo no solo, sobrevivendo saprofiticamente. Algumas culturas como beterraba, cenoura, nabo, rabanete e batata-doce são consideradas plantas hospedeiras de *Streptomyces* e não devem ser utilizadas, pois podem constituir-se como fontes de inóculo (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

2.5.7. Controle químico

A grande ocorrência da sarna da batata nas áreas de produção leva o produtor a procurar estratégias de controle da doença, mas a grande variabilidade patogênica de *Streptomyces* tem dificultado a obtenção de sucesso nos métodos acima testados. Consequentemente, na maioria das vezes, o produtor acaba utilizando alternativas de aplicação de produtos químicos (D'AGOSTINO; MORANDI, 2008). Um controle baseado em tratamento químico é visto como um dos métodos mais efetivos para manejo da sarna da batata; no entanto, nenhum produto químico com total eficácia está disponível no mercado até o momento (HOSNY et al., 2014). O emprego de controle químico de *Streptomyces* é citado em diversos trabalhos, porém os compostos químicos utilizados demonstram variação no grau de

eficácia junto à relação custo/benefício (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

O princípio que fundamenta a aplicação de produtos químicos tem por objetivos: **(a)** proteção, onde substâncias são aplicadas nas superfícies de suscetíveis à doença, com o fim de impedir sua manifestação; **(b)** erradicação, que tem como princípio atuação direta sobre o patógeno, na fonte de inóculo ou no hospedeiro doente com a finalidade de reduzir ou minimizar o inóculo primário; **(c)** imunização, onde a aplicação do produto é feita em plantas saudáveis com o fim de torná-las imunes às doenças; **(d)** quimioterapia, onde ocorre a aplicação da substância em plantas já doentes com o fim de curá-las (D'AGOSTINO; MORANDI, 2008).

Um dos métodos químicos mais utilizados mundialmente no controle da sarna comum da batata é o tratamento do solo com quitosano antes do plantio. Desvantagens no uso dessa estratégia é que a substância é carcinogênica e pode afetar a produção, o meio ambiente e principalmente o agricultor (GOUWS, 2006). O composto lignosulfato de amônio foi capaz de reduzir a severidade da doença e a incidência da sarna em plantios seguintes de batata quando utilizado em experimentos realizados em campos comerciais na região de Ontário, Canadá (SOLTANI et al., 2002).

Hosny e colaboradores (2014) avaliaram a eficiência de sete produtos químicos (Rizolex, Capitan, Moncut, Ridomil, Maxim, Topsin e Oxyplus) em testes realizados *in vitro* com uma linhagem patogênica de *Streptomyces* sp.. Os autores relataram que os produtos apresentaram uma grande variação no efeito inibitório sobre o crescimento do patógeno, onde o melhor produto testado foi o Captan (captana/ftalimida) que inibiu em 33,8% o crescimento da bactéria em placa de Petri.

Experimentos no México, em áreas de produção de batata com alta incidência de sarna, foram realizados com a aplicação de sete produtos com formulações químicas no momento do plantio. Os resultados mostraram que os tubérculos que foram tratados com Fluazinam apresentaram uma menor porcentagem de lesões causadas por *Streptomyces*, diminuindo em 24,16% a severidade da doença (LAYVA-MIR et al., 2014). Esse resultado também ficou demonstrado em outros trabalhos que relataram o Fluazinam como produto responsável pela diminuição da severidade da sarna em batata (SANTOS-CERVANTES et al., 2017; HOSNY et al., 2014; WILSON et al., 2008; PUNG; CROSS, 2000).

Assim como apontado por Santos-Cervantes e colaboradores (2017), estudos precisam ser realizados em campos comerciais de batata para validações dos tratamentos químicos.

Os relatos apresentados demonstram que o controle químico da sarna não é um

processo simples e pontualmente eficaz, por isso, outras formulações e o emprego de novas estratégias devem ser ensaiadas em conjunto para se alcançar o manejo eficaz da doença.

2.5.8. Controle Biológico

O controle biológico é uma alternativa interessante às clássicas estratégias de manejo, onde essas outras metodologias de controle não atuam ou tem resultados muito limitados (BETTIOL, 2009). O uso de microrganismos antagonistas como agentes de biocontrole da sarna tem sido uma das técnicas mais exploradas para redução da incidência da doença (COMPARONI, 2015; BEAUSEJOUR; CLERMONT; BEAULIEU, 2003; HILTUNEN et al., 2009; LORANG et al., 1995; MENG et al., 2013; OTTO-HANSON et al., 2013).

Estudo realizado por Sarwar e colaboradores (2019) mostrou que uma linhagem de antagonista do próprio gênero *Streptomyces* mostrou eficácia variada como agente de biocontrole da sarna, dependendo da diversidade populacional e agressividade do patógeno, bem como da cultivar de batata, sugerindo que o biocontrole no campo possui desafios significativos. Otto-Hanson e colaboradores (2013) sugeriram o uso de diferentes combinações de antagonistas do gênero *Streptomyces* juntamente com uréia, as avaliações com combinações usando mais de um antagonista por experimento e em concentrações de 184 ppm de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ geraram melhores resultados de inibição em placa de *S. scabiei* em comparação com o uso de apenas um antagonista ou na ausência de ureia.

O emprego do fungo do gênero *Trichoderma* foi viabilizado após décadas de pesquisas para o desenvolvimento de formulações estáveis (LOBO JÚNIOR et al., 2009; JOSHI et al., 2010). Linhagens desse gênero possuem a capacidade de rápido crescimento sobre a matéria orgânica presente no solo competindo assim com as espécies fitopatogênicas, além da capacidade de produzirem antibióticos e enzimas como quitinases, proteases, celulases, entre outros (TAVARES, 2009). Dentre o gênero *Trichoderma*, os mais utilizados para o controle biológico são: *T. harzianum*, *T. virens* e *T. viride* (HERMOSA et al., 2000; SILVA e MELLO, 2007). O estudo realizado por Yossen e colaboradores (2011) avaliou o uso de *T. harzianum* para o controle da sarna da batata e os resultados mostraram diminuição de 55,5% na severidade da doença, e quando utilizada em conjunto a um outro agente biológico, o *Bacillus subtilis*, a redução da severidade foi de 74,7%.

Linhagens do gênero *Bacillus* também são utilizadas para o controle da sarna causada por *Streptomyces*. *Bacillus subtilis* apresentou redução de 56,7% na severidade da

doença, junto a um aumento de 32,5% de rendimento produtivo do tubérculo (AL-MUGHRABI et al., 2015). O *Bacillus amyloliquefaciens* (linhagem BAC03) também demonstrou resultados semelhantes, a média padrão dessa linhagem ficou em 30% de redução da severidade da sarna de *Streptomyces spp.* e com aumento no rendimento de produção dos tubérculos entre 26% e 33% dos campos avaliados (MENG et al., 2013), corroborando com dados preliminares de ação antagonista de *Bacillus subtilis* à *S. scabiei* demonstrado por Camparoni (2015). *Bacillus altitudinis*, um recém isolado identificado, mostrou números expressivos de redução de incidência e severidade da sarna da batata, chegando a superar 70%. Avaliações futuras dessas espécies devem ser apresentadas com dados sobre promoção de crescimento e interação com outras cultivares comerciais (LI et al., 2019a).

St-Onge e colaboradores (2011) demonstraram *in vitro* inibição do crescimento de *S. scabiei* por uma espécie do gênero *Pseudomonas*, e em testes em casa de vegetação os dados mostraram repressão na expressão de genes relacionados à síntese de taxtomina (*txtA* e *txtC*), uma das fitotoxinas mais estudadas e apontada como uma das toxinas responsáveis pela característica patogênica.

Estudos sobre a interação da rizosfera, região de interação da microbiota do solo e os componentes das raízes das plantas, é uma das atuais linhas de pesquisa para a descoberta de novas espécies com ação antagonista a espécies de *Streptomyces* patogênicas ou, com capacidade de sinalizar previamente o mecanismo de defesa induzindo certa resistência ou produção de metabólitos antimicrobianos pela planta, como o ácido salicílico (LIN et al., 2012).

2.5.9. Interferência na síntese de taxtomina

A Taxtomina A, fitotoxina mais estudada e produzida por algumas espécies fitopatogênicas de *Streptomyces*, sendo mais bem caracterizada em *S. scabiei*, causa hipertrofia celular e necrose na área de expansão do tubérculo (KING; LAWRENCE; CALHOUN, 1992; KING; LAWRENCE; CALHOUN, 1994).

Triptofano e auxinas demonstraram resultados na redução da síntese de taxtomina A. A auxina, em específico, compete pelos mesmos receptores de síntese, possivelmente pela similaridade na estrutura química. Pulverizações foliares de análogos de auxina foram eficazes para a redução da severidade da sarna, no entanto, podem levar a modificações no crescimento e peso dos tubérculos, o que pode não ser interessante comercialmente (LERAT; SIMAO-BEAUNOIR; BEAULIEU, 2009).

2.5.10. Identificação das espécies patogênicas

Diversos estudos afirmam que para o desenvolvimento de uma estratégia eficiente de controle da sarna é de suma importância o levantamento das espécies patogênicas presentes na área produtora bem como dos seus mecanismos de patogenicidade (DEES; WANNER, 2012; FIERS et al., 2012; LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

O conhecimento em relação a vários aspectos da sarna comum vem aumentando recentemente, incluindo a identificação de espécies patogênicas e sua distribuição, métodos de detecção, mecanismos de patogenicidade e interações entre as plantas e a bactéria (LI et al., 2019b).

A maior parte dos relatos sobre o manejo da sarna comum da batata está associada à *S. scabiei*, no entanto, outras espécies patogênicas podem responder de forma diferente às práticas utilizadas. Dessa forma, para o desenvolvimento de estratégias de manejo da sarna é importante realizar inicialmente o levantamento das espécies patogênicas presentes no país de interesse (DEES; SLETTEN; HERMANSEN, 2013; DEES; WANNER, 2012).

2.6. Caracterização de *Streptomyces* spp.

Uma das metodologias taxonômicas para a identificação de espécies de *Streptomyces* tem como base a caracterização morfológica baseando-se na sua fenotipagem apresentada por uma seleção de meios de cultivo (WILLIAMS et al., 1973). A caracterização morfológica de *Streptomyces* tem por base o ISP (*International Streptomyces Project*). Nela, etapas como a micromorfologia das hifas formadoras das cadeias de esporos e as etapas de observação das colorações das colônias são características taxonômicas importantes (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). No entanto, são técnicas elaboradas e demandam longo tempo de análise, sendo que nem sempre é possível a determinação precisa da espécie (MUN et al., 2007).

Há também a caracterização bioquímica, com resultado de crescimento e/ou ausência desse em meios enriquecidos com diferentes fontes de carboidratos ou em meios específicos (FAUCHER et al., 1995; SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

Os métodos moleculares baseados nas análises de sequências de DNA é um recurso com respostas em um menor tempo e que oferecem maior precisão e sensibilidade na identificação de microrganismos quando comparados aos métodos convencionais de análise dos caracteres fenotípicos. A análise da sequência do gene ribossomal 16S é um dos métodos

padrão para a identificação bacteriana (KREUZE et al., 1999; ZHANG et al., 2016), mas a alta similaridade das sequências desse gene nas espécies de *Streptomyces* limita a aplicação desta ferramenta para essas bactérias (LABEDA et al., 2012).

Uma das técnicas moleculares para identificação bacteriana denominada hibridização DNA-DNA é baseada no pareamento de dois genomas de acordo com sua homologia, no entanto essa técnica apresenta limitações na reprodutibilidade além de ser laboriosa e demorada. Uma alternativa passou a ser o sequenciamento e obtenção de dados em bases públicas de genomas, que facilitou os processos de comparação (KIM et al., 2015).

A região espaçadora 16S-23S DNAr também foi avaliada como ferramenta molecular para a análise filogenética de linhagens de *Streptomyces* isoladas na Coréia do Sul, mas os resultados indicaram que esta região não pode ser utilizada para análises filogenéticas de linhagens de *Streptomyces* devido à grande variação intraespecífica observada, com a presença de diferentes cópias com sequências distintas em uma mesma linhagem (HAIN et al., 1997; SONG et al., 2004; UEDA, 1999).

Como estratégia para resolver a filogenia de linhagens proximamente relacionadas que culminavam em baixas resoluções nas árvores filogenéticas de sequências do gene 16S RNAr e da região espaçadora 16S-23S DNAr, tem se utilizado a técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) que é uma variação da técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (GEVERS et al., 2005; GUO et al., 2008). A técnica de MLST, envolve a análise combinada de diferentes genes *housekeeping*, geralmente cinco a sete genes, e sua aplicação tem resultado na identificação e caracterização de patógenos devido ao seu alto poder de resolução intraespecífico (GEVERS et al., 2005; GUO et al., 2008). Dados de MLST foram empregados na identificação e classificação de microrganismos; investigações epidemiológicas de várias escalas; e em estudos de biologia populacional, patogenicidade e evolução de bacteriana, principalmente de patógenos humanos (MAIDEN, 2006; SPRATT, 1999). A partir da técnica de MLST surgiram variações do método como MLSA (GUO et al., 2008). A técnica de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) é uma das empregadas para a identificação de *Streptomyces*. Ela se baseia em sequências concatenadas de genes *housekeeping*, esses genes apresentam uma cópia única no genoma e, apesar de conservados evolutivamente, exibem alto número de sítios polimórficos, que possibilita a diferenciação de espécies dentro do gênero *Streptomyces*. Os genes *housekeeping* mais utilizados nessa técnica são: *atpD* (cadeia β da ATP sintase), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase), *recA* (recombinase A), *trpB* (subunidade β triptofano sintase) e *gyrA* (gene estrutural da subunidade β da DNA girase) (GUO et al., 2008; LABEDA, 2011).

Para a caracterização patogênica de espécies do gênero *Streptomyces* podem ser realizados testes em discos de batata ou rabanete e testes moleculares para a amplificação de três genes que codificam fitotoxinas descritas em *S. turgidiscabies*, *txtAB* (umoperon com os genes *txtA* e *txtB* que codificam sintetases da taxtomina A), *tomA* (gene que codifica a tomatinase) e *nec1* (gene que codifica proteína necrogênica Nec1), genes presentes numa área genômica denominada ilha de patogenicidade (PAI) (HUGUET-TAPIA; BIGNELL; LORIA, 2014).

Cabe ressaltar que nem todas as espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata apresentam sinal positivo de amplificação para esses genes padrões de patogenicidade, e, portanto, para esses casos há necessidade de testes com organismos de alta sensibilidade fitopatológica, assim como o da utilização da espécie vegetal hospedeira (batata), tornando-se passos imprescindíveis para a confirmação da patogenicidade das linhagens isoladas.

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Identificar novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil por meio de taxonomia polifásica e produção de um boletim técnico atualizado e detalhado para os produtores nacionais sobre a doença.

Objetivos específicos:

- **Caracterização morfológica:** avaliar o crescimento das linhagens de *Streptomyces* sp. em diferentes meios de cultivo indicados pelo *International Streptomyces Project* (ISP); analisar a micromorfologia das hifas ao microscópio óptico (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- **Caracterização fisiológica:** observar o crescimento das linhagens em diferentes condições de temperatura, valores de pH e tolerância a NaCl;
- **Caracterização bioquímica:** avaliar o crescimento bacteriano em diferentes fontes de carboidrato;
- **Caracterização patogênica:** avaliar a presença dos genes de patogenicidade (*txtAB*, *necl* e *tomA*) e realizar testes *in vitro* com discos de batata e sementes de rabanete;
- **Caracterização molecular:** estudar as relações filogenéticas das linhagens empregando-se o gene 16S RNAr; realizar análise de multilocus (MLSA) utilizando-se as sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* e 16S RNAr; e analisar, *in silico*, os perfis gerados por PCR-RFLP do gene *atpD*;
- Realizar análise genômica das linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953, para comprovação da existência de novas espécies;
- Elaborar um boletim técnico sobre a identificação sarna da batata para os produtores do país.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens

As 15 linhagens de *Streptomyces* investigadas nesse estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP. Essas linhagens, isoladas de diferentes regiões produtoras de batata do Brasil, foram divididas por Corrêa (2015) em três grupos genéticos distintos por apresentarem padrões diferentes dos observados pelas linhagens Tipo nas análises de sequências parciais dos genes *atpD* e *rpoB*. Esses grupos foram denominados G6 (sete linhagens), G9 (cinco linhagens) e G16 (três linhagens). Além disso, foram incluídas 12 linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata para comparação nos testes (TABELA 1).

TABELA 1. Linhagens Tipo de *Streptomyces* spp. e *Streptomyces* sp. associadas à sarna da batata utilizadas neste estudo.

Espécie / Grupo genético	IBSBF	Procedência
<i>S. scabiei</i>	2049	Estados Unidos
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023	França
<i>S. stelliscabiei</i>	2085	França
<i>S. acidiscabies</i>	2110	Canadá
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086	França
<i>S. turgidiscabies</i>	2114	Japão
<i>S. caviscabies</i>	2051	Canadá
<i>S. setonii</i>	2106	Desconhecida
<i>S. luridiscabiei</i>	2011	Coreia
<i>S. puniscabiei</i>	2012	Coreia
<i>S. sampsonii</i>	2111	Desconhecida
<i>S. ipomoeae</i>	2117	Desconhecida
Grupo genético 6 (G6)	2805	Ibiraiaras (SC)
	2806	Ibiraiaras (SC)
	2807	Ibiraiaras (SC)
	2815	Ibiraiaras (SC)
	2865	Itaiópolis (SC)
	2949	Itaiópolis (SC)
	2953	Canoinhas (SC)
Grupo genético 9 (G9)	2394	Cristalina (GO)
	2503	Ibicoara (BA)
	2507	Ibicoara (BA)
	2968	São Francisco de Paula (RS)
	3135	São Francisco de Paula (RS)
Grupo genético 16 (G16)	2435	Poços de Caldas (MG)
	3010	Papanduva (SC)
	3018	Canoinhas (SC)

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil.

Para reativação e testes de caracterização as linhagens de *Streptomyces* foram cultivadas em um meio *Yeast Extract-Malt Agar* (YME/ISP 2) e incubadas a 28 °C por aproximadamente 14 dias.

4.2. Caracterização morfológica

4.2.1. Crescimento bacteriano em diferentes meios de cultivo

O crescimento das 15 linhagens do estudo foi avaliado em oito diferentes meios de cultivo considerando de três parâmetros:

1) avaliação de crescimento sob o meio de cultivo, sendo positivo (+), crescimento e esporulação visíveis; mediano (+/-), linhagens com crescimento, porém sem esporulação; e negativo (-) ausência de crescimento bacteriano;

2) observação da coloração dos esporos (parte aérea) e da colônia (raspagem da parte aérea e verso da placa); e

3) avaliação da produção de pigmentos difusíveis.

Os meios de cultivo selecionados foram:

a) **ISP 1:** *Tryptone-Yeast Extract*: 5 g de triptona, 3 g de extrato de levedura, 18 g de ágar, q.s.p 1.000 mL de água destilada, pH 7,0-7,2;

b) **ISP 2:** *Yeast Extract-Malt Agar* (YME): 4 g extrato de levedo, 10 g extrato de malte, 4 g de glucose, 18 g ágar, q.s.p. 1.000 mL de água destilada, pH 7,0-7,3.

c) **ISP 3:** *Oatmeal Agar*: 20 g de aveia; 18 g de ágar, 1 mL de solução de traços de sais*, q.s.p 1.000 mL de água destilada, pH 7,2.

d) **ISP 4:** *Inorganic Salt-Starch Agar*: 10 g de amido solúvel, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de MgSO₄ 7H₂O, 1 g de NaCl, 2 g de (NH₄)₂SO₄, 2 g de CaCO₃, 1 mL de solução de traços de sais*, 18 g ágar, q.s.p 1.000 mL, pH 7,0-7,4, não podendo haver ajuste.

e) **ISP 5:** *Glycerol-Asparigine Agar*: 1 g de L-asparigina, 10 g de glicerol, 1 g de K₂HPO₄, 1 mL de traços de sais*, q.s.p 1.000mL de água destilada, pH 7,0-7,4, não podendo haver ajuste.

f) **ISP 7:** *Tyrosine Agar*: 15 g de glicerol; 0,5 g de L-tyrosine; 1 g de L-asparigine; 0,5

g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g de NaCl; 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mL de traços de sais*, 18 g de ágar, q.s.p 1.000 mL de água destilada, com pH ajustado em 7,2-7,4.

g) *Batata Dextrose Agar* (BDA) (HIMEDIA): 39 g de solução formulada, q.s.p 1.000 mL de água destilada, pH 7,0.

h) *Benette's Agar*: 10 g de dextrose, 2 g de hidrolisado enzimático de caseína, 1 g de extrato de levedura, 1 g de extrato de carne, 18 g de ágar, q.s.p 1.000 mL de água destilada, pH 7,3-7,5.

* traços de sais: 0,1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, q.s.p 100 mL de água destilada.

Os meios sublinhados seguem a numeração do *International Streptomyces Project* (ISP), os demais meios de cultivo foram selecionados do trabalho de Pridham e colaboradores (1957). O ajuste de pH dos meios foi realizado com NaOH ou HCl antes do processo de esterilização. As linhagens foram incubadas à 28 °C por 14 dias.

4.2.2. Micromorfologia de hifas e esporos

Para observação da micromorfologia de hifas, as linhagens dos grupos G6, G9 e G16, juntamente com as linhagens Tipo de *Streptomyces*, foram cultivadas em meio Ágar-Água (AA) (18 g de ágar e q.s.p. 1.000 mL de água destilada) a 28 °C por 14 dias e avaliadas por microscopia óptica (MO) nos aumentos 100X e 400X.

Na análise da morfologia de hifas esporogênicas/esporos ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), as linhagens foram cultivadas nas mesmas condições descritas acima e, então, as colônias foram recortadas em cubos de 1 mm x 1 mm e fixadas com glutaraldeído (5%) em tampão fosfato (0,5 M, pH 7,0) por duas horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série graduada de etanol (70°, 96° e absoluto) e imediatamente colocadas no equipamento Ponto Crítico (CPD-030) utilizando CO_2 líquido. Em seguida, procedeu-se à deposição de ouro em *sputter* (Sputter Coater) e, em seguida, à visualização em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-5800LV (Kitajima & Leite, 1999). Todo o procedimento de visualização ao microscópio eletrônico foi em parceria com o Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME/UNICAMP).

4.3. Caracterização fisiológica

A caracterização fisiológica das linhagens foi efetuada por meio de testes de crescimento bacteriano em meio YME com: o acréscimo de NaCl (0% a 10% de concentração, com 1% de intervalo), diferentes valores de pH (4 a 12) e gradiente de temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 27, 30, 32, 34, 37 e 40 °C). As avaliações ocorreram aos sete e 14 dias após a inoculação.

4.4. Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada de acordo com protocolo descrito por Shirling e Gottlieb (1966), com utilização de um meio basal:

MEIO BASAL		** solução de traços de sais	
		modificado por Pridham e Gottlieb	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,11 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	5,65 g	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,79 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,00 g	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,15 g
Solução de traços de sais **	1 mL	Água destilada q.s.p	100 mL
Ágar	18 g		
Água destilada	q.s.p 1.000 mL		

Foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: L-arabinose, D-glicose (controle positivo), D-frutose, mio-inositol, D-manitol, D-rafinose, L-ramnose, sucrose e D-xilose. Os carboidratos avaliados foram adicionados ao meio basal na concentração de 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata e foram utilizados como controles negativos: meio basal sem adição das fontes de carbono e meio de cultivo Ágar-Água (AA).

Para esses testes, foi efetuada uma suspensão bacteriana com duas alças de 10 µL de inóculo e adicionadas a tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Nas placas de Petri com os respectivos meios desse ensaio, adicionou-se 50 µL da suspensão bacteriana que foram distribuídos como indicado na Figura 5. As linhagens foram incubadas a 28 °C e as avaliações foram efetuadas aos 7, 14 e 21 dias de crescimento.



FIGURA 5. Distribuição do inóculo bacteriano em placa de Petri para os testes bioquímicos.

Os resultados foram registrados da seguinte forma: **utilização positiva (+)**, quando o crescimento na fonte de carbono testada foi igual ou maior que o crescimento em meio básico com adição de glicose (controle positivo); **utilização duvidosa (+/-)**, quando o crescimento foi um pouco maior que o observado no controle negativo e muito menor que o crescimento no controle positivo; **utilização negativa (-)**, crescimento similar ou menor que os controles negativos (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

4.5. Caracterização molecular

4.5.1. Extração de DNA cromossômico

As linhagens de *Streptomyces* sp., preservadas por liofilização ou ultracongelamento (-80 °C), foram reativadas em meio de cultivo YME e incubadas a 28 °C por aproximadamente 14 dias para extração de DNA seguindo-se a metodologia descrita por Pitcher, Saunders e Owen (1989) com algumas modificações realizadas por Correa (2015).

Cerca de 100 mg de biomassa de bactéria, contida na placa com meio YME, foi utilizada na extração. As células foram lavadas com 3 mL de tampão NaCl (NaCl 0,1 M e EDTA 0,1 M). O micélio foi desagregado mecanicamente, com auxílio de um pistilo, em 1,8 mL de tampão de lise (EDTA 40 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; sacarose 0,75 M). Posteriormente, adicionou-se 180 µL de SDS 10% e 90 µL de lisozima (20 mg/mL), misturados com a utilização de agitador de tubos (vortex) e a mistura foi incubada a 37 °C por uma hora. Após, foram acrescentados 100 µL de proteinase K (10 mg/mL), incubando-se a 55 °C durante duas horas. Em seguida, 1 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi adicionado com posterior agitação manual vigorosa. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Esse procedimento foi realizado duas vezes. O

DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaCl 5 M (cerca de 200 μ L) e 4 mL de etanol absoluto com incubação durante à noite a -20 °C. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos e o sedimento foi lavado de duas a três vezes com etanol 70%, aplicando-se pulsos curtos de centrifugação. O sedimento secou à temperatura ambiente e depois foi suspenso em 400 μ L de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA). Adicionou-se, então, 8 μ L de RNase (10 mg/mL) e a solução ficou incubada a 37 °C por duas horas. Posteriormente, 80 μ L de LiCl (4 M) e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (cerca de 500 μ L) foram acrescentados, agitando-se vigorosamente o tubo. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (cerca de 1 mL), centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e os sedimentos lavados duas vezes com etanol 70%. Após secar em temperatura ambiente, o DNA foi suspenso em 40 μ L de TE pH 8,0 e armazenado em freezer a - 20 °C.

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

4.5.2. Amplificação por PCR

Para a amplificação do gene ribossomal 16S foram utilizadas diferentes combinações de pares de *primers* (27F/1401R, 27F/1525R, 27F/rP2, 357F/rP2 e 27F/782R) descritos na literatura (Tabela 2) (CHUN, 1995; HEUER et al., 1997; LANE, 1991; TURNER et al., 1999; WEISBURG et al., 1991).

Para a análise multilocus foi realizada a amplificação de partes dos genes: *atpD* (cadeia β da ATP sintase), *gyrB* (gene estrutural da subunidade da DNA girase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase) e *trpB* (subunidade β da triptofano sintase) (Tabela 2) (GUO et al., 2008).

Os experimentos de amplificação foram realizados de acordo com Corrêa (2011) em reações de 25 μ L contendo 200 ng de DNA cromossômico, 1 X tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1 X BSA (*Bovine Serum Albumine*) (10 mg/mL) e 0,4 μ M de cada *primer*. As condições de temperatura, concentrações de dNTPs, unidades da enzima por reação e programa de amplificação variaram de acordo com os *primers* utilizados (Tabela 2).

TABELA 2. *Primers*, especificidade, sequência, tamanho do produto e programas de amplificação utilizados neste trabalho.

<i>Primers</i>	Especificidade	Sequência 5' - 3'	Produto (pb)	Programa de amplificação	Autor
<i>atpDPF</i>	Parte do gene de <i>atpD</i>	GTC GGC GAC TTC ACC AAG GGC AAG GTG TTC AAC ACC	998	95 °C/5min; 30X (95 °C/30s, 61 °C/30s, 72 °C/90s);72 °C/10min	Guo et al., 2008
<i>atpDPR</i>		GTG AAC TGC TTG GCG ACG TGG GTG TTC TGG GAC AGG AA			
<i>rpoBPF</i>	Parte do gene <i>rpoB</i>	GAG CGC ATG ACC ACC CAG GAC GTC GAG GC	994	95 °C/5min; 30X (95 °C/30s, 65 °C/30s, 72 °C/90s); 72 °C/10min	
<i>rpoBPR</i>		CCT CGT AGT TGT GAC CCT CCC ACG GCA TGA			
<i>recAPF</i>	Parte do gene <i>recA</i>	CCG CRC TCG CAC AGA TTG AAC GSC AAT TC*	913	95 °C/5min; 30X (95 °C/30s, 65 °C/30s, 72 °C/90s); 72 °C/10min	
<i>recAPR</i>		GCS AGG TCG GGG TTG TCC TTS AGG AAG TTG CG*			
<i>gyrBPF</i>	Parte do gene <i>gyrB</i>	GAG GTC GTG CTG ACC GTG CTG CAC GCG GGC GGC AAG TTC GGC	1305	95 °C/5min; 30X (95°C/30s, 67 °C/30s, 72 °C/90s); 72 °C/10min	
<i>gyrBPR</i>		GTT GAT GTG CTG GCC GTC GAC GTC GGC GTC CGC CAT			
<i>trpBPF</i>	Parte do gene <i>trpB</i>	GCG CGA GGA CCT GAA CCA CAC CGG CTC ACA CAA GAT CAA CA	822	95 °C/5min; 35X (95 °C/30s, 67 °C/30s, 72 °C/90s); 72 °C/10min	
<i>trpBPR</i>		TCG ATG GCC GGG ATG ATG CCC TCG GTG CGC GAC AGC AGG C			
27F	Combinação 27F/782R do 16S rRNA	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG*	755	95 °C/2min; 30X (94 °C/60s, 55 °C/60s, 72 °C/3min);72 °C/3min	
782R		ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT			

TABELA 2. continuação

<i>Primers</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Sequência</i>	<i>Produto (pb)</i>	<i>Programa de amplificação</i>	<i>Autor</i>	
27F	Combinação 27F/1401R do 16S rRNA	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG*	1374	95 °C/2min; 30X (94 °C/60s, 55 °C/60s, 72 °C/3min); 72 °C/3min	Lane, 1991	
1401R		CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG			Heuer et al., 1997	
27F	Combinação 27F/1525R do 16S rRNA	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG*	1498		Lane, 1991	
1525R		AAG GAG GTG WTC CAR CC*			Lane, 1991	
27F	Combinação 27F/rP2 do 16S rRNA	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG*	1465		Lane, 1991	
rP2		ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT			Weisburg et al., 1991	
357F	Combinação 357F/rP2 do 16S rRNA	CTC CTA CGG GAG GCA GCA G	1135		Turner et al., 1999	
rP2		ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT				
TxtAB1	Operon <i>txtAB</i>	CCA CCA GGA CCT GCT CTT C	385		95 °C/2min; 30X (95 °C/60s, 57 °C/60s, 72 °C/2 min); 72 °C/5min	Wanner, 2006
TxtAB2		TGC AGT GGA CCT CAC AGA TG				
Tom3	Gene <i>tomA</i>	GAG GCG TTG GTG GAG TTC TA	392	95 °C/2min; 30X (95 °C/60s, 57 °C/60s, 72 °C/2 min); 72 °C/5min		
Tom4		TTG GGG TTG TAC TCC TCG TC				
Nf	Gene <i>nec1</i>	ATG AGC GCG AAC GGA AGC CCC GGA	720		Bukhalid; Chung; Loria, 1998	
Nr		GCA GGT CGT CAC GAA GGA TCG				

(*) bases ambíguas, onde M = A/C, R = A/G, S = C/G, W = A/T.

4.5.3. Sequenciamento

Os produtos de PCR dos genes 16S RNAr, *atpD*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* e *trpB*, de todas as linhagens de *Streptomyces* desse estudo foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. Após as purificações, os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro *Gene Quant®* (GE Healthcare) para posterior sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram efetuadas utilizando-se o kit *Big Dye* (Applied Biosystems). Para os genes *atpD*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* e *trpB* empregou-se os mesmos *primers* da amplificação por PCR, já para o sequenciamento do gene 16S RNAr foram utilizados, além dos *primers* da amplificação, os *primers* internos 357F, 765F, 782R, 1100R e 1401R (Tabela 3).

O sequenciamento foi realizado em parceria com o Dr. Márcio José da Silva do Laboratório de Sequenciamento e Genotipagem do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP. Foi utilizado o sequenciador automático da *Applied Biosystems-Hitachi*, modelo ABI prism 3700 DNA Analyzer.

4.5.4. Análise de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *atpD*

De acordo com Corrêa e colaboradores (2015) a técnica de PCR-RFLP do gene *atpD* digerido com as enzimas *CfoI* e *HaeIII* (Fermentas) pode ser utilizada para a diferenciação das espécies fitopatogênicas de *Streptomyces* associadas a sarna da batata. Desse modo, as linhagens dos grupos G6, G9 e G16 foram analisadas com essa ferramenta visando compará-las com as espécies Tipo já descritas na literatura.

As sequências do gene *atpD* foram analisadas pelo método *in silico* (http://insilico.ehu.eus/user_seqs/PCR-RFLP/) (BIKANDI et al., 2004) com utilização simultânea das duas enzimas recomendadas (*CfoI* e *HaeIII*) (Fermentas), estabelecendo-se assim números exatos aos fragmentos digeridos. As imagens virtuais dos géis de eletroforese da reação de PCR-RFLP foram geradas pelo software SnapGene Gel Simulator (GSL).

Bioteche).

4.5.5. Análise filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas com as 15 linhagens do estudo, assim como, as 12 linhagens Tipo de de *Streptomyces* associadas a sarna da batata. Também foram inseridos os mesmos genes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, utilizado como grupo externo.

Além da análise filogenética do gene 16S RNAr, comparação de 1.430 nucleotídeos, foram efetuadas duas diferentes análises de multilocus, uma com cinco genes (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*) e a outra com esses mesmos genes acrescido do gene 16S RNAr, afim de dar maior robustez aos dados. As sequências dos genes foram concatenadas, alinhadas e editadas no programa *BioEdit* (HALL, 1999) para a formação de uma única sequência, para a primeira metodologia foram comparados 4.430 nucleotídeos e para a segunda, 5.860 nucleotídeos.

As análises foram realizadas com o programa MEGA X (KUMAR et al., 2018) e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o método de Neighbor-Joining (SEITOU; NEI, 1987). Análises de *bootstrap* com 1.000 repetições foram realizadas para prover suporte aos ramos das árvores filogenéticas obtidas, estimando a sua consistência interna.

4.6. Caracterização patogênica

4.6.1. Amplificação dos genes de patogenicidade

A presença dos genes de patogenicidade, característicos da ilha de patogenicidade de *Streptomyces*, foi investigada por meio da amplificação do operon *txtAB* (relacionado à síntese da fitotoxina taxtomina), gene *tomA* (que codifica a enzima tomatinase) e gene *necI* (que codifica a proteína necrogênica Nec1) (Tabela 2) (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998; WANNER, 2006).

4.6.2. Teste de patogenicidade em sementes de rabanete

O teste de patogenicidade em mudas de rabanete foi realizado segundo Leiner e colaboradores (1996) com modificações. As sementes de rabanete da variedade rubro foram

desinfestadas (NaClO 0,5% e Tween 20 0,1%) por 3 minutos, lavadas assim em água destilada previamente esterilizada e colocadas em placa de Petri com meio AA 1%, pH 7. Após um dia, as sementes germinadas foram selecionadas pela uniformidade e transferidas individualmente para tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de meio AA 1%, pH 7. As linhagens de *Streptomyces* foram cultivadas em meio YME a 28 °C por 14 dias e após o crescimento, duas alças de 10 µL de inóculo foram transferidas para tubos tipo Falcon contendo 15 mL de meio de aveia Oatmeal Broth (OMB) (LORIA et al., 1995). Os tubos foram incubados a 28 °C com agitação de 150 rpm por cinco dias e 300 µL do meio OMB inoculado foram adicionados ao tubo Falcon(50 mL) contendo a semente de rabanete germinada. Como controle negativo, 300 µL de meio OMB não inoculado foram adicionados à semente de rabanete. As mudas foram mantidas a temperatura ambiente com aproximadamente 12 horas de ciclo de luz por 12 dias. A patogenicidade foi avaliada pela ocorrência de necrose e escurecimento da planta, inchaço radial, nanismo e/ou colapso da muda. A virulência das linhagens variou de 0 a 8, sendo essa escala determinada pela soma das escalas de nanismo de parte aérea (0 a 4) e de nanismo da raiz (0 a 4) (Quadro 1). Foram realizadas cinco repetições casualizadas.

Quadro 1: Determinação dos graus de virulência de acordo com a porcentagem de crescimento da parte aérea e da raiz das plantas inoculadas comparadas às plantas controle.

Escala de nanismo	% crescimento da parte aérea (Média do comprimento planta inoculada/ Média do comprimento planta controle) x100	% crescimento da raiz (Média do comprimento planta inoculada/ Média do comprimento planta controle) x100	Virulência
	0	crescimento normal	
1	Acima de 75,1%	Acima de 75,1%	Soma das escalas para comprimento de parte aérea (0 a 4) e comprimento de raiz (0 a 4)
2	50,1 a 75%	50,1 a 75%	
3	25,1 a 50%	25,1 a 50%	
4	abaixo de 25%	abaixo de 25%	
Virulência	0 a 4	0 a 4	0 a 8

4.6.2. Teste de patogenicidade em discos de batata

As linhagens de *Streptomyces* sp. testadas foram cultivadas em meio YME a 28 °C por 14 dias. Após o crescimento e esporulação, discos do meio de cultura com a bactéria (aproximadamente 5 mm de diâmetro) foram recortados e invertidos sobre fatias dos tubérculos (aproximadamente 3 cm de diâmetro), previamente esterilizados com hipoclorito de sódio 5%. As fatias foram colocadas em placas de Petri revestidas com papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica

a 28 °C e os sintomas de necrose foram avaliados após dez dias da inoculação. Como controle negativo foram utilizados tubérculos com discos de meio de cultura com uma linhagem de *Streptomyces* sp. não patogênica e discos de batata com meio de cultivo (LORIA et al., 1995, com adaptações). Foram utilizados três discos de batata por tratamento, com três repetições por linhagem.

De acordo com a capacidade de causar necrose e sua intensidade, no décimo dia após a inoculação, as linhagens foram classificadas como não patogênicas (-), ou seja, sem a capacidade de causar necrose em fatias de batata e patogênicas (+), causadoras de necrose (Figura 6).

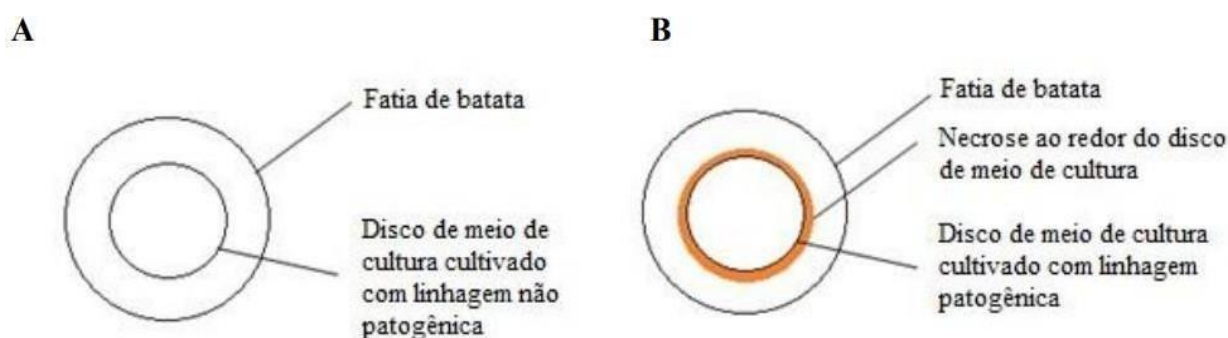


Figura 6. Esquema da avaliação do teste de patogenicidade de linhagens de *Streptomyces*. (A) Linhagem não patogênica (-); (B) Necrose causada por linhagem patogênica. As medidas de extensão e profundidade da faixa de necrose foram realizadas com micrômetro. Fonte: Corrêa (2011).

4.7. Análise genômica

No presente estudo também foi realizado o sequenciamento genômico de duas linhagens, IBSBF 2807 e IBSBF 2953, pertencentes ao G6 e as análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com o Dr. Danilo Trabuco do Amaral (Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada FFCLRP – USP/Ribeirão Preto).

4.7.1. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

Os genomas das linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953 foram sequenciados na plataforma Illumina HiSeq2500 (Illumina, EUA) com o protocolo de biblioteca de leitura curta emparelhada (2x100bp). Esses processos foram conduzidos pela unidade BPI (Biotecnologia Pesquisa e Inovação), Botucatu, Brasil. As leituras brutas obtidas para cada espécie foram cuidadosamente filtradas usando o software Seqclean v.1.10.09 (Zhbannikov et al., 2017), montado *de novo* usando SPAdes v.3.14.1 (Bankevich et al. 2012) no modo “*isolate*”, e uma

etapa extra para melhorar os contigs pré-montados do scaffold foi realizada com o script `SSPACE_basicv2.pl` (Boetzer et al., 2011). A previsão e anotação do gene foram realizadas com a ferramenta de anotação do genoma baseada na web DFAST (Tanizawa et al., 2018). As leituras brutas e genomas estão disponíveis sob o número NCBI BioProject PRJNA732930.

4.7.2. Análises de identidade de nucleotídeo média (ANI) e hibridização *in silico* DNA-DNA (isDDH)

As análises de identidade média de nucleotídeo (ANI) e da hibridização *in silico* DNA-DNA (isDDH) foram realizadas com os genomas da IBSBF 2807 e IBSBF 2953 juntamente com outras 16 espécies de *Streptomyces* que continham seus dados de sequenciamento no banco de dados do The National Center for Biotechnology Information (NCBI), as análises foram computados usando o servidor EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>; Yoon et al., 2017) e a calculadora de distância genoma a genoma v2.1 (GGDC; <https://ggdc.dsmz.de/>; Meier-Kolthoff et al., 2013).

4.8. Boletim Técnico

Levantamento bibliográfico por meio de artigos científicos de Instituições nacionais e internacionais e publicações periódicas disponíveis SciELO (Scientific Electronic Library Online) e endereços eletrônicos relacionados a temática de estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização morfológica

Estudos de descrição de novas espécies utilizam os dados de morfologia como um dos caracteres taxônicos avaliados (BOUCHEK-MECHICHE et al. 2000; LIU et al., 2005), enfatizando assim, neste estudo, a importância dessa avaliação com diferentes métodos de experimentação para tornar os dados mais robustos.

5.1.1. Crescimento bacteriano em diferentes meios de cultivo

A sistemática do gênero *Streptomyces* apresenta-se com uma complicada abordagem histórica com numerosos critérios para a delimitação de espécies dentro do gênero. As primeiras descrições de espécies dependiam dos procedimentos morfológicos, como cor de micélios aéreos e de substrato; e morfologia da cadeia de esporos (KRAINSKY, 1914; WAKSMAN; CURTIS, 1916; WAKSMAN, 1919). Em 1964, o *International Streptomyces Project* (ISP) estabeleceu parâmetros de classificação de linhagens de *Streptomyces* com o objetivo de produzir caracterizações confiáveis de espécies do gênero e de *Streptoverticillium* (LAW et al., 2018). O ISP foi reformulado e apresentado para o Comitê de Taxonomia da Sociedade Americana de Microbiologia e Comitê Internacional de Nomenclatura Bacteriológica que validaram e propuseram os testes morfológicos como etapa importante para a classificação de novas espécies do gênero *Streptomyces* (LABEDA et al., 2012; LAW et al., 2018).

A seleção dos meios de cultivo testados neste trabalho demonstraram ser uma etapa importante da caracterização morfológica, pois as diferenças de composição desses (nutricional e química) geraram padrões de observações com a capacidade de distinguir as linhagens pertencentes a um mesmo grupo bacteriano.

5.1.1.1. Meio Tryptone-Yeast Extract Broth (ISP 1)

O meio de cultivo *Tryptone-Yeast Extract Broth* (ISP 1) é utilizado principalmente como meio de enriquecimento para espécies de *Streptomyces*, fornecendo compostos nitrogenados, carbono, enxofre, complexo de vitamina B, entre outros elementos, necessários para o metabolismo bacteriano. No presente estudo, ágar foi adicionado à formulação para a observação em placa dos parâmetros morfológicos.

A avaliação de crescimento das linhagens nesse meio mostrou que todas as

linhagens do G6 não esporularam, parâmetro também apresentado pela linhagem IBSBF 2968 (G9); e linhagens IBSBF 2435 e IBSBF 3018 (G16).

Devido à ausência de esporulação de algumas linhagens, a observação da coloração dos esporos sobre este meio foi possível apenas para as linhagens IBSBF 2394, IBSBF 2503, IBSBF 2507 e IBSBF 3135 (G9); e IBSBF 3010 (G16). Essa avaliação demonstrou a similaridade dentro do G9 com as linhagens IBSBF 2394, IBSBF 2503, IBSBF 2507 com coloração da parte aérea branca, diferindo-se do padrão cinza claro/branco da linhagem do mesmo grupo IBSBF 3135 (Tabela 3, Figura 7).

Na análise de coloração das colônias foram observadas poucas variações entre os três grupos avaliados, se destacando a linhagem IBSBF 3135 (G9) com coloração rosa. A coloração das demais linhagens foi marrom claro, bege ou creme (Tabela 3, Figura 7).

Com relação a produção de pigmentos, apenas as linhagens IBSBF 2805 e IBSBF 2806 (G6) produziram pigmento escuro (Tabela 3, Figura 7).

TABELA 3. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo *Tryptone-Yeast Extract Broth*.

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+/-	#	Marrom claro	(+)
	2806	+/-	#	Marrom claro	(+)
	2807	+/-	#	Creme	(-)
	2815	+/-	#	Creme	(-)
	2865	+/-	#	Creme	(-)
	2949	+/-	#	Creme	(-)
	2953	+/-	#	Creme	(-)
G9	2394	+	Branco	Bege	(-)
	2503	+	Branco	Bege	(-)
	2507	+	Branco	Creme	(-)
	2968	+/-	#	Creme	(-)
	3135	+	Cinza claro // Branco	Rosa	(-)
G16	2435	+/-	#	Creme	(-)
	3010	+	Cinza // Branco	Marrom claro	(-)
	3018	+/-	#	Creme	(-)

(+) crescimento positivo; +/- crescimento médio (crescimento bacteriano sem esporulação); # ausência do parâmetro de avaliação. Produção de pigmento (+) presente; (-) ausente

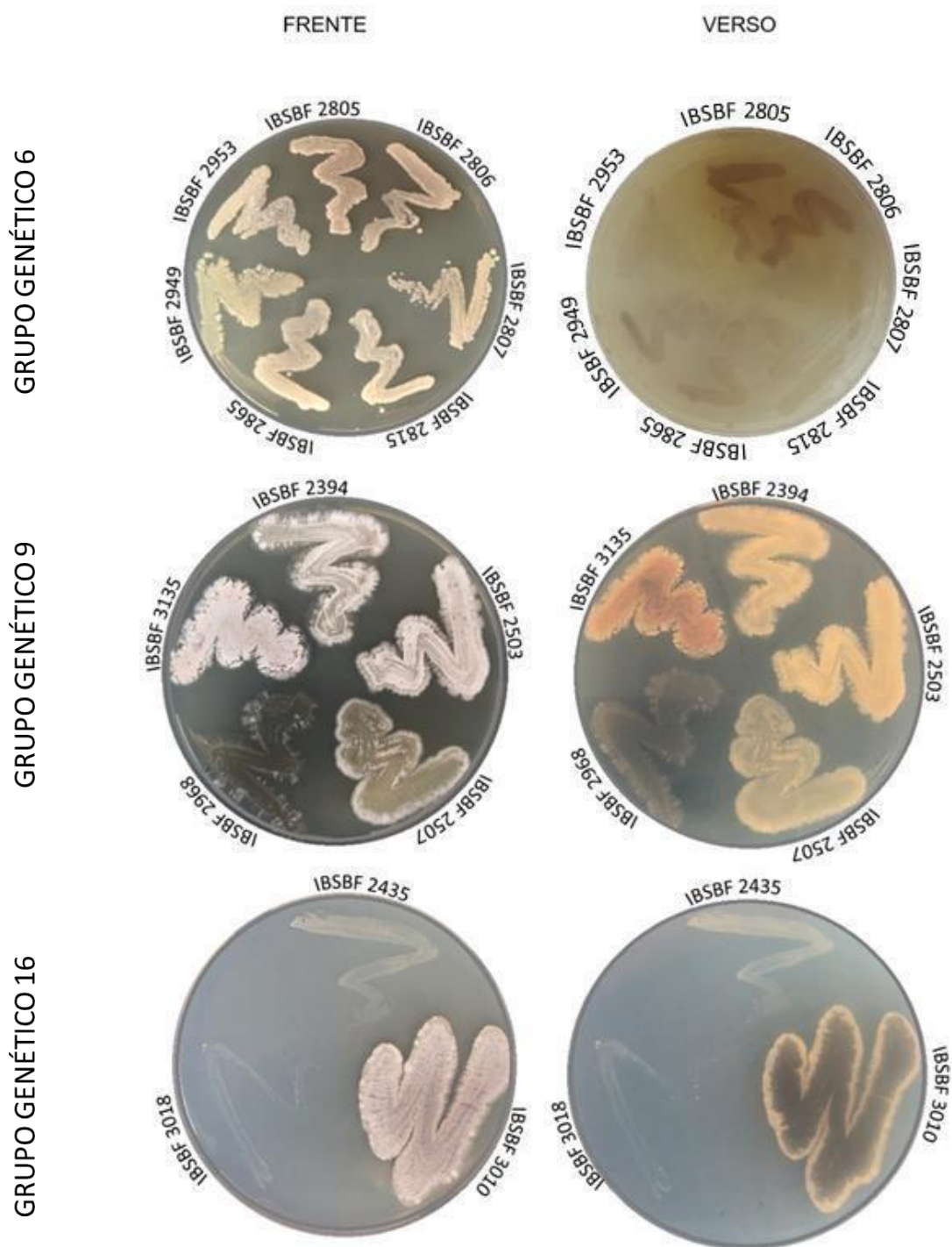


FIGURA 7. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo *Tryptone-Yeast Extract Broth.*, frente (esquerda) e verso (direita) das placas de Petri.

5.1.1.2. Meio Yeast Extract Malt Agar (YME) (ISP2)

O meio de cultivo YME (ISP2) é considerado um dos meios padrão para a manutenção de linhagens do gênero *Streptomyces*. Em sua composição há extrato de levedura que carrega nutrientes do complexo B e outros fatores de crescimento, extrato de malte como uma fonte adicional de carbono e dextrose como fonte de energia.

A avaliação morfológica em meio YME está presente em todos os trabalhos taxonômicos das linhagens Tipo fitopatogênicas de *Streptomyces*, configurando a importância da caracterização morfológica sobre este meio de cultivo.

Todas as linhagens testadas apresentaram crescimento em YME. Na observação da coloração dos esporos foi verificada pouca diferença entre as linhagens dos Grupos Genéticos (G6, G9 e G16), variando entre cinza, cinza claro, branco e bege.

Já para a coloração de colônias, ocorreu destaque da coloração roxa/preta (verso da placa) apresentada pelas linhagens IBSBF 2968 e IBSBF 3135 (G9), diferença essa não observada para as demais linhagens, que apresentaram coloração amarela/bege. As linhagens do G6 e G16 apresentaram colônias bege e marrom escuro (Tabela 4, Figura 8).

TABELA 4. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo *Yeast Extract Malt Agar* (YME) (ISP2).

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Cinza claro// Branco	Marrom escuro	(-)
	2806	+	Cinza claro // Branco	Marrom escuro	(-)
	2807	+	Cinza claro // Branco	Bege	(-)
	2815	+	Cinza claro // Branco	Marrom escuro	(-)
	2865	+	Cinza claro // Branco	Bege	(-)
	2949	+	Cinza claro //Branco	Bege	(-)
	2953	+	Cinza claro // Branco	Bege	(-)
G9	2394	+	Cinza // Bege	Amarela // Bege	(-)
	2503	+	Cinza // Bege	Amarela // Bege	(-)
	2507	+	Cinza // Bege	Amarela // Bege	(-)
	2968	+	Cinza // Branco	Preto // Roxo	(+)
	3135	+	Cinza // Branco	Preto // Roxo	(+)
G16	2435	+	Bege // Branco	Bege	(-)
	3010	+	Branco // Cinza	Marrom escuro	(-)
	3018	+	Cinza // Branco	Bege	(-)

+ crescimento positivo; (+) produção de pigmento; (-) ausência de pigmento

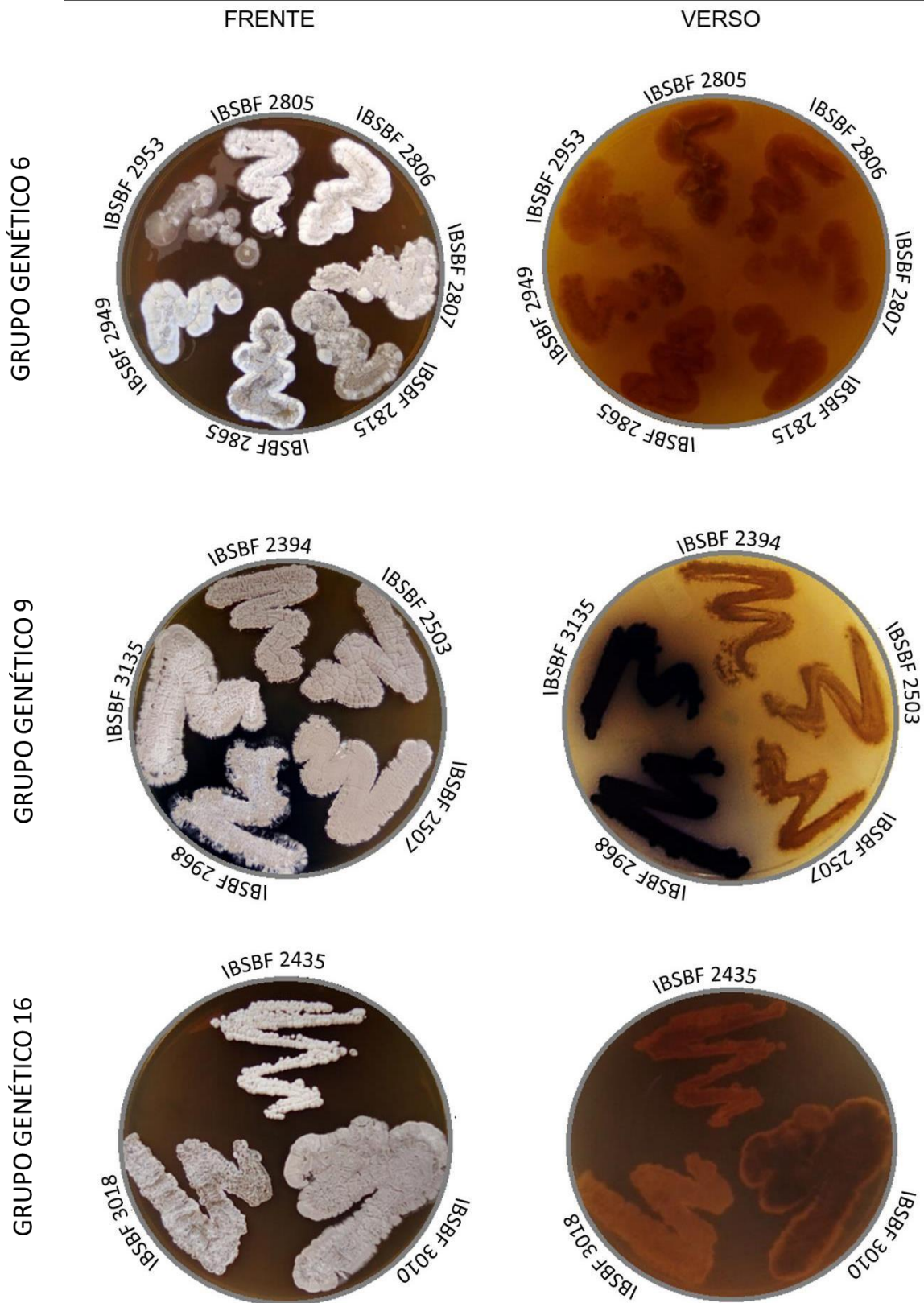


FIGURA 8. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo *Yeast Extract Malt Agar* (YME) (ISP2), frente (esquerda) e verso (direita) das placas de Petri.

5.1.1.3. Meio Oatmeal Agar (ISP 3)

O meio de cultivo *Oatmeal Agar* (ISP 3) foi desenvolvido principalmente para o crescimento de fungos com formação de macrosporos. É utilizado para a identificação de estruturas sexuais e funcionais do Domínio Fungi devido à capacidade de proporcionar grande multiplicação e reprodução dos organismos (KONEMAN et al.,1997). O *Oatmeal Agar* representa fonte de nitrogênio, carbono, proteína e nutrientes necessários para o desenvolvimento de hifas e micélios.

A avaliação de crescimento dos grupos G6, G9 e G16 no meio de cultivo de aveia (ISP 3) foi positiva para todas as linhagens testadas, apresentando grande produção de massa de esporos em comparação aos demais meios, o que corrobora o trabalho de Shepherd e colaboradores (2010). Na coloração dos esporos predominaram os tons de cinza, cor branca e bege entre todas as linhagens analisadas.

Para a coloração de colônias foi constatada heterogeneidade entre as linhagens do G6 com linhagens apresentando tons escuros, entre marrom claro e marrom, e tons mais claros, bege e creme. A diversidade de cores também foi observada no G9, com as linhagens IBSBF 2968 e IBSBF 3135 com tons roxos. O G16 também apresentou variedade de cores entre seus integrantes. Com relação à produção de pigmento escuro no meio de cultivo verificou-se que nem todas as linhagens do G6 e G9 produziram o pigmento, enquanto que todas do G16 apresentaram parâmetro positivo (Tabela 5, Figura 9).

TABELA 5. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de aveia (*Oatmeal Agar*) (ISP 3)

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Cinza // Branco	Marrom clara	(+)
	2806	+	Cinza // Branco	Marrom clara	(+)
	2807	+	Cinza claro // Branco	Bege	(-)
	2815	+	Cinza claro // Branco	Marrom	(+)
	2865	+	Cinza claro // Branco	Creme	(-)
	2949	+	Branco // Cinza claro	Marrom clara	(+)
	2953	+	Cinza claro // Bege	Creme	(-)
G9	2394	+	Cinza // Bege	Marrom clara	(+)
	2503	+	Cinza claro // Bege	Creme	(-)
	2507	+	Cinza claro // Bege	Creme	(-)
	2968	+	Cinza claro	Roxa	(+)
	3135	+	Cinza claro // Bege	Roxa	(+)
G16	2435	+	Branco	Amarela // marrom	(+)
	3010	+	Cinza claro // Bege	Cinza // Marrom clara	(+)
	3018	+	Branco	Marrom	(+)

+ crescimento positivo; (+) produção de pigmento; (-) ausência de pigmento

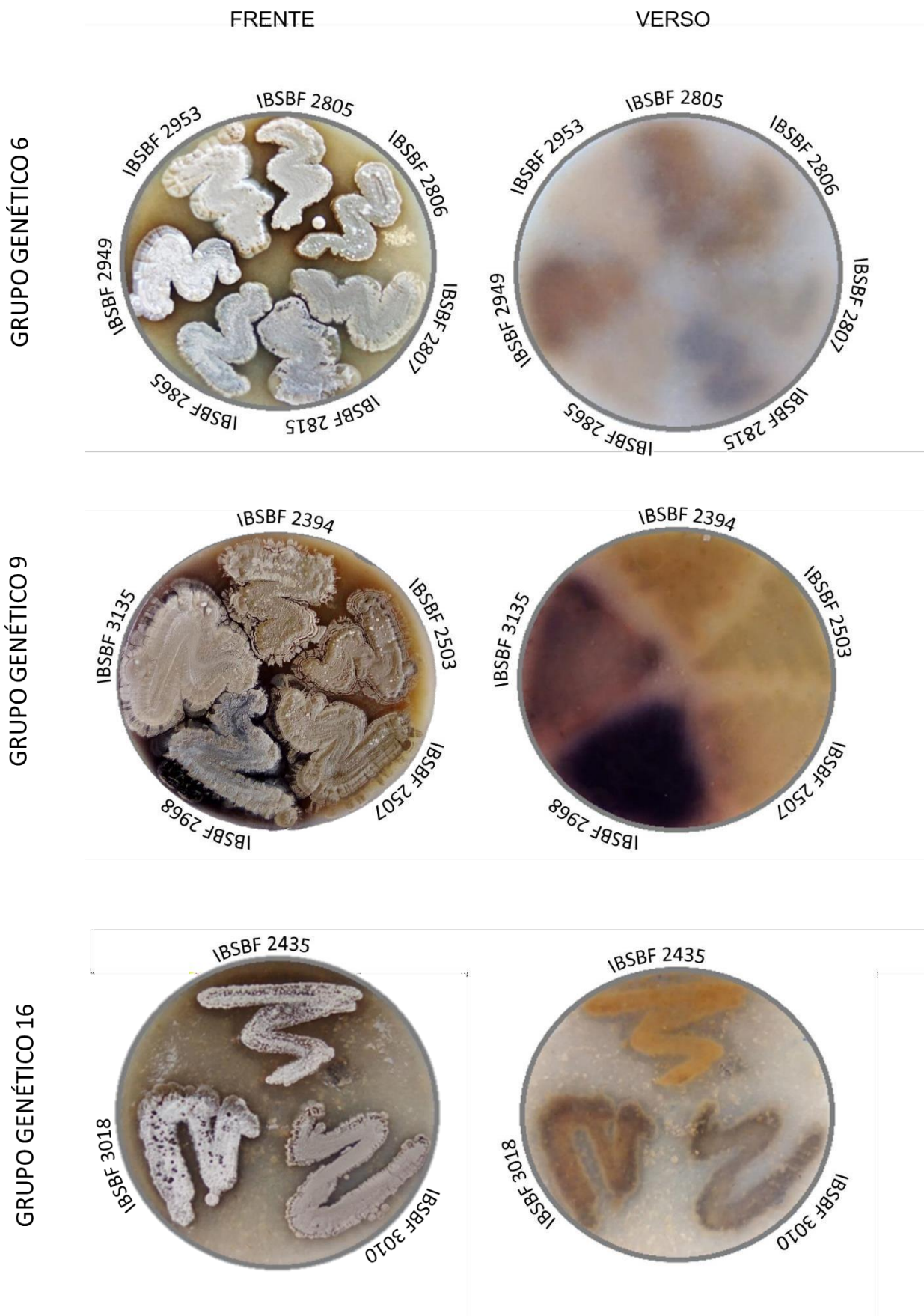


FIGURA 9. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de aveia (*Oatmeal Agar*) (ISP 3), frente (esquerda) e verso (direita) das placas de Petri.

5.1.1.4. Meio Inorganic Salt-Starch Agar (Agar Amido Sal Inorganico) (ISP4)

O meio de cultivo Amido Sal Inorgânico Ágar (*Inorganic Salt-Starch Agar*) (ISP 4) possui em sua formulação muitos sais inorgânicos junto a uma base de amido. A fonte energética do meio vem da glicose disponível no amido. O fosfato dipotássico atua como sistema tampão, enquanto o cloreto de sódio mantém o nível osmótico e equilíbrio do meio. Os demais sais fornecem eletrólitos e minerais essenciais.

A avaliação de crescimento nesse meio permitiu separar as linhagens do G16 IBSBF 2435 e IBFBF 3018 dentro do próprio grupo e dos demais grupos devido à ausência de crescimento (Tabela 6, Figura 10).

A coloração dos esporos apresentou poucas variações, ficando entre cinza claro, bege e branco, entre todos os grupos genéticos testados (G6, G9 e G16). Na avaliação da coloração das colônias foram observadas diferenças marcantes nas linhagens do G6 com variações de cor, entre marrom, cinza claro, bege e creme; e das do G9 com roxo, cinza, marrom claro e creme (Tabela 6, Figura 10).

Na análise de produção de pigmentos constatou-se ausência dessa característica em apenas três linhagens, IBSBF 2807, IBSBF 2865 (G6) e IBSBF 2507 (G9) (Tabela 6, Figura 10).

TABELA 6. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Amido Sal Inorgânico Ágar (*Inorganic Salt-Starch Agar*) (ISP4).

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Cinza // Branco	Marrom	(+)
	2806	+	Cinza // Branco	Marrom	(+)
	2807	+	Cinza // Cinza Claro	Creme	(-)
	2815	+	Cinza // Cinza claro	Marrom	(+)
	2865	+	Cinza claro // Bege	Creme	(-)
	2949	+	Cinza // Cinza claro	Marrom	(+)
	2953	+	Cinza claro // Bege	Marrom claro	(+)
G9	2394	+	Cinza claro // Bege	Bege	(+)
	2503	+	Cinza claro // Bege	Creme	(+)
	2507	+	Cinza claro // Bege	Creme	(-)
	2968	+	Cinza claro	Roxo	(+)
	3135	+	Cinza claro	Roxo	(+)
G16	2435	-	#	#	#
	3010	+	Cinza claro	Bege	(+)
	3018	-	#	#	#

+ crescimento positivo; +/- crescimento medial; # ausência do parâmetro de avaliação; (+) produção de pigmento; (-) ausência de pigmento

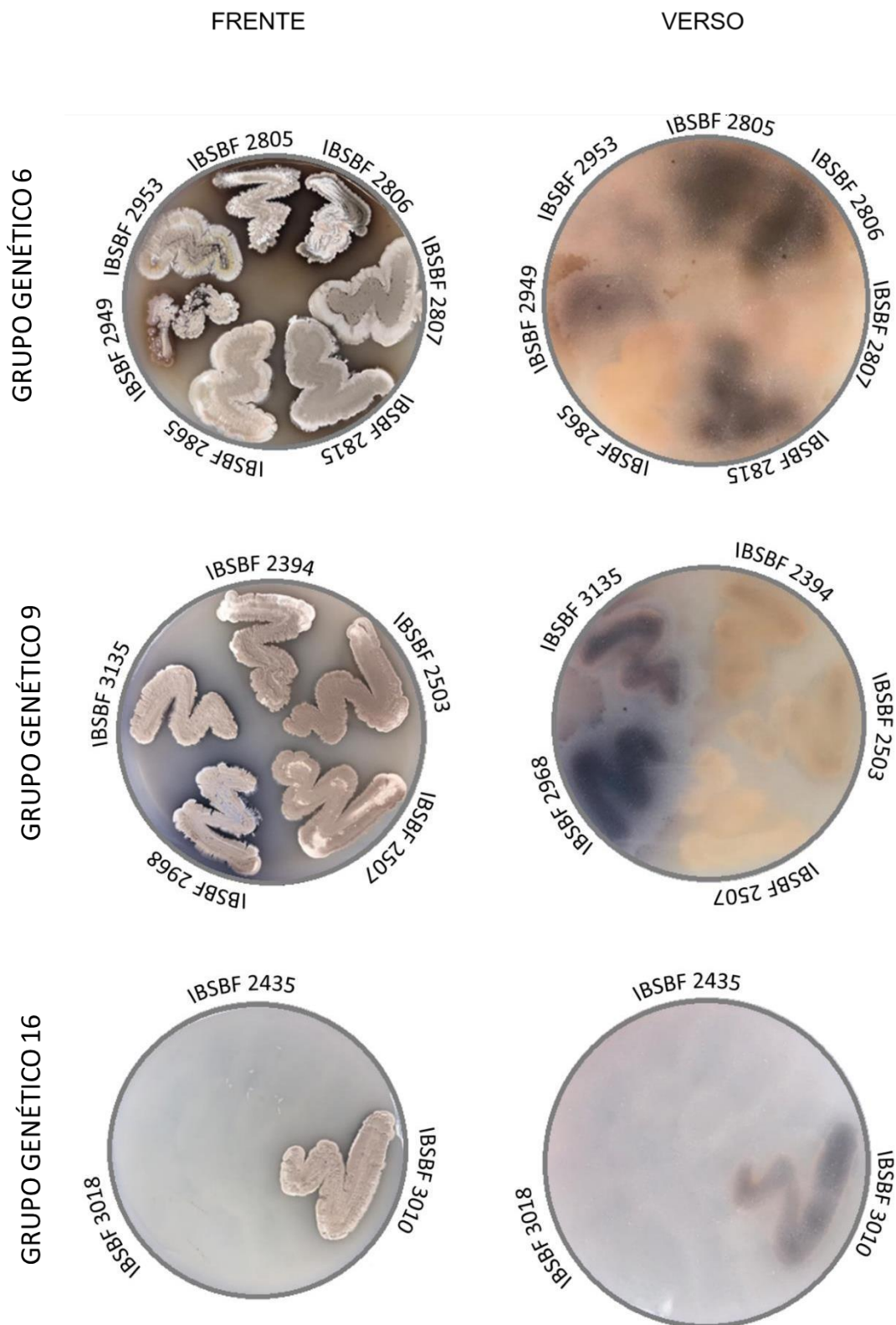


FIGURA 10. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo Amido Sal Inorganico (*Inorganic Salt-Starch Agar*) (ISP4), frente (esquerda) e verso (direita) de placas de Petri.

5.1.1.5. Meio Glycerol-Asparigine Agar (Glicerol-Asparagina Agar) (ISP 5)

O meio de cultivo Glicerol-Asparagina Ágar (*Glycerol-Asparigine Agar*) (ISP 5) é um meio fundamentado nos dois principais componentes que o nomeiam, o glicerol, fonte energética da solução e, a asparigina, fonte de aminoácidos essenciais, componente esse ausente nos demais meios avaliados até então no presente estudo.

O crescimento bacteriano nesse meio foi o que gerou maior variabilidade na caracterização morfológica de coloração de esporos das linhagens do G6, uma vez que cada uma das linhagens apresentou esporos de cores diferentes. A linhagem IBSBF 2435 (G16) apresentou crescimento nesse meio, porém sem esporulação (Tabela 7, Figura 11).

Com relação à coloração de colônias, os três grupos genéticos apresentaram cores entre marrom escuro, marrom, bege, cinza e roxo.

Ao todos seis linhagens tiveram produção de pigmento no meio de cultivo, sendo IBSBF 2806, IBSBF 2815, IBSBF 2949 (G6), IBSBF 2968, IBSBF 3135 (G9) e IBSBF 3018 (G16).

A caracterização morfológica nesse meio permitiu separar as linhagens IBSBF 2805 e IBSBF 2806 pela primeira vez, em todos os parâmetros de avaliação, padrão não observado nos demais meios testados (Tabela 7, Figura 11).

TABELA 7. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Glicerol-Asparagina (*Glycerol-Asparigine Agar*) (ISP 5).

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Marrom claro // Branco	Marrom claro // Bege	(-)
	2806	+	Cinza // Branco	Marrom escuro	(+)
	2807	+	Cinza claro // Branco	Marrom claro //	(-)
	2815	+	Cinza // Cinza claro	Marrom	(+)
	2865	+	Branco // Cinza claro	Marrom claro //	(-)
	2949	+	Marrom // Cinza claro	Marrom claro	(+)
	2953	+	Amarelo // Bege	Amarelo // Marrom	(-)
G9	2394	+	Bege // Branco	Creme // Branco	(-)
	2503	+	Cinza claro // Bege	Bege	(-)
	2507	+	Cinza claro // Bege	Bege	(-)
	2968	+	Cinza claro // Rosa	Roxo	(+)
	3135	+	Cinza claro // Rosa	Roxo	(+)
G16	2435	+/-	#	Creme	(-)
	3010	+	Cinza claro // Branco	Cinza claro // Bege	(-)
	3018	+	Cinza // Cinza claro	Cinza	(+)

+ crescimento positivo; +/- crescimento medial; # ausência do parâmetro de avaliação; (+) produção de pigmento; (-) ausência de pigmento

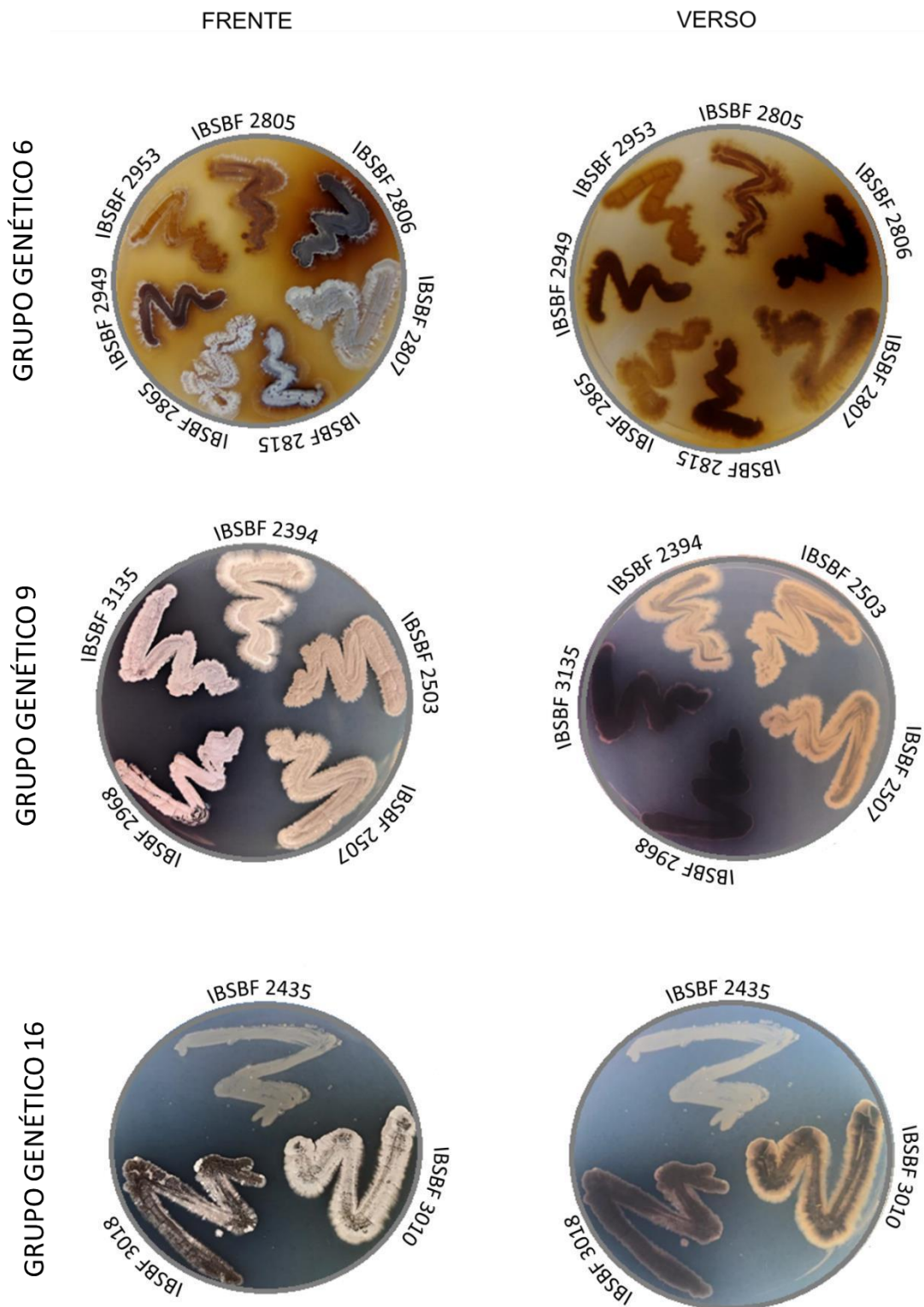


FIGURA 11: Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Glicerol-Asparagina (*Glycerol-Asparagine Agar*) (ISP 5), frente (esquerda) e verso (direita) das placas de Petri.

5.1.1.6. Meio Tyrosine Agar (Tirosina Agar) (ISP 7)

O meio Tirosina Àgar foi desenvolvido visando a diferenciação de dois gêneros da ordem Actinomycetales, *Nocardia* sp. e *Streptomyces* sp., pois a maior facilidade de degradação da L-Tirosina pelas linhagens de *Streptomyces* acelerava o resultado das análises farmacológicas e clínicas para patologias associadas a esses dois gêneros.

Para a interpretação dos resultados de caracterização morfológica nesse meio de cultivo foi utilizado um padrão distinto, criando-se uma escala de produção de pigmento. Esse dado se refere à correlação da atividade da tirosinase, enzima que na presença de cobre produz melanina. Na escala gerada são considerados: (+++), alta produção de melanina, (++) média produção de melanina, (+) produção de melanina positiva e (-) ausência de produção de melanina.

Nas nossas análises não foram observadas diferenças marcantes na coloração dos esporos de todas as linhagens avaliadas, ficando entre as cores cinza, branco, bege e creme. Na avaliação da coloração das colônias observou-se a presença das cores marrom escuro, marrom, marrom claro e bege. Por fim, nos testes de produção de pigmento, somente as linhagens com colônias de coloração bege IBSBF 2807 (G6) e IBSBF 3018 (G16) não produziram pigmento escuro no meio de cultivo (Tabela 8, Figura 12).

TABELA 8. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Tirosina Àgar (*Tyrosine Agar*) (ISP 7).

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Cinza // Branco	Marrom escuro	(+++)
	2806	+	Cinza // Branco	Marrom escuro	(++)
	2807	+	Cinza claro // Branco	Bege	(-)
	2815	+	Branco // Cinza	Marrom escuro	(++)
	2865	+	Branco // Cinza claro	Marrom escuro	(++)
	2949	+	Cinza claro // Cinza	Marrom escuro	(+++)
	2953	+	Branco // Cinza claro	Marrom escuro	(++)
G9	2394	+	Bege // Branco	Marrom	(+)
	2503	+	Cinza claro // Bege	Marrom	(+)
	2507	+	Cinza claro // Bege	Marrom claro	(+)
	2968	+	Cinza claro // Rosa	Marrom	(+)
	3135	+	Cinza claro // Rosa	Marrom escuro	(+)
G16	2435	+	#	Marrom escuro	(++)
	3010	+	Cinza claro // Branco	Marrom escuro	(+)
	3018	+	Cinza // Cinza claro	Bege	(-)

+ crescimento positivo; +/- crescimento medial; # ausência do parâmetro de avaliação; (+++), alta produção de melanina, (++) média produção de melanina, (+) produção de melanina positiva e (-) ausência de produção de melanina.

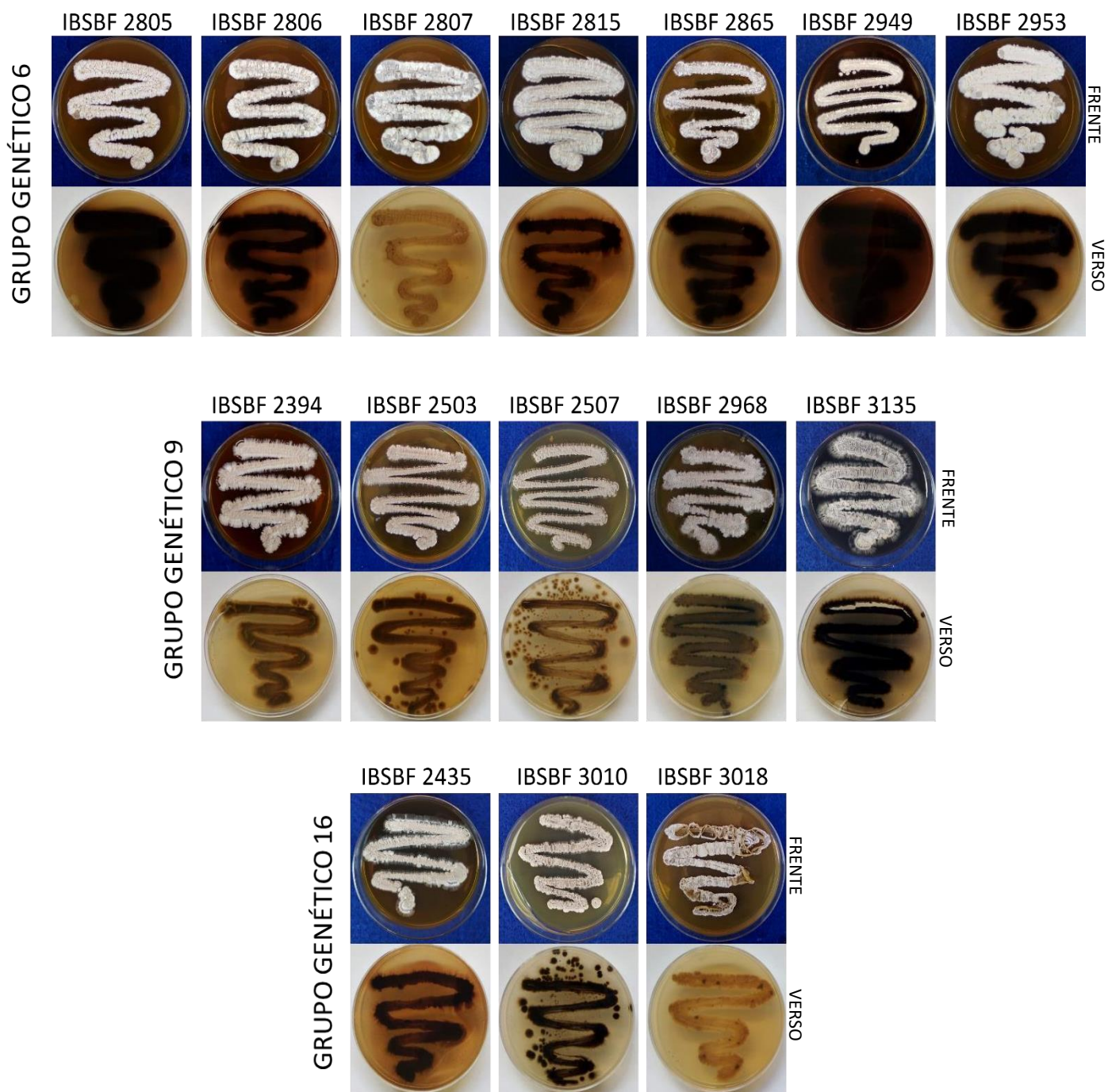


FIGURA 12: Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Tirosina Ágar (*Tirosine Agar*) (ISP 7).

5.1.1.7. Batata Dextrose Agar (BDA)

O meio de Batata Dextrose àgar (BDA), utilizado para o crescimento principalmente de leveduras e fungos, é apreciado pela indústria bioquímica pelo baixo valor de mercado do meio já formulado e com ótimo rendimento produtivo para a produção em massa e em tanques de fermentação. A infusão do amido presente na batata (planta hospedeira das linhagens desse estudo) e da disposição de um açúcar de rápida absorção (dextrose), fez com que a avaliação de caracterização nesse meio fosse pertinente.

Todas as linhagens do estudo cresceram nesse meio de cultivo, e apenas a linhagem IBSBF 2807 (G6) não apresentou esporulação, o que impossibilitou a avaliação de coloração de esporos (Tabela 9, Figura 13). A coloração dos esporos das linhagens avaliadas ficou em um padrão de coloração bem próximo, entre os espectros branco, cinza e cinza escuro.

Na avaliação da coloração das colônias houve uma diversificação maior das cores presentes, ficando entre marrom, marrom escuro, bege, amarelo e cinza (Tabela 9, Figura 13).

Com relação à produção de pigmento escuro, somente cinco linhagens foram negativas para essa característica, sendo elas IBSBF 2807 (G6); IBSBF 2503, IBSBF 2507, IBSBF 2968 e IBSBF 3135 (G9) (Tabela 9, Figura 13).

TABELA 9. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Batata Dextrose Agar (BDA).

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Cinza // Branco	Marrom escuro	(+)
	2806	+	Cinza // Branco	Marrom escuro	(+)
	2807	+	#	Bege	(-)
	2815	+	Branco // Cinza	Marrom escuro	(+)
	2865	+	Branco // Cinza claro	Marrom escuro	(+)
	2949	+	Cinza claro // Cinza	Marrom escuro	(+)
	2953	+	Branco // Cinza claro	Marrom escuro	(+)
G9	2394	+	Cinza // Branco	Marrom	(+)
	2503	+	Cinza // Cinza claro	Amarelo	(-)
	2507	+	Cinza claro // Bege	Amarelo	(-)
	2968	+	Cinza escuro	Cinza	(-)
	3135	+	Cinza claro // Branco	Cinza claro // Bege	(-)
G16	2435	+	Branco	Marrom	(+)
	3010	+	Cinza	Marrom escuro	(+)
	3018	+	Cinza // Cinza escuro	Marrom	(+)

+ crescimento positivo; +/- crescimento medial; # ausência do parâmetro de avaliação; (+) produção de pigmento; (-) ausência de pigmento

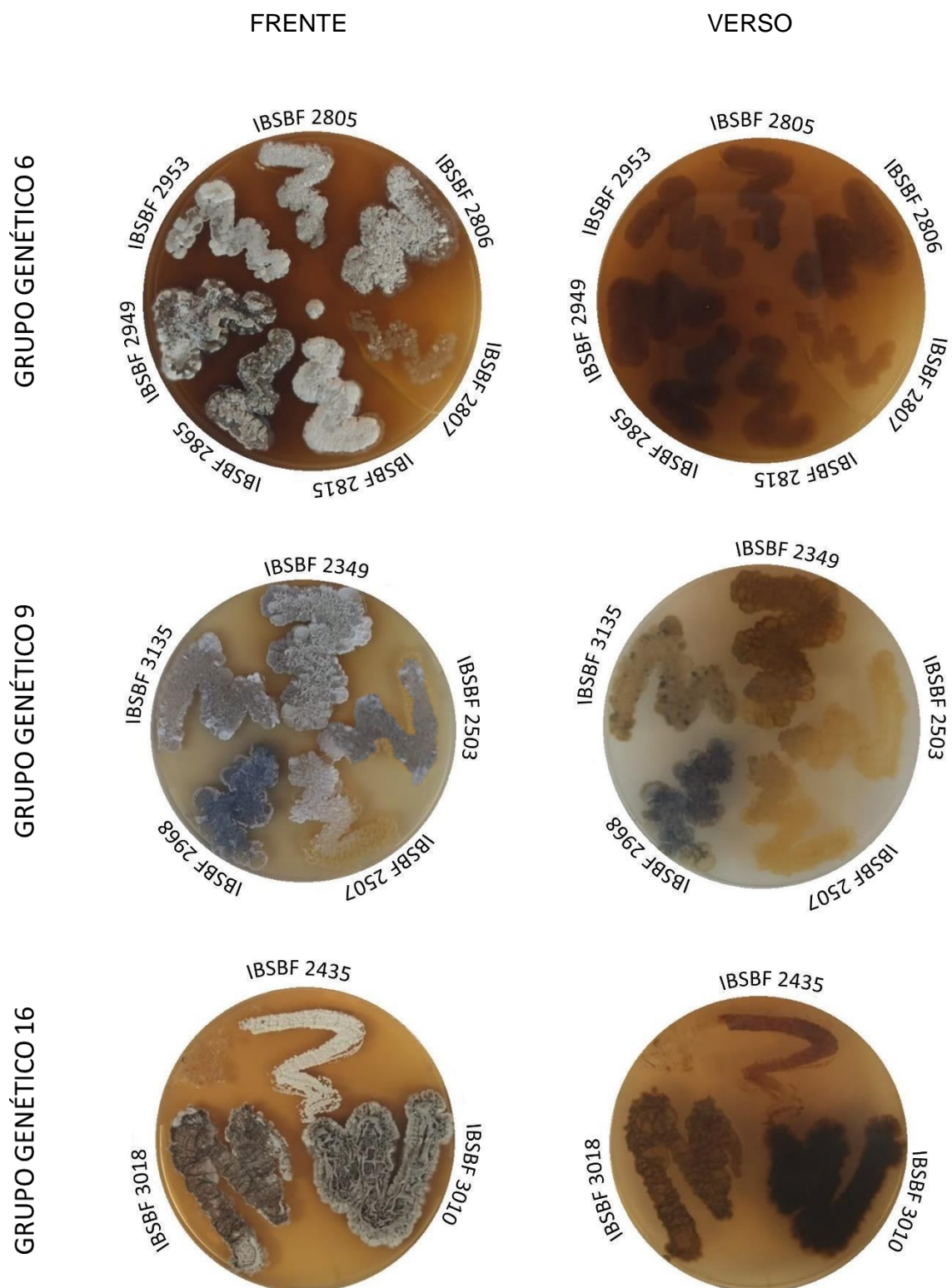


FIGURA 13. Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA), frente (esquerda) e verso (direita) das placas de Petri

5.1.1.8. Bennet's Agar

O meio de Bennet's Agar foi um meio desenvolvido para o enriquecimento das etapas de esporulação de linhagens de importância médica de *Nocardia* e *Streptomyces*. As altas dosagens de açúcar e de fontes nitrogenadas representam uma fácil fonte energética para o desenvolvimento das linhagens.

Todas as linhagens cresceram sobre esse meio de cultivo, contudo, duas linhagens, IBSBF 2807 (G6) e IBSBF 3010 (G16), não esporularam. Nas avaliações de coloração dos esporos verificou-se os tons de cinza, cinza claro, branco, marrom claro, marrom e creme.

Na observação de coloração das colônias nos versos das placas de Petri foram observadas as cores marrom, marrom claro, bege, creme, marrom escuro, roxo e rosa (Tabela 10, Figura 14).

Na avaliação de produção de pigmentos, quatro linhagens não apresentaram a característica, IBSBF 2807 (G6), IBSBF 2503 (G9), IBSBF 3010 e IBSBF 3018 (G16) (Tabela 10, Figura 14).

TABELA 10. Avaliação dos grupos genéticos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e de colônias; e produção de pigmento escuro no meio de cultivo de Bennete's Agar.

Grupo	IBSBF	Crescimento	Coloração esporo	Coloração colônia	Pigmento
G6	2805	+	Cinza claro // Marrom	Marrom escuro	(+)
	2806	+	Marrom // Cinza claro	Marrom	(+)
	2807	+	#	Bege	(-)
	2815	+	Branco // Cinza	Marrom	(+)
	2865	+	Branco // Cinza claro	Marrom claro	(+)
	2949	+	Marrom // Cinza	Marrom escuro	(+)
	2953	+	Creme // Marrom claro	Marrom claro	(+)
G9	2394	+	Cinza claro	Marrom claro	(+)
	2503	+	Cinza claro // Branco	Creme//Marrom claro	(-)
	2507	+	Cinza claro	Marrom claro//Creme	(+)
	2968	+	Cinza	Roxo	(+)
	3135	+	Cinza claro // Branco	Rosa // Roxo	(+)
G16	2435	+	Cinza claro // Branco	Marrom escuro	(+)
	3010	+	#	Bege	(-)
	3018	+	Creme // Cinza escuro	Bege	(-)

+ crescimento positivo; +/- crescimento medial; # ausência do parâmetro de avaliação; (+) produção de pigmento; (-) ausência de pigmento

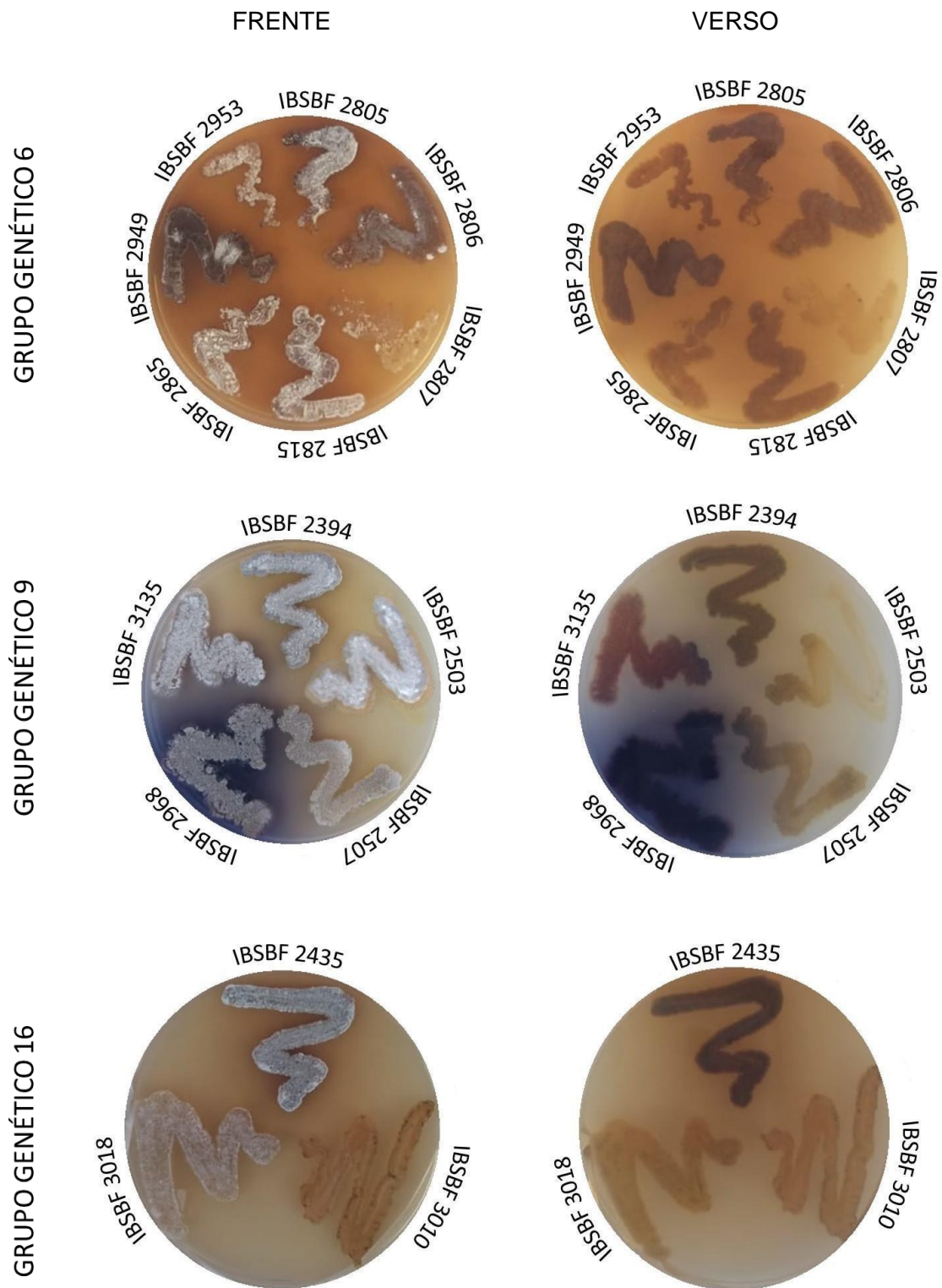


FIGURA 14: Avaliação dos grupos G6, G9 e G16 quanto ao crescimento, coloração de esporos e colônia; e produção de pigmento escuro em meio de cultivo Bennete's Agar, frente (esquerda) e verso (direita) das placas de Petri

5.1.2. Micromorfologia de hifas

Nas análises ao microscópio óptico (MO) da micromorfologia das hifas, os padrões observados demonstraram heterogenicidade tanto com relação às espécies Tipo quanto às linhagens dos grupos genéticos G6, G9 e G16. O número total da distribuição dessas características morfológicas foi: 14 espirais, 9 flexuosas e 3 espirais tufo. Curiosamente, as linhagens IBSBF 2435, IBSBF 3010 e IBSBF 3018 pertencentes ao G16 exibiram micromorfologias distintas entre si (Tabela 11, Figura 15).

TABELA 11. Avaliação de micromorfologia de hifas de linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata e de linhagens dos grupos G6, G9 e G16 ao microscópio óptico (MO).

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF	Micromorfologia de hifa
<i>S. scabiei</i>	2049 ^T	Espiral
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023 ^T	Espiral
<i>S. stelliscabiei</i>	2085 ^T	Espiral
<i>S. acidiscabies</i>	2110 ^T	Flexuosa
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086 ^T	Flexuosa
<i>S. turgidiscabies</i>	2114 ^T	Flexuosa
<i>S. caviscabies</i>	2051 ^T	Flexuosa
<i>S. setonii</i>	2106 ^T	Flexuosa
<i>S. luridiscabiei</i>	2011 ^T	Flexuosa
<i>S. puniscabiei</i>	2012 ^T	Flexuosa
<i>S. sampsonii</i>	2111 ^T	Flexuosa
G6	2805	Espiral
	2806	Espiral
	2807	Espiral
	2815	Espiral
	2865	Espiral
	2949	Espiral
	2953	Espiral
G9	2394	Espiral
	2503	Espiral
	2507	Espiral
	2968	Espiral tufo
	3135	Espiral tufo
G16	2435	Espiral
	3010	Espiral tufo
	3018	Flexuosa

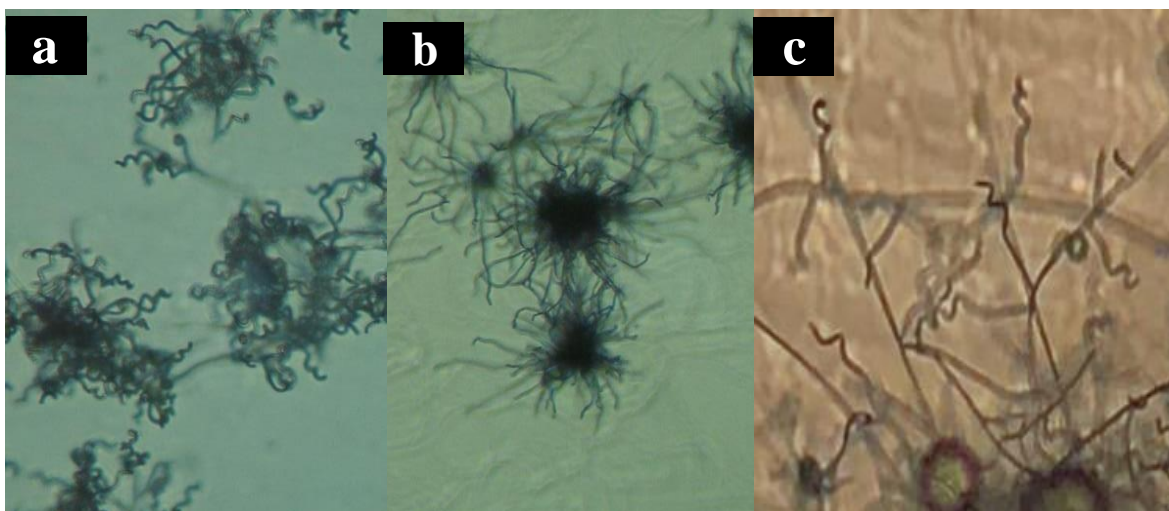


FIGURA 15. Micromorfologia de hifas ao MO do G16. (a) IBSBF 3010 (espiral tufo/100x); (b) IBSBF 3018 (flexuosa/100x); e (c) IBSBF 2435 (espiral/400x).

Nas análises da micromorfologia dos esporos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) as avaliações seguiram três tipos de parâmetros: superfície, formato e tamanho.

Todas as linhagens avaliadas apresentaram esporos lisos, com exceção da linhagem IBSBF 2503 (G9) que apresentou esporos espinhosos (Tabela 12, Figura 16, 17 e 18).

Na avaliação do formato dos esporos, três características foram observadas: **formato em bastão**, aquela em que um eixo se encontra demasiadamente maior que o outro, observado nas linhagens IBSBF 2805, IBSBF 2806, IBSBF 2815, IBSBF 2865, IBSBF 2949, IBSBF 2953 (G6) e IBSBF 2435 G16); **formato esférico**, linhagens IBSBF 2394, IBSBF 2503 e IBSBF 2968 (G9); por último, **formato retangular**, característica que os lados possuem tamanho similar entre si e com bordadura com eixos retos e, nesse caso, apenas a linhagem IBSBF 3010 (G16) apresentou tal característica. A combinação de dois formatos, bastão e esférico, quando um eixo se apresentou maior que o outro e simultaneamente com bordas arredondadas, foi observada em quatro linhagens, IBSBF 2807 (G6), IBSBF 2507 e IBSBF 3135 (G9); e IBSBF 3018 (G16) (Tabela 12, Figuras 16, 17 e 18).

O tamanho médio dos esporos das linhagens do G6, G9 e G16 ficou entre 0,6 e 1,0 μm .

TABELA 12. Avaliação de micromorfologia de esporos das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Grupo Genético	IBSBF	Micromorfologia de esporos		
		Tamanho (μm)	Formato	Superfície
G6	2805	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
	2806	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
	2807	0,5 x 0,8	Bastão//Esférico	Liso
	2815	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
	2865	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
	2949	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
	2953	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
G9	2394	0,5 x 0,6	Esférico	Liso
	2503	0,5 x 0,7	Esférico	Espinhoso
	2507	0,5 x 0,7	Bastão//Esférico	Liso
	2968	0,6 x 0,7	Esférico	Liso
	3135	0,5 x 0,7	Bastão//Esférico	Liso
G16	2435	0,7 x 1,0	Bastão	Liso
	3010	0,6 x 0,6	Retangular	Liso
	3018	0,7 x 1,0	Bastão//Esférico	Liso

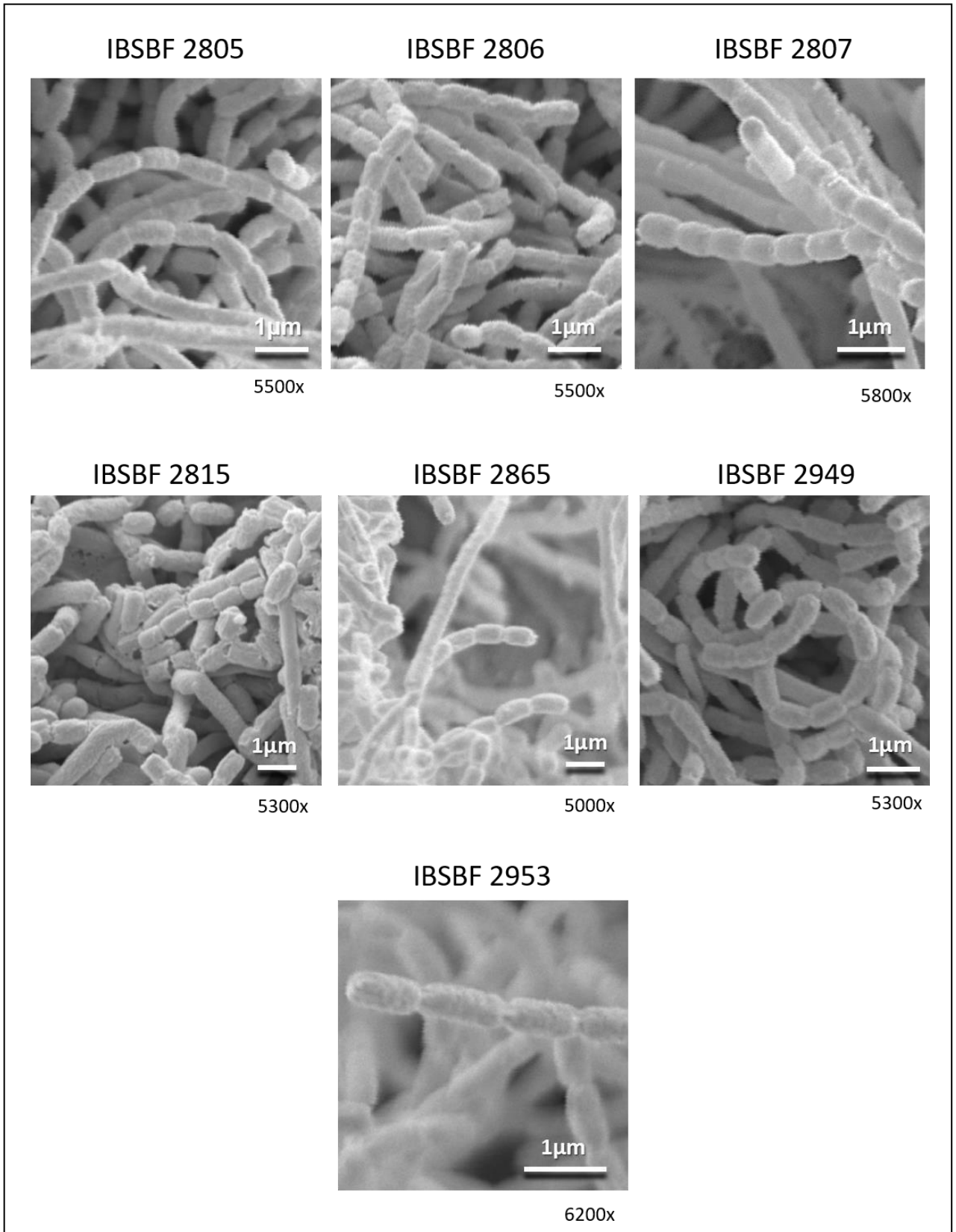


FIGURA 16. Micromorfologia de esporos do grupo genético G6 ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

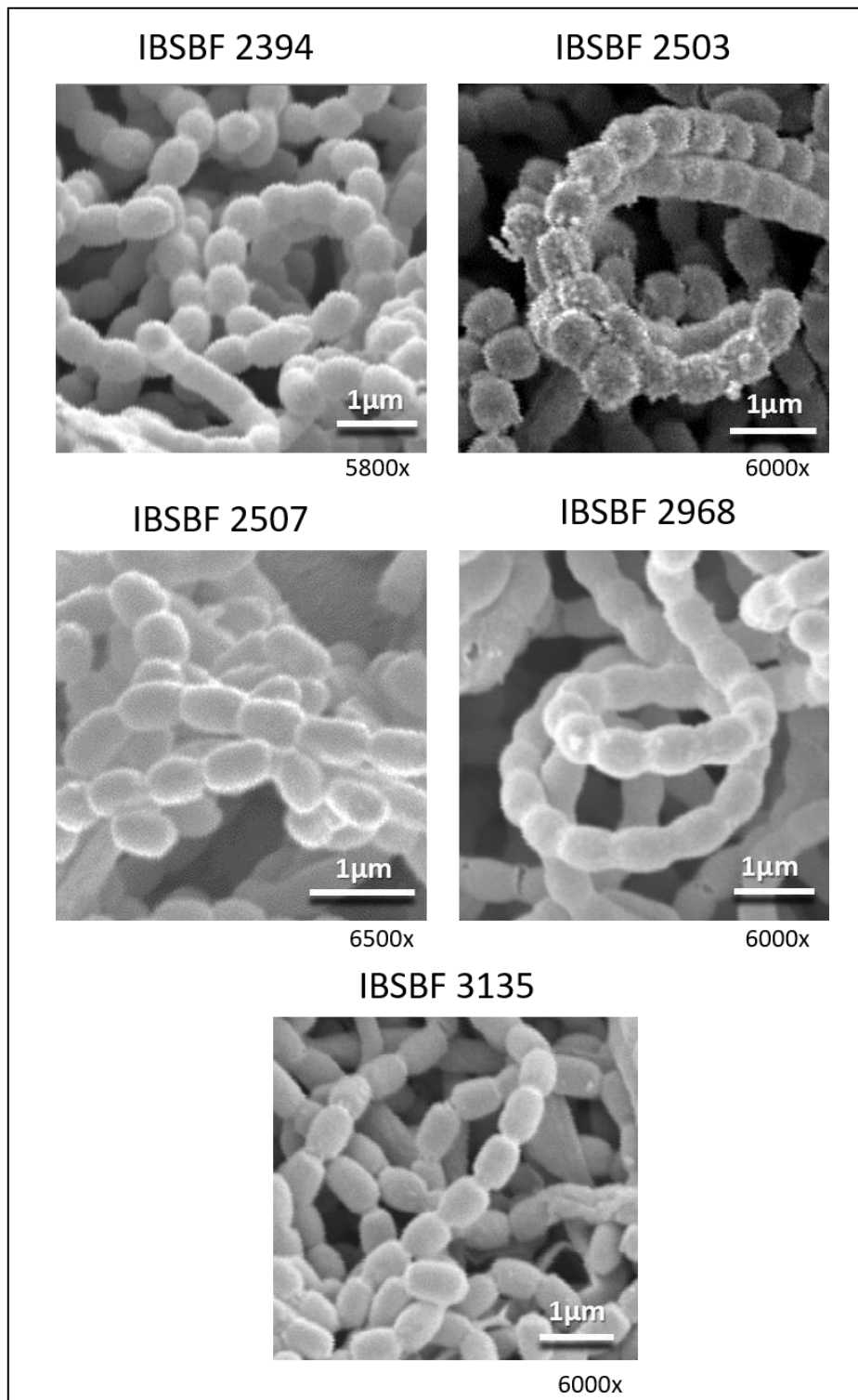


FIGURA 17. Micromorfologia de esporos do grupo genético G9 ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

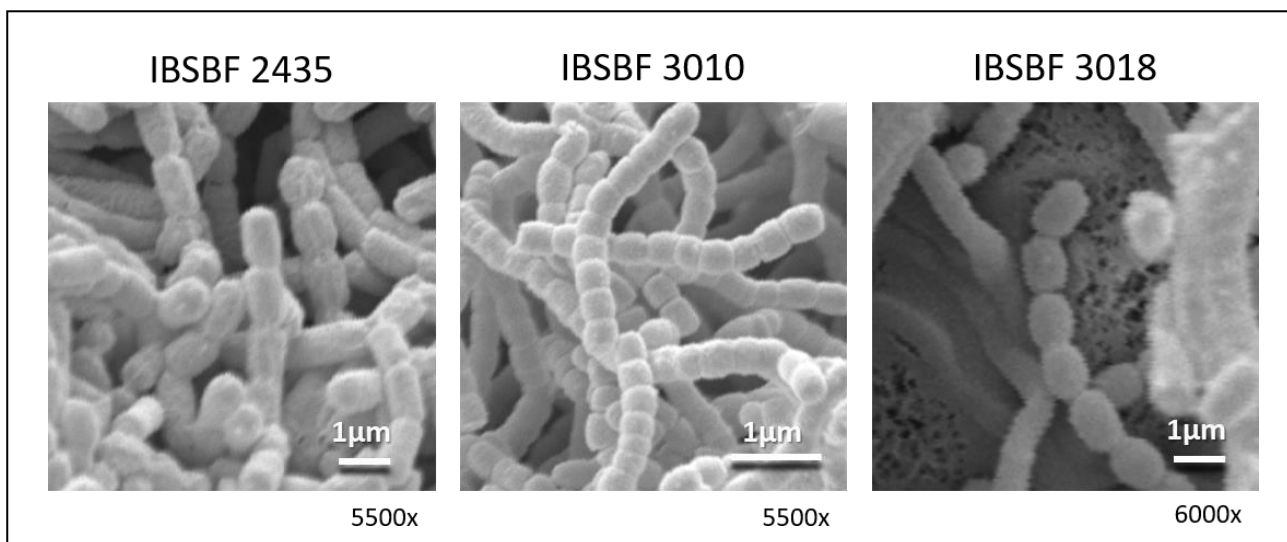


FIGURA 18. Micromorfologia de esporos do grupo genético G16 ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

As avaliações das características fenotípicas foram de suma importância no início dos processos de identificação das espécies de microrganismo levando a criação de grandes projetos de normalização dessa avaliação, como o *International Streptomyces Project* (ISP), citado na revisão deste trabalho. Hoje a morfologia das espécies de *Streptomyces* volta a ser discutida como um importante parâmetro de identificação principalmente na indústria bioquímica. De acordo com Van Diessel e colaboradores (2014), a produção metabólica das espécies de *Streptomyces* é diferente quando submetida à distintas fontes energéticas, químicas ou físicas; um passo importante para o avanço da descoberta de novas moléculas funcionais para as indústrias.

As características morfológicas apresentadas neste trabalho não são utilizadas isoladamente como determinantes na identificação de espécies de *Streptomyces*, mas são consideradas essenciais num estudo de taxonomia polifásica para descrição de novas espécies.

5.2. Caracterização bioquímica

De acordo com Anderson e Wellington (2001), a análise da utilização de carboidratos reforça o processo de caracterização das espécies de *Streptomyces* já que essa abordagem enriquece a caracterização morfológica, pois visa a distinção das necessidades metabólicas do microrganismo, assim como, é uma técnica bem fundamentada entre outros gêneros microbianos, podendo assim facilitar a classificação das linhagens em níveis inter e infraespecíficos.

Através das avaliações realizadas nos testes bioquímicos com as 15 linhagens pertencentes aos grupos genéticos G6, G9 e G16, juntamente com as linhagens Tipo fitopatogênicas de *Streptomyces*, foi possível estabelecer padrões de crescimento em diferentes fontes de carboidrato, permitindo, assim, a caracterização e diferenciação de espécies deste gênero (Tabela 13, Figura 19).

Primeiramente foi observado que todas as linhagens do G6, G9 e G16 apresentaram padrões de utilização de açúcares diferentes dos apresentados pelas linhagens Tipo de *Streptomyces* fitopatogênicas (Tabela 13). Verificou-se que os grupos apresentaram características bioquímicas diferentes entre si e também dentro de um mesmo grupo. O G16 foi o grupo com maior diversidade de resultados, reforçando em mais um teste que o mesmo pode conter espécies bacterianas bem diferentes (Tabela 13).

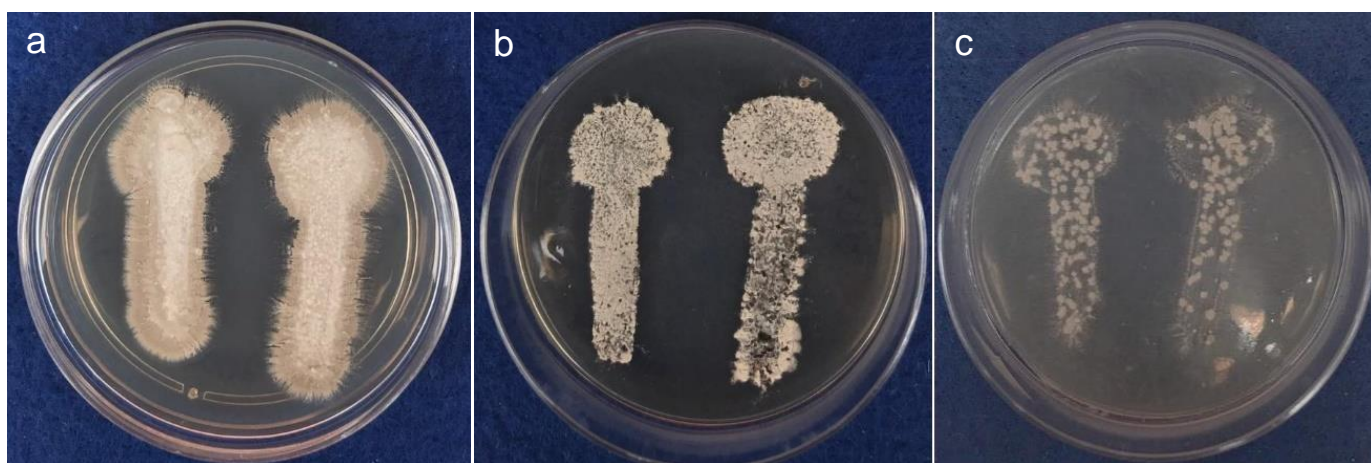


FIGURA 19. Crescimento da linhagem IBSBF 3018 (G16) em meio basal com diferentes fontes de carboidratos. (a) glicose (+); (b) frutose (+/-); e (c) meio basal (-). Onde (+) significa crescimento igual ou maior que o crescimento em meio básico com adição de glicose (controle positivo); (+/-) utilização duvidosa, quando o crescimento foi maior que o observado no controle negativo e menor que no controle positivo; (-) não utilização, crescimento similar ou menor que o controle negativo (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

TABELA 13. Avaliação da utilização de diferentes carboidratos pelas linhagens de *Streptomyces* spp.

Linhagens IBSBF		Controle (-) (meio básico)	Controle (-) (meio AA)	Controle (+) (Glicose)	Arab.	Frut.	Inos.	Raf.	Ram.	Suc.	Xil.	Man.
<i>S. scabiei</i>	2049	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. stelliscabiei</i>	2085	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. acidiscabiei</i>	2110	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. reticuliscabiei</i>	2114	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. turgidiscabies</i>	2086	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. caviscabies</i>	2111	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>S. setonii</i>	2051	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>S. luridiscabiei</i>	2106	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. puniciscabiei</i>	2011	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. sampsonii</i>	2012	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. ipomoeae</i>	2117	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G6	2805	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2806	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2807	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2815	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

G6	2865	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
	2949	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2953	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G9	2394	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	2503	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	2507	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	2968	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+
	3135	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
G16	2435	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	3010	-	-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-
	3018	-	-	+	+	+/-	+	-	+	+	+	+	+

Utilização de açúcares: Arab.:L-arabinose; Frut.:D-frutose; Inos.:mio-inositol; Man.: D-Manitol; Raf.: D-rafinose; Ram.: L-ramnose; Suc.: sucrose; Xil.: d-xilose; IBSBF (Coleção de culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas-SP, Brasil); + (utilização positiva); - (não utilização); +/- (utilização duvidosa segundo SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Áreas sombreadas indicam diferenças na utilização de carboidrato por linhagens pertencentes ao mesmo Grupo Genético.

5.3. Caracterização fisiológica

Os resultados da caracterização fisiológica vieram a corroborar os dados obtidos na caracterização morfológica e bioquímica. Este teste visou avaliar o comportamento das linhagens frente às condições de crescimento diferentes valores de pH, variações de temperatura e concentrações de salinidade (NaCl).

Os dados obtidos nos testes de pH revelaram que as linhagens nacionais apresentaram diferenças no crescimento e desenvolvimento. O grupo G6 apresentou crescimento positivo no limite de pH 9, com exceção da linhagem IBSBF 2807 que alcançou pH 10. As linhagens IBSBF 2435 e IBSBF 3018 (G16) apresentaram crescimento até pH 9, enquanto que a linhagem IBSBF 3010, outra integrante desse grupo, apresentou crescimento até o pH 11 (Tabela 14). Crescimento nos maiores valores de pH foi observado pelas linhagens IBSBF 2394 e IBSBF 2503 (G9), chegando em pH 12, porém com esporulação afetada (Tabela 14).

TABELA 14. Avaliação de crescimento das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 em meio de cultivo YME com diferentes valores de pH.

	Linhagens	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
G6	2805	-	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-
	2806	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
	2807	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-
	2815	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
	2865	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
	2949	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
	2953	-	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-
G9	2394	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-
	2503	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-
	2507	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	2968	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	3135	-	-	+	+	+	+	+	+	-
G16	2435	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
	3010	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	3018	-	-	+	+	+	+	-	-	-

+ (crescimento); - (ausência de crescimento); +/- (crescimento bacteriano, sem esporulação).

A condição de desenvolvimento em pH com valores altos se dá como característica de microrganismos de solo. A espécie recém descrita *S. alkaliscabies* foi caracterizada pelo seu

potencial de produzir sintomas de sarna comum em batata em condições de alcalinidade, com valores de pH 11. (ABDEL-RAHMAN et al., 2012).

As linhagens do estudo se mostraram sensíveis a valores baixos de pH (pH < 5), condição semelhante às linhagens pertencentes à espécie *S. scabiei*, contrariamente ao relatado por espécies que apresentaram crescimento em condições baixas de pH como, *S. acidiscabies* (pH 4,2) (LAMBERT; LORIA, 1989a; LAMBERT; LORIA, 1989b).

Com relação ao teste de tolerância à salinidade verificou-se-se que nenhuma das linhagens foi considerada dependente de salinidade, visto que todas se desenvolveram em porcentagem zero (0%) de NaCl. Seguindo os padrões de definição de microrganismos halotolerantes de Larsen (1986), as linhagens que apresentarem crescimento em níveis inferiores à 8% de NaCl, são denominados levemente halotolerantes, dessa forma, foram consideradas todas as linhagens do G6, com exceção da IBSBF 2807, e as linhagens IBSBF 3135 (G9), IBSBF 2435 e IBSBF 3018 (G16) inclusas nesse padrão. Ainda, de acordo com o autor, foram denominados moderadamente halotolerantes, microrganismos com tolerância a salinidade em 8% ou mais, e nesse sentido incluíram-se assim as linhagens IBSBF 2807 (G6), as linhagens do G9 IBSBF 2394, IBSBF 2503, IBSBF 2507, IBSBF 2968 e a linhagem IBSBF 3010 do G16. Três linhagens do G9, IBSBF 2394, IBSBF 2507 e IBSBF 2968 apresentaram crescimento também em 10% de NaCl, a maior porcentagem de concentração de salinidade avaliada nesse estudo (Tabela 15).

TABELA 15. Avaliação de crescimento das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 em meio de cultivo YME com adição de diferentes concentrações de NaCl (%).

	Linhagens	0%	1%	2%	4%	6%	8%	10%
G6	2805	+	+	+	+	+	-	-
	2806	+	+	+	+	+	-	-
	2807	+	+	+	+	+	+	-
	2815	+	+	+	+	+	-	-
	2865	+	+	+	+	+	-	-
	2949	+	+	+	+	+	-	-
	2953	+	+	+	+	+	-	-
G9	2394	+	+	+	+	+	+	+
	2503	+	+	+	+	+	+	-
	2507	+	+	+	+	+	+	+
	2968	+	+	+	+	+	+	+
	3135	+	+	+	+	+	-	-
G16	2435	+	+	+	-	-	-	-
	3010	+	+	+	+	+	+	-
	3018	+	+	+	+	+	-	-

+ (crescimento); - (ausência de crescimento)

As análises para a compreensão do crescimento microbiológico em diferentes valores de temperatura são discutidas por Pelczar et al. (1996), onde temos a definição de cinco tipos de desenvolvimento microbiano relacionado a temperatura: os psicrófilos (crescimento dentre -10°C a 20 °C, ideal de 10 °C a 15 °C), os psicotróficos (crescimento tanto em temperatura de refrigeração, 5 °C, quanto em valores superiores a temperatura ambiente), os mesófilos (microrganismos ambientais mais comuns, variando entre os 10 °C – 40 °C, podendo sobreviver até 50 °C), termófilos (organismos com necessidade para se desenvolver em temperaturas quentes, acima dos 40 °C) e hipertermófilos (organismos descobertos em proximidades de vulcões com temperaturas mínimas superiores a 60 °C).

Nos testes de crescimento em diferentes temperaturas todas as linhagens enquadraram-se no parâmetro mesófilo, visto que todas cresceram a partir de 10 °C, e em sua maioria chegando até 37 °C. As únicas linhagens que cresceram até 40 °C foram IBSBF 2503, IBSBF 2507 e IBSBF 2968 (G9); e IBSBF 3010 (G16) (Tabela 16).

TABELA 16. Avaliação de crescimento das linhagens dos grupos G6, G9 e G16 em meio de cultivo YME em diferentes temperaturas (°C).

	Linhagens	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	32 °C	34 °C	37 °C	40 °C
G6	2805	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2806	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2807	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2815	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2865	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2949	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2953	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G9	2394	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2503	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2507	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2968	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3135	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G16	2435	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	3010	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3018	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

+ (crescimento); - (ausência de crescimento)

5.4. Caracterização patogênica

Diferentes fatores estão envolvidos na caracterização patogênica de espécies de *Streptomyces*, as principais discussões ficam com: a fitotoxina taxtomina, que atua principalmente na ligação, penetração, colonização e inibe a biossíntese de celulose, que compromete a integridade da parede celular, causando a hipertrofia e morte da célula; e a proteína Nec1 e a enzima tomatinase, ambas que auxiliam na evasão do hospedeiro, hidrolizando receptores de defesa da planta e o produto dessa hidrólise reprime a resposta de proteção induzida, interferindo em processos de transdução de sinal que são essenciais para a resistência à doença (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Assim, a patogenicidade de linhagens de *Streptomyces* requer uma produção coordenada de uma variedade de produtos, incluindo outros múltiplos metabólitos secundários e secreção de proteínas que vem sendo descobertos e discutidos (LORIA et al., 2008; LI et al., 2019b). Algumas espécies de *Streptomyces* patogênicas e causadoras dos sintomas de sarna não possuem nenhum dos genes da PAI (*pathogenicity island*), sendo que estas provavelmente utilizam outras vias ainda não estudadas, por isso o aprofundamento dessa caracterização com testes *in vitro* é necessária para as delimitações de um processo de identificação de uma espécie fitopatogênica.

5.4.1. Teste de patogenicidade em sementes de rabanete

Espécies fitopatogênicas podem inibir o crescimento de mudas de espécies de mono e dicotiledôneas, incluindo o rabanete, causando sintomas macroscópicos como a redução do tamanho e espessamento da parte aérea e raízes (LEINER et al., 1996). Estudo realizado por Hooker (1949) demonstrou uma correlação entre a patogenicidade de linhagens de *Streptomyces* em tubérculos de batata e mudas de rabanete, sugerindo em seu trabalho que pode haver um mecanismo comum de patogenicidade.

Todas as 15 linhagens do presente estudo se mostraram patogênicas nos testes efetuados com sementes de rabanete quando comparadas ao controle negativo sem inoculação bacteriana. Foram observados sintomas de necrose, nanismo e anormalidades na raiz (Figura 26).

Nesse experimento foram atribuídas notas de acordo com escala descrita por Leiner e colaboradores (1996), determinada perante as médias do comprimento (mm) do caule e da raiz das plantas com inoculação bacteriana, em comparação com tratamento sem inoculação (controle). Essas médias percentuais geradas pelas medidas foram transformadas em notas (de 0

a 4), e somadas de acordo um padrão para a parte aérea e outro para a raiz, ou seja, linhagens mais virulentas receberam notas próximas a oito (8) (Quadro 1). Duas linhagens foram mais virulentas, isolados IBSBF 2807 e IBSBF 2953, visto que obtiveram notas máximas (4) para os dois parâmetros avaliados (Tabela 17, Figura 26). Além disso outras sintomatologias clássicas de avaliações fitossanitárias foram observadas, como clorose de folhas e necrose de caule e raiz (Figura 26).

A avaliação em sementes de rabanete pode ser um teste rápido de hipersensibilidade para linhagens de *Streptomyces*, porém, visto que a linhagem IBSBF 3018 deste estudo apresentou baixa virulência nesse experimento, cabe-se ainda o reforço da avaliação de patogenicidade em seu verdadeiro hospedeiro, neste caso tubérculos de batata.

TABELA 17. Avaliação de teste de patogenicidade *in vitro* em sementes de rabanete.

Linhagens		Virulência em semente de rabanete		
		Parte aérea	Raiz	Total
G6	2805	4	3	7
	2806	4	3	7
	2807	4	4	8
	2815	3	3	6
	2865	3	4	7
	2949	2	2	4
	2953	4	4	8
G9	2394	4	3	7
	2503	4	3	7
	2507	3	3	6
	2968	1	2	3
	3135	3	2	5
G16	2435	2	2	4
	3010	2	2	4
	3018	1	1	2

Notas dadas em relação a média comparada ao tratamento controle: **0**, 100% ou superior; **1**, acima de 75,1%; **2**, entre 50,1 a 75%; **3**, entre 25,1 a 50%; e **4**, abaixo de 25%.

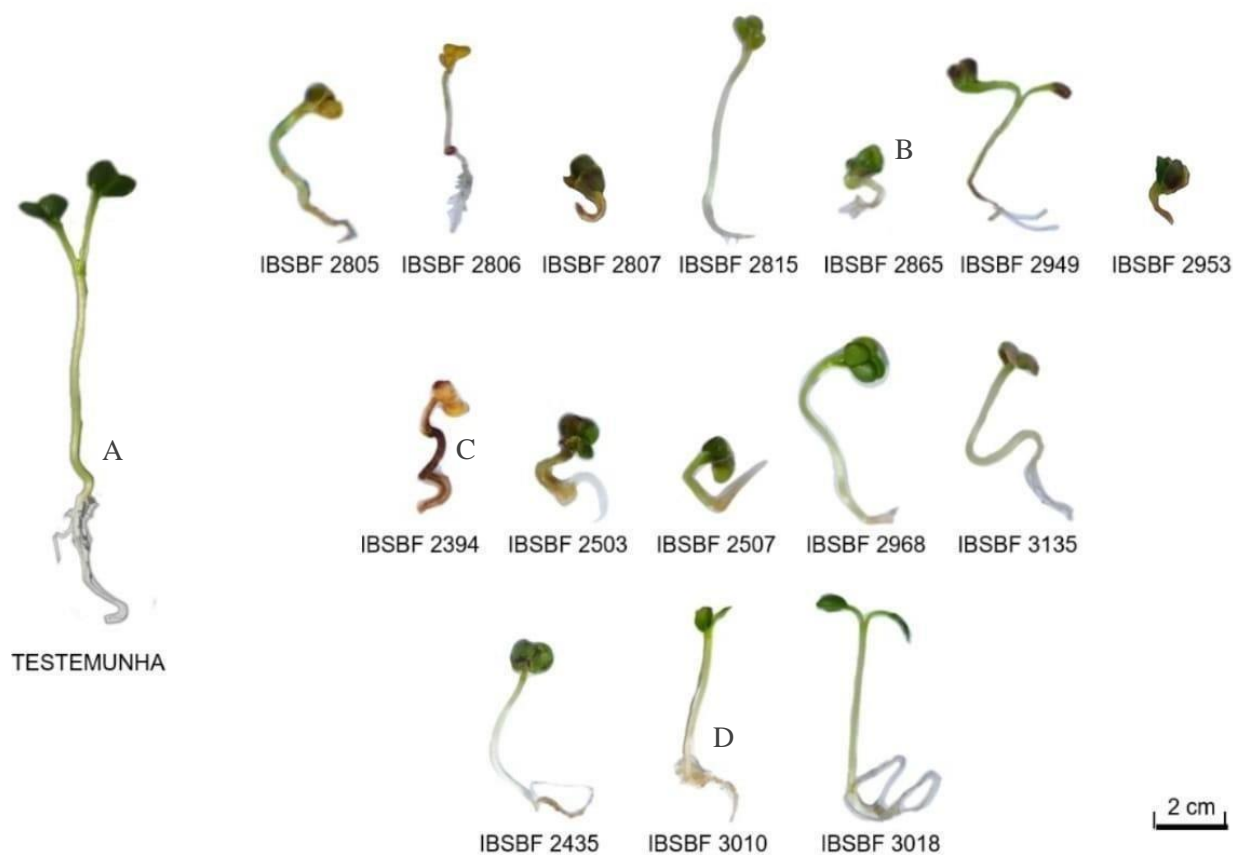


FIGURA 20. Teste de patogenicidade *in vitro* das linhagens dos grupos genéticos G6, G9 e G16 em sementes de rabanete. (A) normal, (B) nanismo, (C) necrose e (D) anormalidade de raiz.

5.4.2. Teste de patogenicidade em discos de batata

Testes em discos de batata foram efetuados para confirmar a patogenicidade das linhagens em estudo (Postulado de Koch), assim prova-se que os isolados são intrinsecamente correlacionados as lesões de tubérculos e não organismos de caráter oportunista.

Todas as 15 linhagens pertencentes aos Grupos G6, G9 e G16 oriundas de regiões produtoras de batata no Brasil mostraram-se patogênicas nos testes com discos de batata. Essa avaliação foi apenas qualitativa, não sendo calculado o grau de severidade da doença, visto que, pode haver variação de sintomas dependendo do cultivar de batata que é posta como hospedeira (Figura 27).

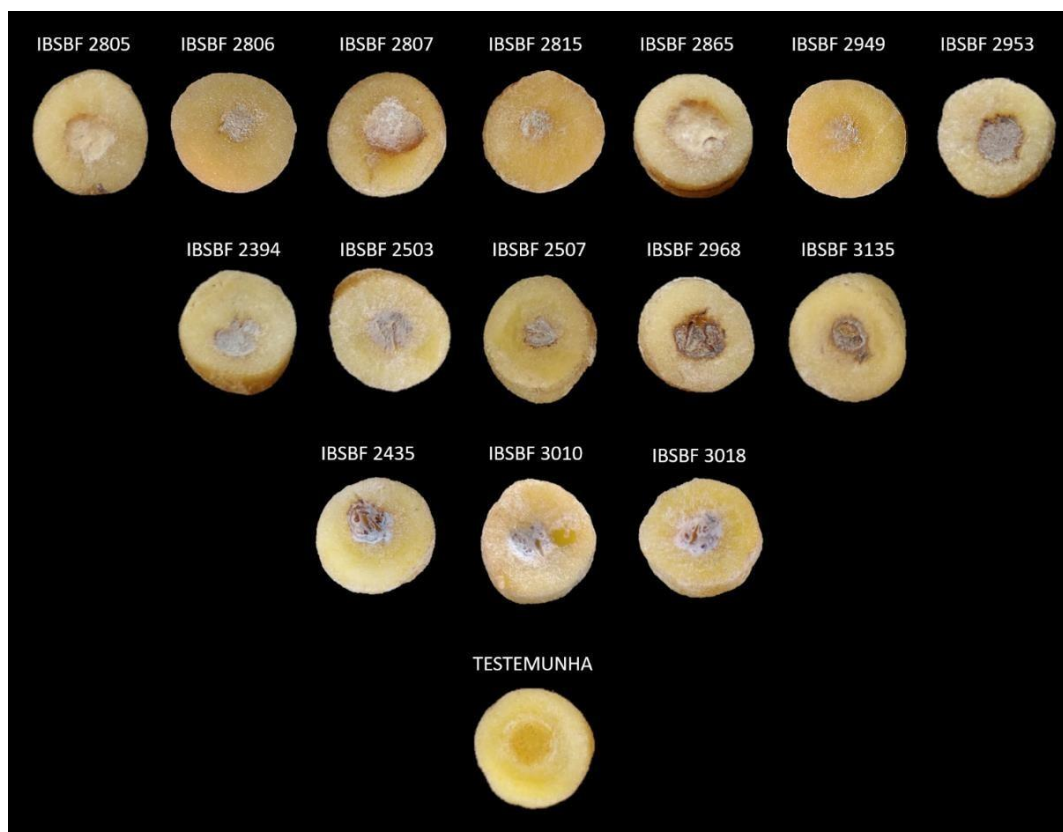


FIGURA 21. Teste de patogenicidade das linhagens do G6, G9 e G16 em discos de batata.

5.4.3. Avaliação da presença dos genes de patogenicidade *txtAB*, *nec1* e *tomA*

A verificação da presença dos genes de produção da taxtomina A e presença das proteínas necrogênica Nec1 e tomatinase A foi utilizada como ferramenta para caracterização de algumas linhagens patogênicas de *Streptomyces* como: *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies* (BUKHALID; LORIA, 1997; BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998).

Dessa forma, a etapa de amplificação dos genes de patogenicidade conhecidos como padrões e pentercentes a região descrita como PAI (*pathogenicity island*) por Huguet-Tapia e colaboradores (2014), foi utilizada para complementar a caracterização patogênicas dos grupos genéticos.

Ao todo, seis linhagens IBSBF 2865, IBSBF 2949 e IBSBF 2953 (G6); IBSBF 2503 (G9); e IBSBF 3010 e IBSBF 3018 (G16) apresentaram amplificação do operon *txtAB*, que corresponde a região para a produção de taxtomina A, fitotoxina mais conhecida na descrição patogênica de *Streptomyces* (Tabela 18, Figura 22).

TABELA 18. Avaliação da presença dos genes de patogenicidade *txtAB*, *nec1* e *tomA*

Linhagens		Genes de patogenicidade		
		operon <i>txtAB</i>	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>
G6	2805	-	-	+
	2806	-	-	-
	2807	-	-	+
	2815	-	-	+
	2865	+	-	+
	2949	+	-	+
	2953	+	-	+
G9	2394	-	-	-
	2503	+	+	+
	2507	-	-	-
	2968	-	+	-
	3135	-	-	-
G16	2435	-	-	+
	3010	+	-	-
	3018	+	-	+

+ (amplificação positiva); - (amplificação negativa)

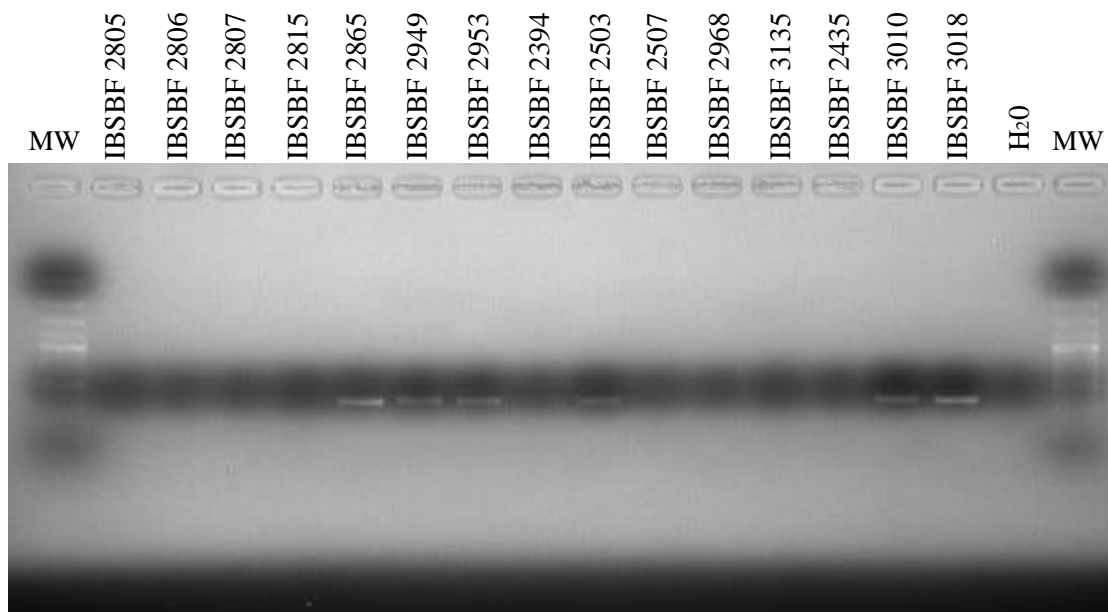


FIGURA 22. Produtos de amplificação do operon *txtAB* apresentados pelas linhagens dos grupos genéticos G6, G9 e G16. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

Embora a proteína necrogênica Nec1, codificada pelo gene *nec1*, seja responsável pelos sintomas de necrose nos tecidos vegetais (BUKHALID; CHUNG; LORIA., 1998; LI et al., 2019b), apenas duas linhagens do G9 apresentaram amplificação positiva para esse gene, IBSBF 2503 e IBSBF 2968 (Tabela 18, Figura 23).

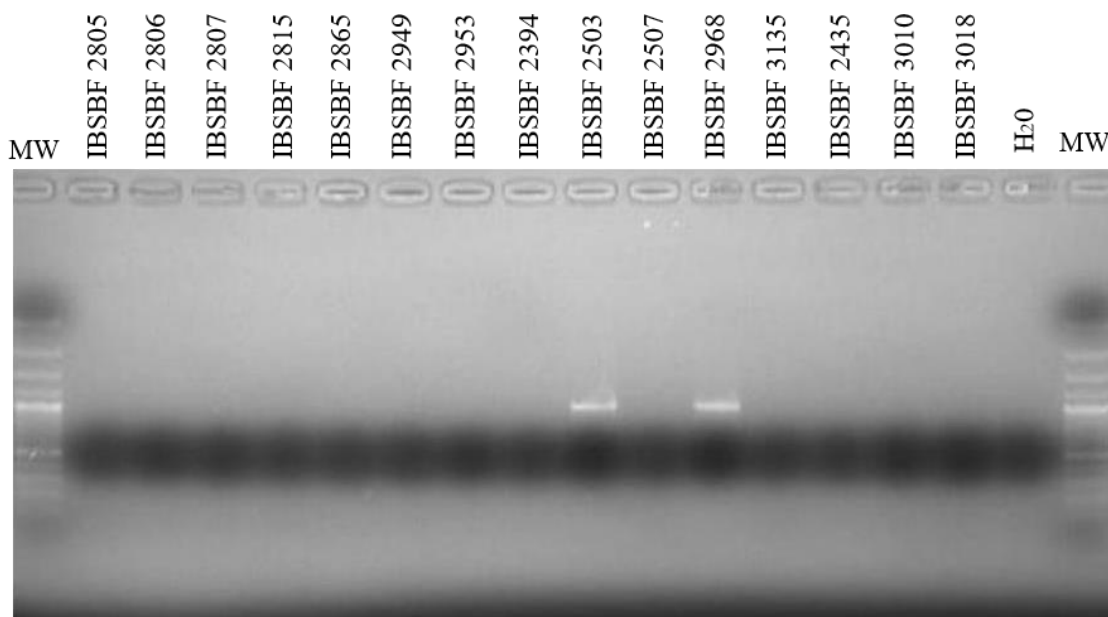


FIGURA 23. Produtos de amplificação do gene *nec1* apresentados pelas linhagens dos grupos genéticos G6, G9 e G16. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

A enzima tomatinase, codificada pelo gene *tomA*, hidroliza a alfa-tomatina e o produto dessa hidrólise reprime uma resposta de defesa da planta permitindo os processos de invasão bacteriana (BUKHALID; CHUNG; LORIA., 1998; LI et al., 2019b). Nove linhagens geraram amplificação positiva para o gene *tomA*, sendo elas IBSBF 2805, IBSBF 2807, IBSBF 2815, IBSBF 2965, IBSBF 2949, IBSBF 2953 (G6); IBSBF 2503 (G9); e IBSBF 2435 e IBSBF 3018 (G16) (Tabela 18, Figura 24).

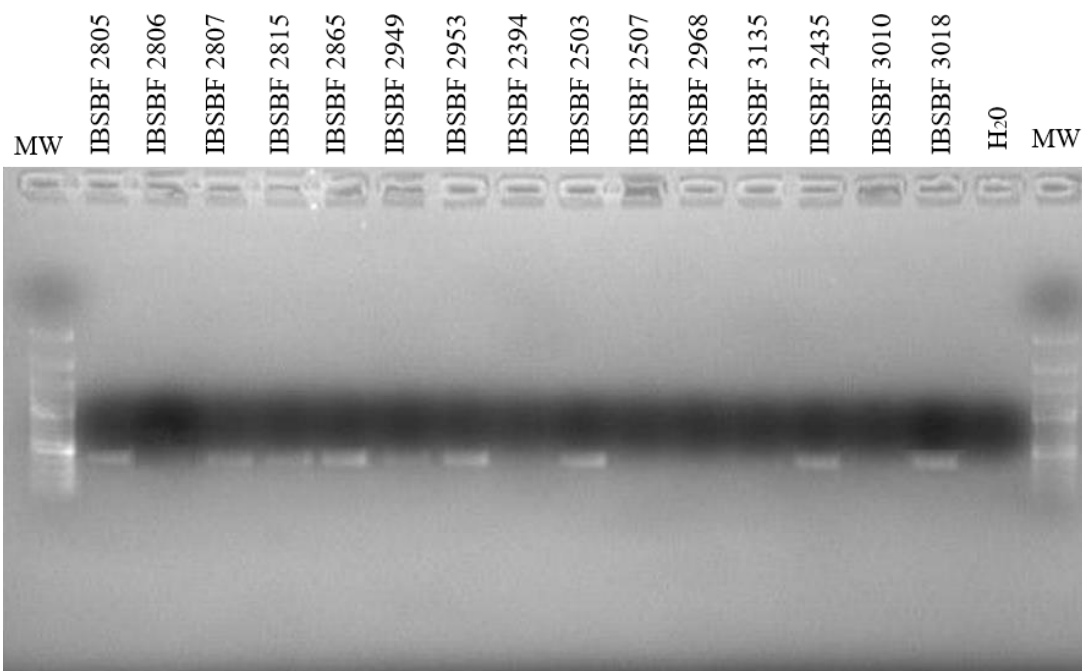


FIGURA 24.. Produtos de amplificação do gene *tomA* apresentados pelas linhagens dos grupos genéticos G6, G9 e G16. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

Tendo toda a compilação dos dados dos genes de patogenicidade, vemos que, apenas uma linhagem, a IBSBF 2503, teve amplificação para os três genes avaliados, já para quatro linhagens (IBSBF 2806, IBSBF 2394, IBSBF 2507 e IBSBF 3135) não obteve amplificação para nenhum dos genes dos experimentos.

Os resultados de presença e ausência dos genes de patogenicidade das linhagens desse estudo demonstram a grande complexidade que o sistema genético do patossistema das espécies de *Streptomyces*.

As diferentes combinações de amplificação dos genes de patogenicidade observadas são importantes para o entendimento do mecanismo patogênico das linhagens envolvidas nesse estudo. Porém esses dados não foram utilizados para fins taxonômicos de caracterização das espécies do projeto, uma vez que estudos também relatam a ocorrência de variações nas ilhas de patogenicidade entre linhagens de uma mesma espécie, como observado em *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. turgidiscabies* (DEES; SLETTEN; HERMANSEN, 2013; WANNER, 2006).

5.5. Caracterização molecular

5.5.1. Análise PCR-RFLP do gene *atpD* *in silico*

A partir da análise de PCR-RFLP do gene *atpD* (*in silico*) foi possível observar diferenças nos padrões de restrição gerados entre as linhagens Tipo e os grupos genéticos G6, G9 e G16 (Figura 25, 26 e 27).

Na avaliação da digestão com a enzima *CfoI*, os padrões de bandas gerados agruparam as linhagens IBSBF 2805, IBSBF 2806, IBSBF 2815 e IBSBF 2949 pertencentes ao G6 com as linhagens Tipo de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T), *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) e *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T). Os isolados IBSBF 2807, IBSBF 2865 e IBSBF 2953 apresentaram perfis idênticos entre si, porém diferentes de qualquer outro grupo genético ou linhagem Tipo testada. No G9, foram observados dois agrupamentos; o primeiro com IBSBF 2394, IBSBF 2503 e IBSBF 2507, e o segundo com as linhagens IBSBF 2968 e IBSBF 3135. Os perfis gerados nesse grupo foram diferentes de qualquer outro padrão observado e curiosamente, as três linhagens também apresentaram padrões de banda totalmente diferentes entre si (Figura 25).

Nas digestões com a enzima *HaeIII* os perfis obtidos possibilitaram separar os grupos genéticos (G6, G9 e G16) das linhagens Tipo fitopatogênicas de *Streptomyces*. Também foi

possível separar as genomoespécies *S. scabiei* (IBSBF 2049^T) e *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); e *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) e *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T). Nas análises do G6, apenas a linhagem IBSBF 2953 se separou das demais pertencentes ao mesmo grupo. No G9 foram observados três diferentes perfis de restrição, um único para a linhagem IBSBF 2394; um segundo com IBSBF 2503 e IBSBF 2507; e por último um terceiro com as linhagens IBSBF 2968 e IBSBF 3135. Como observado nas digestões com a enzima *CfoI*, as três linhagens do G16 apresentaram perfis diferentes entre si e em comparação com os outros padrões obtidos (Figura 26).

Como relatado por Corrêa (2015), o emprego da técnica de PCR-RFLP possibilitou não somente separar as linhagens Tipo de *Streptomyces* fitopatogênicas, como também diferenciou genomoespécies como: *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T) e *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); e *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) e *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T). A espécie *S. setonii* (IBSBF 2106^T) é considerada sinônimo de *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T) (Liu et al. (2005) , e os dados obtidos no presente estudo corroboram esse fato visto que em todas as análises essas duas espécies apresentaram perfis idênticos (Figura 27).

Também foi efetuada uma análise de digestão dupla (*CfoI/HaeIII*) e os resultados revelaram nove padrões distintos entre os grupos sendo:

- (1) IBSBF 2805, IBSBF 2806, IBSBF 2815 e IBSBF 2949 (G6);
- (2) IBSBF 2807 e IBSBF 2865 (G6);
- (3) IBSBF 2953 (G6);
- (4) IBSBF 2394 (G9);
- (5) IBSBF 2503 e IBSBF 2507 (G9);
- (6) IBSBF 2968 e IBSBF 3135 (G9);
- (7) IBSBF 2435 (G16);
- (8) IBSBF 3010 (G16); e
- (9) IBSBF 3018 (G16)

Os resultados de caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica e a digestão do gene *atpD* fortemente indicam a existência de novas espécies de *Streptomyces*, inclusive com mais de uma em cada grupo genético analisado.

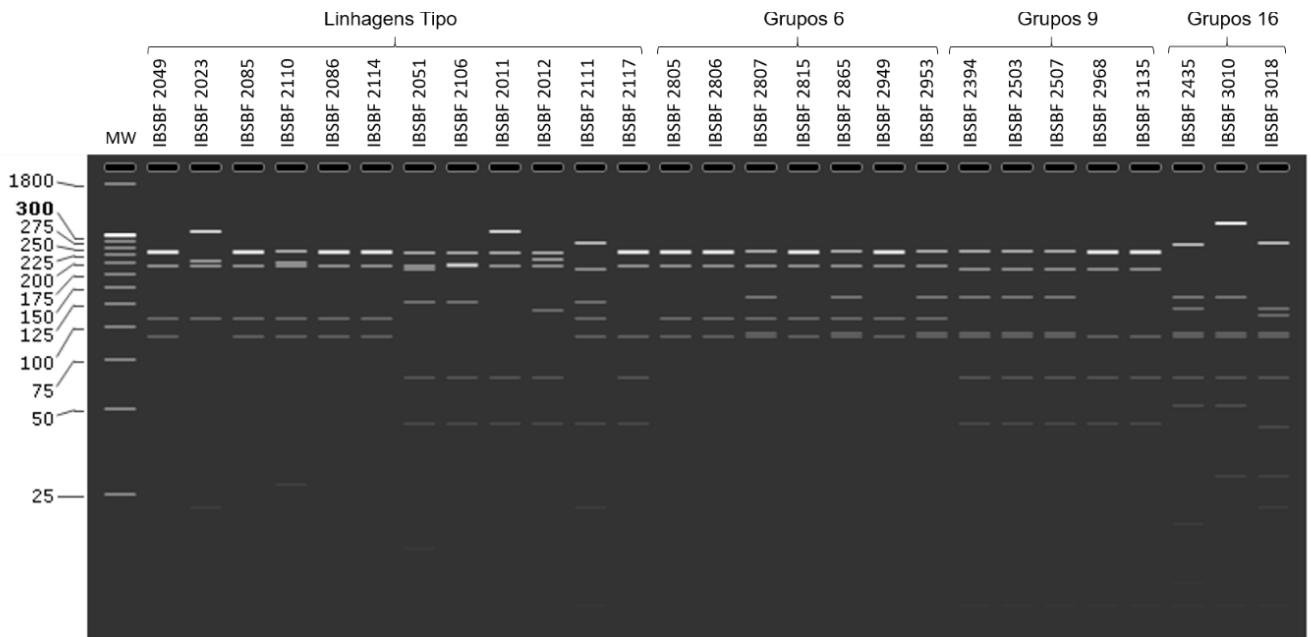


FIGURA 25. Padrões de bandas de restrição do PCR-RFLP *in silico* do gene *atpD* utilizando a enzima *CfoI*. Gel de eletroforese 1,5% gerado no software online SnapGene.

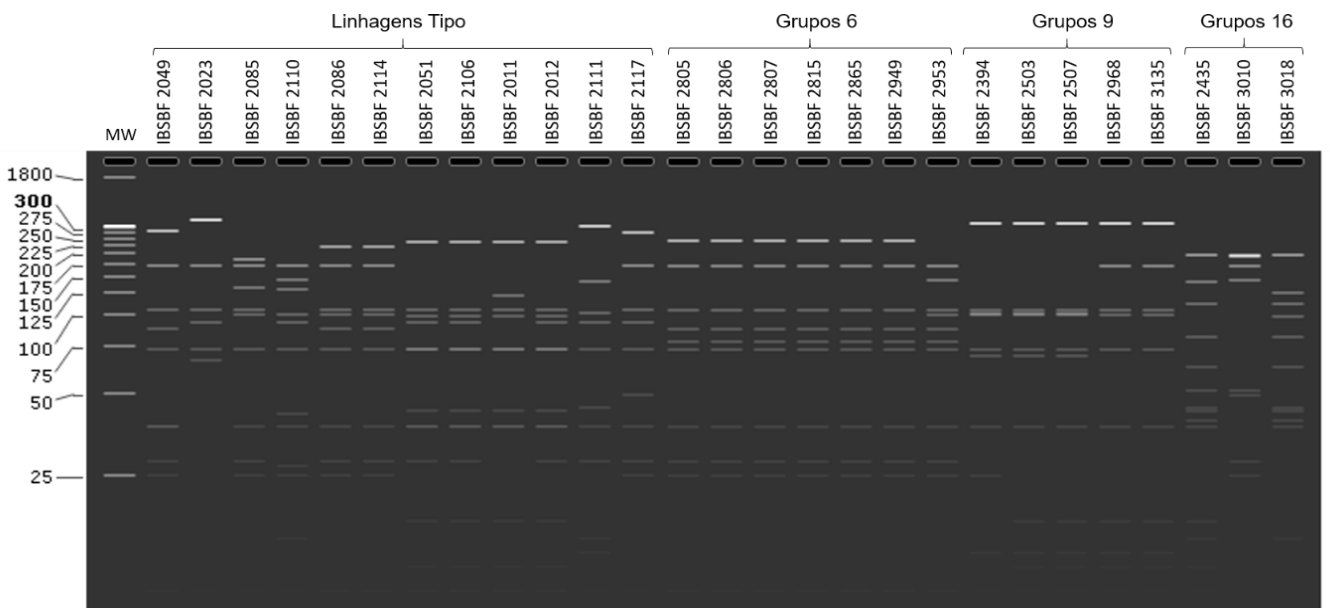


FIGURA 26. Padrões de bandas de restrição do PCR-RFLP *in silico* do gene *atpD* utilizando a enzima *HaeIII*. Gel de eletroforese 1,5% gerado no software online SnapGene.

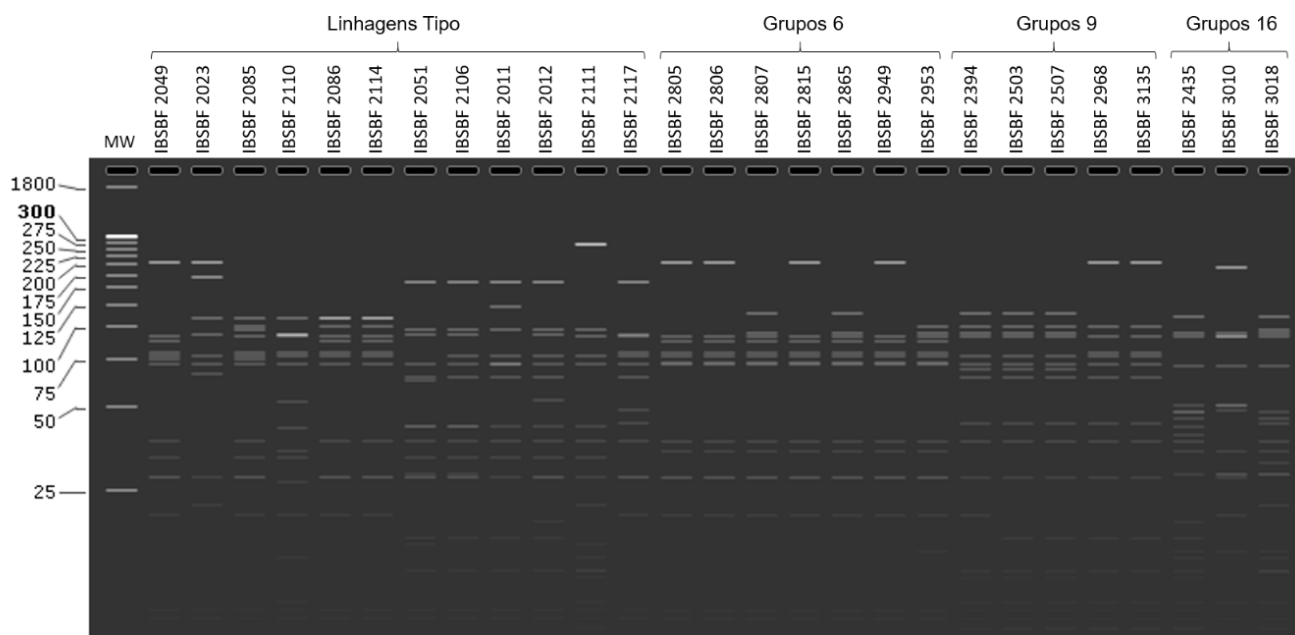


FIGURA 27. Padrões de bandas de restrição do PCR-RFLP *in silico* do gene *atpD* utilizando simultaneamente as enzimas *CfoI* e *HaeIII*. Gel de eletroforese 1,5% gerado no software online SnapGene.

5.5.2. Análise filogenética

5.5.2.1. Análise filogenética do gene 16S RNAr

As sequências obtidas da amplificação do gene 16S RNAr das 15 linhagens deste estudo foram alinhadas com as 12 linhagens Tipo fitopatogênicas de *Streptomyces* para a construção da árvore filogenética (Figura 28) e matriz de similaridade (Tabela Compl. 1).

A topologia da árvore filogenética gerada revelou a ocorrência de nove diferentes grupos, sendo que as linhagens pertencentes aos grupos genéticos ficaram em braços distintos das linhagens Tipo descritas na literatura. As linhagens do G6 ficaram separadas em dois grupos (I e III) com a linhagem Tipo de *S. acidiscabiei* (II) entre eles. A extensão do braço exibida pela linhagem Tipo revelou que há uma grande diferença na composição dos nucleotídeos, o que foi corroborado pelos dados da matriz de similaridade que mostrou 90,97% (com o grupo I) e 92,34% (com o grupo III). As linhagens do G9 ficaram divididas em dois grupos (VII e VIII) e as do G16 formaram o grupo IX. (Figura 28, Tabela Compl. 1).

De acordo com Kim e colaboradores (2014), para descrição de novas espécies utilizando apenas as sequências do gene 16S RNAr, a porcentagem de similaridade a ser considerada como de uma mesma espécie deve ser acima de 98,65%. Desse modo, os resultados obtidos reforçam, mais uma vez, a ocorrência de novas espécies dentro dos grupos genéticos analisados.

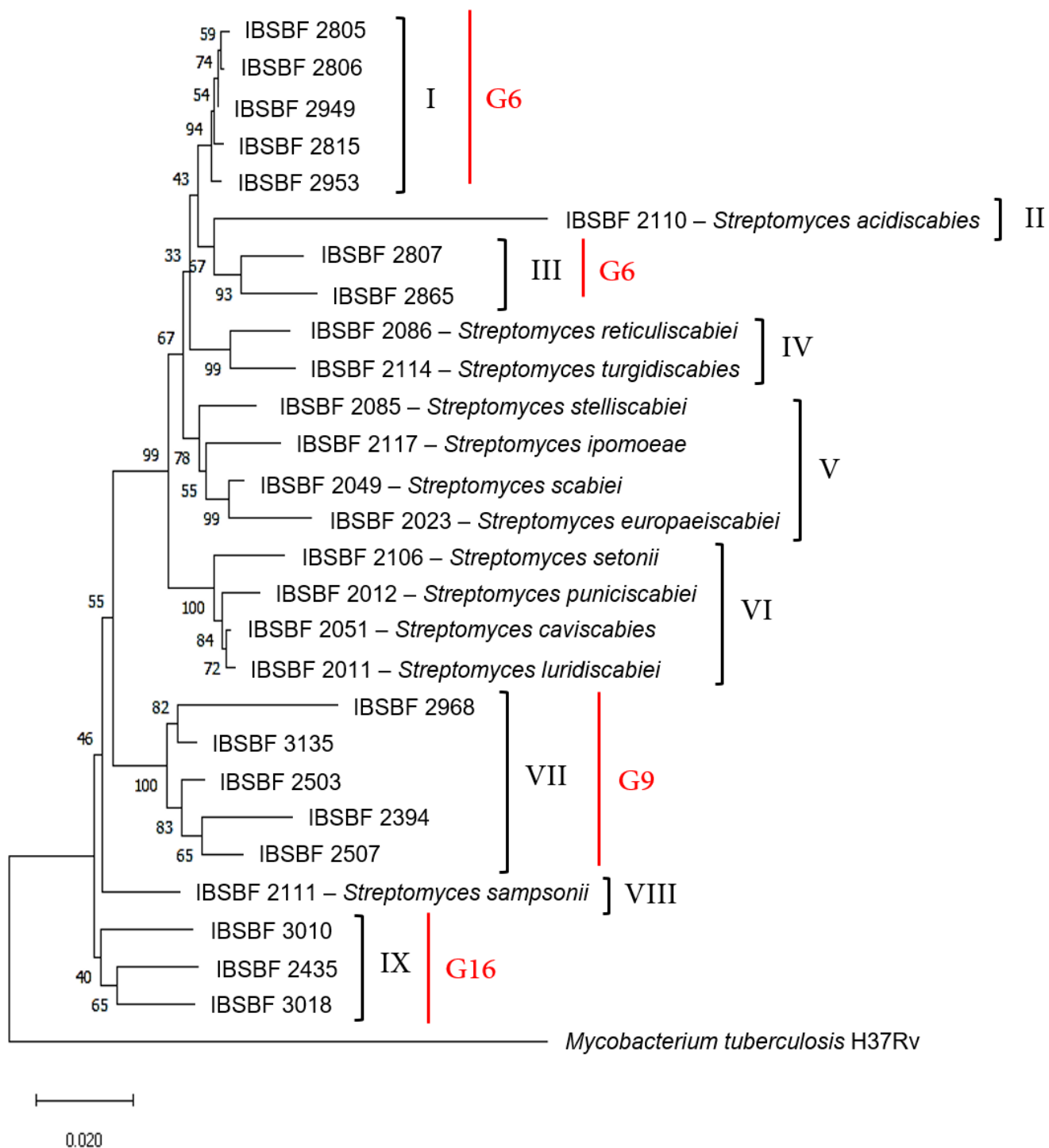


FIGURA 28. Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene 16S RNA ribossomal de *Streptomyces* spp., utilizando-se o método Neighbor-joining. A sequência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base nas análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 2% de diferença nas sequências.

5.5.2.2. Análise de MLSA dos genes *atpD*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* e *trpB*

A filogenia baseada nas análises de multilocus é considerada uma das mais eficientes ferramentas moleculares devido ao seu alto poder de resolução para as definições das relações intra e interespecíficas (GUO et al., 2008).

A árvore filogenética construída a partir de sequências concatenadas dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* permitiu separar as linhagens nacionais pertencentes aos grupos genéticos (G6, G9 e G16) das linhagens Tipo fitopatogênicas de *Streptomyces* (Figura 29). Nessa análise, verificou-se a ocorrência de dez diferentes grupos. O grupo I ficou representado pelas linhagens do G6, sendo que foi possível observar uma subdivisão do grupo com as linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2865. Diferentemente do observado nas análises do gene 16S RNAr, a linhagem Tipo de *S. acidiscabies* IBSBF 2110^T ficou separada do G6, formando um grupo distinto (II) fortemente sustentado com 100% das repetições de *bootstrap* (Figura 29). A matriz de similaridade demonstrou que as linhagens do G6 apresentaram porcentagens aproximadas dos 90% em comparação com *S. acidiscabies*, porcentagem considerada baixa para determinação de uma mesma espécie. Esses dados corroboram de que as linhagens do G6 podem representar novas espécies de *Streptomyces*, diferentes de *S. acidiscabies* (Tabela Compl. 2). As linhagens do G9 formaram o grupo VI enquanto que as do G16 compuseram o grupo X, porém, como observado no G6, subdivisões também foram notadas dentro desses dois grupos genéticos. A árvore filogenética construída foi considerada robusta visto que, linhagens consideradas genomoespécies na literatura como *S. scabiei* (IBSBF 2049^T) e *S. stelliscabei* (IBSBF 2085^T) (grupo IV); *S. turgidicabies* (IBSBF 2114^T) e *S. reticuliscabies* (IBSBF 2086^T) (grupo III); e *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T) e *S. setonii* (IBSBF 2106^T) (grupo VIII) apresentaram altas porcentagens de similaridade (acima de 95%) e ficaram alocadas em um mesmo braço (Figura 29, Tabela Compl. 2).

Discutido por Rong & Huang (2012), as análises de genes concatenados utilizando a técnica de multilocus considera a razão 0,007 como limite mínimo para a consideração de uma mesma espécie. Visto assim, todas as linhagens do estudo avaliadas mostraram dados acima desse (Tabela Compl. 2), e por isso, mais uma vez, os resultados confirmaram a existência de novas espécies ocorrendo no Brasil.

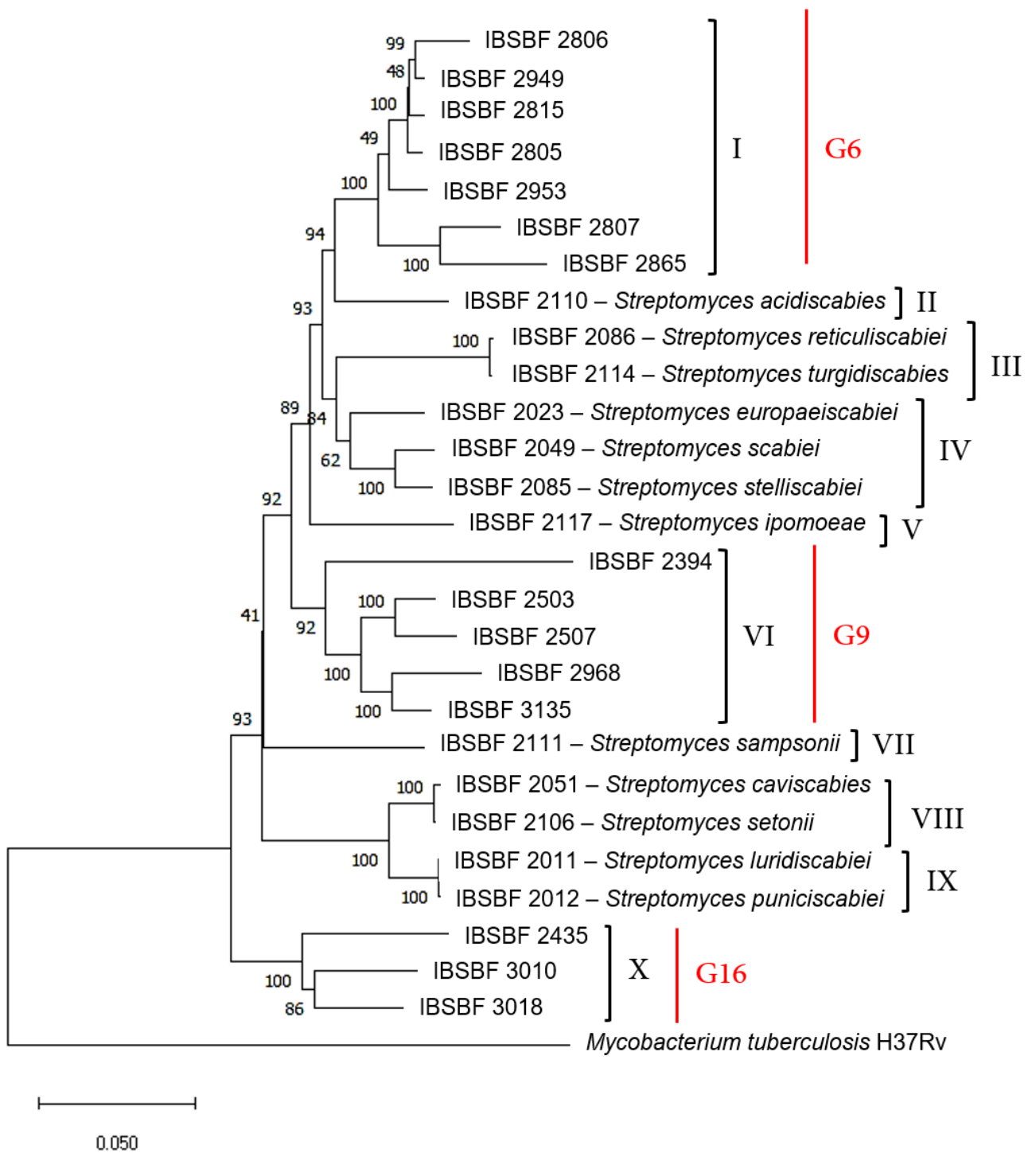


FIGURA 29. Árvore filogenética construída a partir do concatenamento das seqüências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* de *Streptomyces* spp., utilizando-se o método Neighbor-joining. A seqüência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base nas análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 5% de diferença nas seqüências.

5.5.2.3. Análise de MLSA dos genes 16S RNAr, *atpD*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* e *trpB*

A análise de MLSA também foi realizada com a adição das sequências do gene 16S RNAr às sequências dos genes *housekeeping* (*atpD*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* e *trpB*). A topologia da árvore filogenética gerada foi muito similar à exibida com os cinco genes *housekeeping*. As altas porcentagens de similaridade dos braços e clados demonstraram a robustez dessa análise (Figura 30).

Os percentuais observados na matriz de similaridade foram bem próximos da avaliação multilocus com cinco genes. Os maiores valores foram verificados entre as linhagens Tipo: 99,4% de *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T) com *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T); 99,2% entre *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) e *S. turgidiscabiei* (IBSBF 2114^T); e 99,1% entre *S. cavicabies* (IBSBF 2051^T) e *S. setonii* (IBSBF 2106^T) (Tabela Compl. 3).

Para as linhagens dos grupos genéticos G6, G9 e G16, a maior porcentagem de similaridade ficou entre o isolado IBSBF 2949 e *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), com um valor de 94,6%, valor considerado abaixo para se considerar de mesma espécie. Novamente, os dados indicaram a ocorrência de novas espécies (Tabela Compl. 3).

Nas avaliações entre os grupos genéticos, verificou-se que as porcentagens de similaridade entre as linhagens do G6 variaram de 92,6% a 99%, enquanto que, quando comparadas com os outros grupos genéticos (G9 e G16), as porcentagens exibidas foram de 84,6% a 92,5%. No G9 as porcentagens observadas entre as cinco linhagens ficaram entre 88,8% e 96,7%; enquanto que valores de 84,6% a 92,4% foram verificados na comparação dessas linhagens com os outros grupos genéticos (G6 e G16). Por último, os valores de similaridade entre as três linhagens do G16 variaram de 88,5 % a 93%. Já em comparação com as demais linhagens do G6 e G9 as porcentagens foram abaixo de 90% (Tabela Compl. 3).

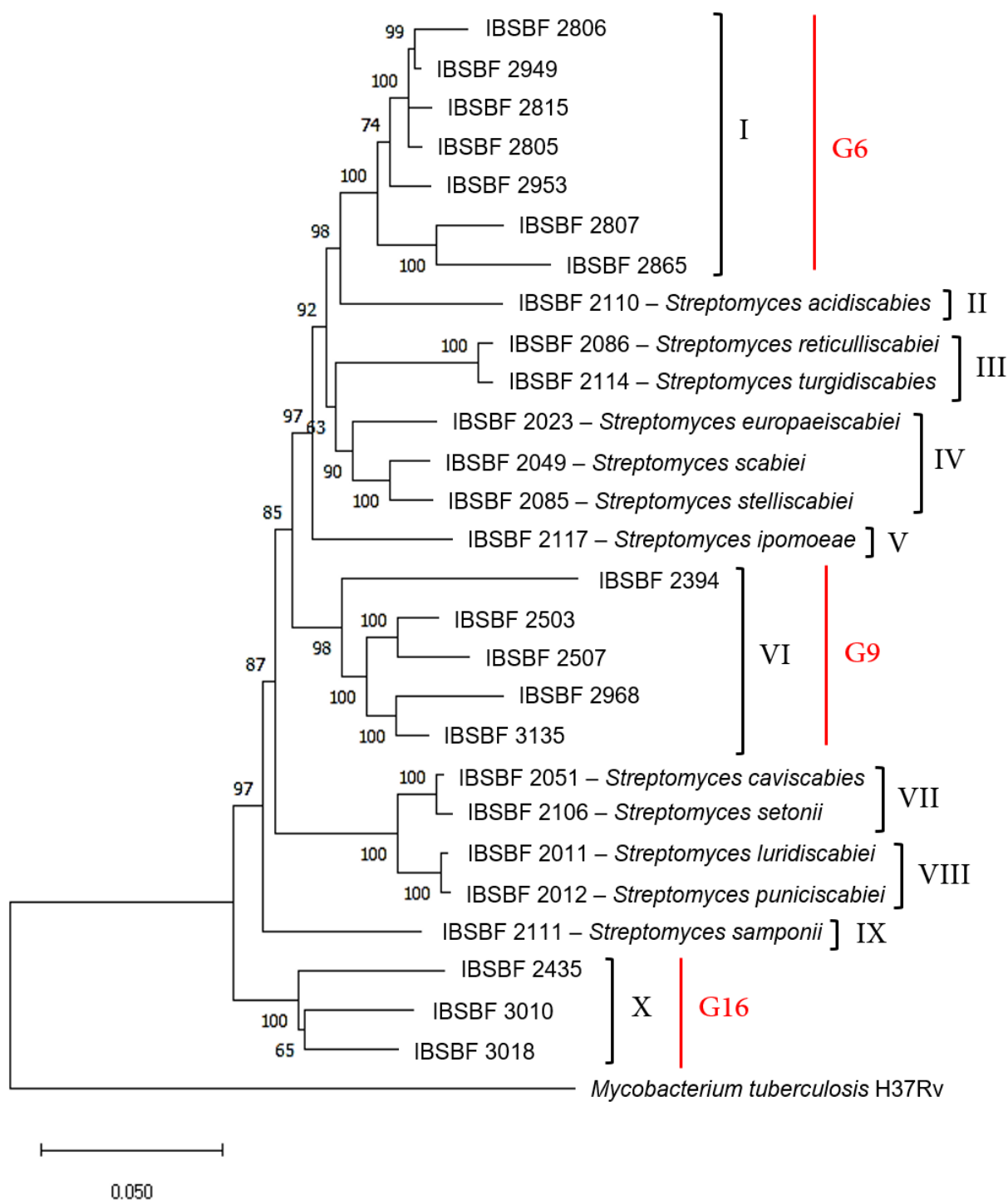


FIGURA 30. Árvore filogenética construída a partir do concatenamento das sequências dos genes 16S RNAr, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* de *Streptomyces* spp., utilizando-se o método Neighbor-joining. A sequência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base nas análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 5% de diferença nas sequências.

5.6. Análise genômica

As análises de sequências gênicas, atualmente, são utilizadas como os principais parâmetros taxonômicos para a identificação de espécies, pois, todo o material genético do organismo é analisado, deixando de forma mais robusta as avaliações comprobatórias dos experimentos filogenéticos (LIU et al., 2021). É apontado por Kim e colaboradores (2014), que as avaliações genômicas enriquecem as avaliações filogenéticas do gene 16S rRNA e multilocus dos genes *housekeeping*, assim, favorecendo e elucidando os processos taxonômicos de espécies do gênero *Streptomyces*, ressaltando-se que todas análises foram feitas neste estudo.

O aumento da capacidade computacional favoreceu os estudos de genômica comparativa, aumentando o número de sequências, bem como o desenvolvimento de metodologias analíticas fazendo com que as análises comparativas se tornem mais acessíveis à comunidade científica (VAN TONDER et al., 2014). Atualmente, a comparação de genomas inteiros representa uma conduta primordial na classificação de espécies bacterianas (COLSTON et al., 2014; BEAZ-HIDALGO et al., 2015).

Para este estudo duas linhagens do G6 foram genomicamente sequenciadas, sendo elas: IBSBF 2807 e IBSBF 2953.

5.6.1. Análises de identidade média de nucleotídeo (ANI) e hibridização *insilico* DNA-DNA (*isDDH*)

Na tentativa de melhorar e resolver a identificação de espécies bacterianas, foram desenvolvidas ferramentas para análise de similaridade entre genomas. A hibridização DNA-DNA (DDH) foi amplamente utilizada na determinação de espécies e por muito tempo foi o único método capaz de mensurar o grau de similaridade entre genomas (RICHTER & ROSSELLÓ-MÓRA, 2009). Posteriormente, o *isDDH* foi criado como uma ferramenta *in silico* para atender as necessidades advindas dos avanços no sequenciamento de genomas. Nessa análise, o genoma em estudo é comparado virtualmente com um ou mais genomas de referências, e a distância intergenômica é calculada pela soma de todas as identidades encontradas nos segmentos de alta pontuação (HSPs) dividida pelo comprimento global de HSPs. Dessa maneira, os dados são convertidos em valores de similaridade análogas, computando em porcentagem o parentesco das novas estirpes com estirpes já conhecidas (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013; AUCH et al., 2010a, 2010b).

A abordagem da identidade nucleotídica média, do inglês *Average Nucleotide*

Identity (ANI) é semelhante à do *isDDH*, porém essa metodologia estima a identidade de nucleotídeos médios entre dois genomas. O genoma em estudo é fragmentado *in silico* em segmentos aos quais são alinhados utilizando algoritmos aonde confrontando-se com genomas de referência estimam a porcentagem de identidade média de nucleotídeos (GORIS et al., 2007).

A *isDDH* e a análise ANI foram usadas para esclarecer a relação entre as linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953 com outras dezesseis espécies Tipo do gênero *Streptomyces*, visando a diferencia-las a nível e espécie para a definitiva caracterização de novas espécies.

Os níveis de relação DNA-DNA entre as linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953 foi de 44,9%, esta é a maior porcentagem analisada entre todas as avaliações comparativas dessa metodologia, este valor, e todos os outros correlacionados as duas linhagens do estudo aferidos com as linhagens Tipo estão abaixo do valor limite de 70% recomendado por Wayne e colaboradores (1987) para atribuir cepas bacterianas à mesma espécie genômica (Figura 31).

Da mesma forma, o valor de ANI entre o IBSBF 2807 e o IBSBF 2953 foi o mais alto novamente em comparação com as cepas Tipo, com 92,11%, um resultado abaixo do ponto de corte usado para delinear as espécies procariontas que é de 95% (JAIN et al., 2018).

	<i>Streptomyces</i> sp. IBSBF 2807	<i>Streptomyces</i> sp. IBSBF 2953	<i>Streptomyces brasiliensis</i> (IBSBF 2867)	<i>Streptomyces scabiei</i> (87.22)	<i>Streptomyces acidiscabiei</i> (84-104)	<i>Streptomyces europaeiscabiei</i> (NRRL B-24443)	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> (Car8)	<i>Streptomyces reticuliscabiei</i> (NRRL B-24446)	<i>Streptomyces coelicolor</i> (A3(2))	<i>Streptomyces sviveus</i> (ATCC 29083)	<i>Streptomyces bottropensis</i> (ATCC 25435)	<i>Streptomyces diastatochomogenes</i> (ATCC 12309)	<i>Streptomyces griseus</i> (DSM 40236)	<i>Streptomyces ipomoeae</i> (B12321)	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> (NRRL B-24455)	<i>Streptomyces niveiscabie</i> (NRRL B-24457)	<i>Streptomyces puniscabiei</i> (DSM 41929)	<i>Streptomyces sampsonii</i> (KJ40)
<i>Streptomyces</i> sp. IBSBF 2807	44.9	25.4	25.1	24.6	25.2	25.0	25.2	25.7	27.0	24.9	25.7	22.3	25.2	22.7	25.6	26.0	22.0	
<i>Streptomyces</i> sp. IBSBF 2953	92.11	26.0	25.2	24.8	25.3	26.2	25.5	25.8	27.3	25.1	25.9	22.2	25.4	22.6	25.5	26.1	22.5	
<i>Streptomyces brasiliensis</i> (IBSBF 2867)	83.34	83.42	36.4	23.6	38.9	25.6	25.3	25	25.7	37.1	25.8	22.5	31.0	22.7	24.5	24.6	22.6	
<i>Streptomyces scabiei</i> (87.22)	83.46	83.45	79.74	23.7	39.4	25.4	25.1	24.9	25.8	43.1	25.9	22.6	30.2	22.7	24.7	24.7	22.9	
<i>Streptomyces acidiscabiei</i> (84-104)	82.94	83.07	79.74	79.74	23.8	23.4	23.6	23.7	24.2	23.7	23.9	21.9	23.9	22.0	22.8	23.8	51.0	
<i>Streptomyces europaeiscabiei</i> (NRRL B-24443)	83.4	83.45	89.51	89.74	79.66	25.9	25.4	25.1	26.3	42.3	22.3	22.7	22.6	22.9	32.1	25.2	24.6	
<i>Streptomyces turgidiscabies</i> (Car8)	83.14	84.46	84.22	84.13	79.49	84.28	99.1	24.4	25.6	24.9	26.0	23.0	22.1	25.0	22.1	24.5	24.0	
<i>Streptomyces reticuliscabiei</i> (NRRL B-24446)	83.24	83.37	83.6	83.36	79.58	83.52	99.96	24.7	25.8	25.1	26.2	22.4	22.8	22.2	24.1	25.3	24.9	
<i>Streptomyces coelicolor</i> (A3(2))	83.82	83.75	83.26	83.33	79.95	83.3	82.82	82.89	26.1	25.4	25.0	25.2	22.5	24.3	22.4	24.6	25.9	
<i>Streptomyces sviveus</i> (ATCC 29083)	84.37	84.43	83.73	83.66	82.6	83.93	83.55	83.63	83.73	25.7	22.4	20.9	26.1	26.2	22.4	24.9	26.3	
<i>Streptomyces bottropensis</i> (ATCC 25435)	81.18	81.15	88.79	91.04	79.62	90.66	81.33	81.46	81.17	81.86	26.0	22.6	26.3	30.9	24.4	22.7	24.7	
<i>Streptomyces diastatochomogenes</i> (ATCC 12309)	81.45	81.61	81.65	81.62	70.5	81.85	81.96	82.12	81.33	82.04	81.78	23.1	26.5	20.5	23.3	25.8	24.5	
<i>Streptomyces griseus</i> (DSM 40236)	78.29	78.48	78.26	78.09	77.37	78.23	77.64	77.66	78.57	78.29	78.12	78.57	22.6	26.2	34.2	22.5	22.4	
<i>Streptomyces ipomoeae</i> (B12321)	81.14	81.27	85.83	85.3	79.53	86.32	81.30	81.32	80.9	81.87	85.76	81.93	77.98	22.7	24.6	25.5	22.9	
<i>Streptomyces luridiscabiei</i> (NRRL B-24455)	78.33	78.41	78.26	78.17	77.4	78.04	71.94	77.77	78.67	78.34	78.2	78.69	87.56	77.98	25.2	22.6	22.6	
<i>Streptomyces niveiscabie</i> (NRRL B-24457)	81.43	81.54	80.36	80.39	93.14	80.19	80.11	80.06	80.25	81.3	80.07	79.98	78.02	80.13	77.78	22.8	24.7	
<i>Streptomyces puniscabiei</i> (DSM 41929)	82.22	82.22	81.07	80.94	80.21	80.86	81.01	81.23	82.09	82.75	81.0	81.56	78.44	81.17	78.37	80.94	23.5	
<i>Streptomyces sampsonii</i> (KJ40)	79.80	81.8	78.65	77.56	78.44	78.00	76.91	80.27	81.29	80.82	79.44	80.54	81.27	78.22	80.32	78.13	81.56	

ANI > 95%	
DDH > 70%	

FIGURA 31. Valores percentuais de identidade média de nucleotídeos (ANI) e hibridização *in silico* DNA-DNA (*is*DDH) das linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953 junto a espécies tipo de *Streptomyces*. O quadrante inferior exibe os valores ANI e o quadrante superior exibem os valores *is*DDH. Os valores que atendem à recomendação $\geq 95\%$ ANI são coloridos em amarelo e os valores de referência de *is*DDH acima de $\geq 70\%$ em vermelho.

5.7. Boletim Técnico

O boletim técnico está em etapa de finalização e tem como título provisório como: “Sarna da Batata: Identificação das espécies causadoras” (Figura 32). Esta publicação levantará as últimas revisões e atualizações sobre a temática da sarna da batata, tendo como um dos enfoques principais os processos de identificação das espécies fitopatogênicas do gênero *Streptomyces* desde a triagem inicial dos tubérculos com os sintomas característicos até as novas metodologias de biologia molecular. Assim como, estará disponível as discussões levantadas por outras teses e dissertações apresentadas por alunos de anos anteriores do Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LBV)/CAPSA/Instituto Biológico, Campinas, SP.

Este boletim técnico estará disponível nas plataformas digitais do Instituto Biológico.



FIGURA 32: Capa provisória para o boletim técnico proposto nessa dissertação

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sarna da batata é uma doença bacteriana que vem ocorrendo frequentemente nas principais regiões produtoras do Brasil e tem se tornado motivo de grande preocupação entre os envolvidos na cadeia produtiva. O primeiro desafio encontrado nesse cenário está relacionado com a identificação das espécies de *Streptomyces* que estão associadas à doença em nosso país, direcionando assim estratégias de manejo bem-sucedidas.

A identificação de novas espécies fitopatogênicas desse gênero exige uma abordagem polifásica, onde metodologias de caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica, patogênica e molecular são necessárias para tornar a descrição robusta. Nesse sentido, a caracterização morfológica foi importante para demonstrar a grande diversidade de coloração de esporos e de colônias das espécies que esse gênero abriga. Embora as características bioquímicas e fisiológicas também sejam exigidas para descrição de nova espécie, ficou claro que a diversidade de metabólitos produzidos por esses microrganismos interfere diretamente nesses critérios tornando-os insuficientes para conclusão de identificação em nível de espécie.

Atualmente o gênero *Streptomyces*, aloca mais de 900 espécies e dentre elas há elevado número de espécies habitantes do solo. Entretanto, apenas 16 delas são consideradas fitopatogênicas, o que torna imprescindível a realização de testes de patogenicidade em planta hospedeira. Dessa forma, esses testes não podem ser excluídos no processo de identificação.

Nas últimas décadas as ferramentas de biologia molecular têm exibido papel de destaque no processo de descrição de novas espécies. Embora o sequenciamento do gene 16S RNAr continue sendo o “gold standard” para a identificação de bactérias, testes moleculares adicionais são necessários para a finalização desse processo. Assim, as análises de PCR-RFLP do gene *atpD* e multilocus se mostraram ferramentas importantes para a diferenciação das 15 linhagens envolvidas nesse estudo. Os resultados obtidos com essas duas técnicas foram fortemente corroborados com as análises de sequenciamento genômico indicando o alto poder de resolução dessas abordagens na investigação de novas espécies do gênero *Streptomyces*.

O estudo polifásico realizado no presente trabalho deixou claro a ocorrência de nove novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata ainda não descritas na literatura. Dentre elas, duas linhagens foram completamente caracterizadas e denominadas

Streptomyces hilaironis (IBSBF 2807^T) e *Streptomyces hayashii* (IBSBF 2953^T) levando em consideração homenagens aos especialistas em batata, Dr. Hilario da Silva Miranda, Pesquisador Científico do Centro de Horticultura (Seção Raízes e Tubérculos) do Instituto Agrônomo e ao Engenheiro Agrônomo Pedro Cândido Rytsi Hayashi, fundador da empresa Soleil Papa, respectivamente. As outras sete linhagens restantes estão sendo analisadas em nível de genoma para complementar o processo de descrição dessas novas espécies.

O presente trabalho reuniu as principais técnicas a serem empregadas em taxonomia polifásica, representando um guia para futuros estudos de descrição de novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata no mundo.

7. CONCLUSÕES

- A proposta da caracterização polifásica foi capaz de diferenciar as 15 linhagens desse estudo com as 12 espécies Tipo de *Streptomyces* relatadas na literatura associadas a sarna da batata;
- Após as avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas mostraram uma grande heterogeneidade das linhagens dos Grupos Genéticos G6, G9 e G16, sendo etapas necessárias para a descrição;
- As avaliações patogênicas comprovaram o caráter patogênico de todas as linhagens desse estudo;
- As análises de PCR-RFLP do gene *atpD*, conseguiu separar linhagens as linhagens Tipo de *Streptomyces* comparadas com as linhagens 15 nacionais;
- As análises filogenéticas do gene 16S RNAr e as de multilocus distinguiram as linhagens desse estudo em ramos distintos das espécies Tipo de *Streptomyces*, evidenciando tratar-se de novas espécies para o gênero;
- Ao todo o presente trabalho propõe a classificação de nove novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata que foram isoladas de lesões de tubérculos nacionais;
- O sequenciamento genômico das linhagens IBSBF 2807 e IBSBF 2953 provou a distinção das demais espécies já publicadas, fazendo com que, propuséssemos como: *Streptomyces hilarionis* (IBSBF 2807^T) e *Streptomyces hayashii* (IBSBF 2953^T).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, T. M., KHALIL, M. S., MOUSSA, T. A., & AL-QAYSI, S. A. D. A.. Identification and characterization of *Streptomyces alkaliscabies* sp. nov. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v.10, p.476-483. 2012
- ACUÑA, I. A.; STROBEL, G. A.; JACOBSEN, B. J.; CORSINI, D. L. Glucosylation as a mechanism of resistance to thaxtomin A in potatoes. *Plant Science*, v. 161, n. 1, p. 77– 88, 2001.
- AGRIANUAL 2018. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2018.
- AGRIOS, G. N. Plant pathology, 5th ed. *Academic Press, San Diego*, 2005.
- AHMAD, I.; SOOMRO, M.; KHALID, S.; IFTIKHAR, S.; MUNIR, A.; BURNEY, K. Recent distributional trends of potato diseases in Pakistan. *Pakistan Agricultural Research Council*, v.9, p. 24-26, 2020.
- AL-MUGHRABI, K. I., VIKRAM, A., POIRIER, R., JAYASURIYA, K., & MOREAU, G. Management of common scab of potato in the field using biopesticides, fungicides, soil additives, or soil fumigants. *Biocontrol Science and Technology*, v. 26, p. 125-135, 2016.
- ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 797-814, 2001.
- ANDREATTE, A. Variedade Caesar: Boa para o consumidor, muito boa para o produtor, ótima para a bataticultura brasileira! *Batata Show*, ano 2, n. 4, p. 15- 16, mai. 2007.
- AUCH, A. F., KLENK, H. P., & GÖKER, M. Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segmentpairs. *Standards in genomic sciences*, 2(1), 142-148. 2010a.

- AUCH, A. F., VON JAN, M., KLENK, H. P., & GÖKER, M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in genomic sciences*, 2(1), 117-134. 2010b.
- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477, 2012.
- BEAUSÉJOUR, J.; CLERMONT, N.; BEAULIEU, C. Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant and Soil*, v. 256, n. 2, p. 463–468, 2003.
- BEAZ-HIDALGO, R., HOSSAIN, M. J., LILES, M. R., & FIGUERAS, M. J. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. *PloS one*, 10(1), e0115813. 2015
- BENCHEIKH, M.; SETTI, B. Characterization of *Streptomyces scabies* isolated from common scab lesions on potato tubers by morphological, biochemical and pathogenicity tests in Chlef region in western Algeria. *Sci. Technol. C Biotechnol.* v. 26, p. 61–67, 2007.
- BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas / Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. *Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente*, 341pags, 2009.
- BIGNELL DRD, FYANS JK, CHENG Z. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *J Appl Microbiol*; v. 116, p. 223–235, 2014.
- BIKANDI J, SAN MILLÁN R, REMENTERIA A, GARAIZAR J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*. 20 (5): 798-9, 2004.

- BOETZER, M., & PIROVANO, W. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome biology*, 13(6), 1-9, 2012.
- BONDE, M.R., MCINTYRE, G.A. Isolation and biology of a *Streptomyces* sp. causing potato scab in soils below pH 5.0. *American Potato Journal*, v. 45, p. 273–278 1968.
- BOUCHEK-MECHICHE, K., GARDAN, L., ANDRIVON, D., & NORMAND, P. *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces reticuliscabiei*: one genomic species, two pathogenic groups. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56(12), p. 2771-2776, 2006.
- BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; NORMAND, P.; JOUAN, B. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 91-99, 2000.
- BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; NORMAND, P.; JOUAN, B. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 91-99, 2000.
- BRAUN, S., GEVENS, A., CHARKOWSKI, A., ALLEN, C., & JANSKY, S. Potato common scab: A review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. *American Journal of Potato Research*, v. 94(4), p. 283-296, 2017.
- BUKHALID, R. A., & LORIA, R. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7776-7783. 1997

- BUKHALID, R. A.; CHUNG, S. Y.; LORIA, R. nec1, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, p. 960-967, 1998.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos, *Agronômica Ceres*, p. 729- 760, 1995.
- CHATER KF. Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000*, v. 5 , p. 1-16, 2016.
- CHATER, K. F.; BIRÓ, S.; LEE, K. J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 34, p. 171–198, 2010.
- CHUN, J. Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. *Ph. D. Thesis – Department of Microbiology, The Medical School, Newcastle, England*, 143pags, 1995.
- CLARK, C. R., KRAMER, C. G., KOTHA, R. R., WANNER, L. A., LUTHRIA, D. L., & KRAMER, M. Cultivar resistance to common scab disease of potato is dependent on the pathogen species. *Phytopathology*, v. 109, p.1544-1554, 2019.
- CLARK, C. R., TEGG, R. S., THOMPSON, H. K., FREDERICK, C., HAYNES, K. G., KRAMER, M., & WILSON, C. R. Low-dose foliar treatments of the auxin analog 2, 4-D reduce potato common scab and powdery scab for multiple potato cultivars and enhance root development. *Crop Protection*, 2020.
- COLSTON, S. M., FULLMER, M. S., BEKA, L., LAMY, B., GOGARTEN, J. P., & GRAF, J. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio*, 5(6), 2014.

- COMPARONI, R. Caracterização da diversidade genética de linhagens de *Streptomyces scabiei* e avaliação do potencial antagônico de micro-organismos no controle da sarna da batata. *Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio)*. Instituto Biológico, São Paulo, 65pags, 2015.
- CORRÊA, D. B. A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil.. *Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 169pags 2011.. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000788896>.
- CORRÊA, D. B. A., SALOMÃO, D., RODRIGUES-NETO, J., HARAKAVA, R., & DESTÉFANO, S. A. L. Application of PCR-RFLP technique to species identification and phylogenetic analysis of *Streptomyces* associated with potato scab in Brazil based on partial atpD gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, v.142, p. 1-12. 2015.
- CORRÊA, D. Caracterização de novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata no Brasil. 2015. *Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 176pags, 2015. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317294/1/Correa_DanieleBussioliAlves_D.pdf
- CULLEN, D.W; LEES, A.K. Detection of the nec1 virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. *J Appl Microbiol*, v. 102, p.1082-1094, 2007.
- D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M.A.B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*, p-299-316, 2009.
- DEES, M. W.; SLETTEN, A.; HERMANSEN, A. Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology*,

v. 62, p. 217-225, 2013.

DEES, M.W.; WANNER, L.A. In search of better management of potato common scab. *Potato Res.* 55, 249–268. 2012.

DIPPENAAR, B. J. Environmental and control studies of the common scab disease of potatoes caused by *Actinomyces scabies* (Thaxt.) Guss. *Union of South Africa, Department of Agriculture Science Bulletin.* v.136, p.1-78, 1933.

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

FAO, FAOSTAT database, 2018. Disponivel em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed March 2020.

FAUCHER, E.; OTRYSCO, B.; PARADIS, E.; HODGE, N. C.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Quebec. *Plant Disease*, v. 77, p. 1217-1220, 1993.

FAUCHER, E.; PARADIS, E.; GOYER, C.; HODGE, N. C.; HOGUE, R.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing deep-pitted scab of potato in Québec, Canada. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, p. 222-225, 1995.

FAUCHER, E.; SAVARD, T.; BEAULIEU, C. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 14, 197–202, 1992.

FIERS, M.; EDEL-HERMANN, V.; CHATOT, C.; HINGRAT, Y. L.; LABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. Potato soil-borne diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 32, p. 93-132, 2012.

- FISCHER, I. H.; TEIXEIRA, A. P. M.; TOFFANO, L.; GARCIA, E. O. Reação de cultivares de batata a *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum profunda. *Summa Phytopathologica*, v. 35, n. 3, p. 219-222, 2009.
- FLINN, B.; ROTHWELL, C.; GRIFFITHS, R.; LAGUE, M.; DEKOEYER, D.; SARDANA, R.; AUDY, P.; GOYER, C.; LI, XQ.; WANG-PRUSKI, G.; REGAN, S. Potato expressed sequence tag generation and analysis using standard and unique cDNA libraries. *Plant Molecular Biology*, v. 59, n. 3, p. 407–433, 2005.
- FLORES-GONZÁLEZ, R.; VELASCO, I.; MONTES, F. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant Pathology*, v. 57, p. 162-169, 2008.
- GARCIA, E. O. Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. *Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba*. 2008. 92p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-21082008-153819/pt-br.php>
- GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN de PEER, Y; V.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005
- GONG, C., YANG, M. P., YU, D. C., DU, W. F., SONG, S. W., WANG, R. X., JIANG, S. Y. First report of *Streptomyces caviscabies* causing common scab on potato in China. *Plant Disease*, v. 101, p. 1316-1316, 2017.
- GORIS, J., KONSTANTINIDIS, K. T., KLAPPENBACH, J. A., COENYE, T., VANDAMME, P., & TIEDJE, J. M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91. 2007

- GOTO, K. The relationship between common scab severity and reducing sugar contents in the peel of potato tubers. *Potato Research*, v. 24, p. 171–176, 1981.
- GOUWS, R. Etiology and integrated control of common scab on seed potatoes in South Africa. *MSc Thesis, Univ. Pretoria, África do Sul*, 118pages, 2006.
- GOYER, C.; BEAULIEU, C. Host range of streptomycete strains causing common scab. *Plant Disease*, v. 81, p. 901-904, 1997.
- GOYER, C.; FAUCHER, E.; BEAULIEU, C. Streptomyces caviscabies sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 46, p. 635-639, 1996.
- GUO, Y.; ZHENG, W.; RONG, X.; HUANG, Y. A multilocus phylogeny of the Streptomyces griseus 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 149-159, 2008.
- HAIN, T.; WARD-RAINEY, N.; KROPPESTEDT, R. M.; STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A. Discrimination of Streptomyces albidoflavus strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, p. 202-206, 1997.
- HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98, 1999.
- HARRISON, M. D. Potato russet scab, its cause and factors affecting its development. *American Potato Journal*, v. 39, p. 368-387, 1962.
- HAYNES, K.G., WANNER, L.A., THILL, C.A. Common Scab Trials of Potato Varieties and Advanced Selections at Three U.S. Locations. *Am. J. Pot Res*, v. 87, p. 261–276, 2010.

- HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIGA, E. A.; DIAZ-MINGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and environmental microbiology*, 2000.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n.8, p. 3233-3241, 1997.
- HILTUNEN, L. H.; OJANPERÄ, T.; KORTEMAA, H.; RICHTER, E.; LEHTONEN, M. J.; VALKONEN, J. P. T. Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 199– 212, 2009.
- HILTUNEN, L.H.; VALKONEN, J. P. T. Alternative methods for control of potato common scab. *MTT Agrifood Research Finland. PTDW Hamar Norway* p.16-18, 2011.
- HOOKER, W. J. Parasitic action of *Streptomyces scabies* on roots of seedlings. *Phytopathology*, 39, 442-462. 1949.
- HORINOUCHI, S. A microbial hormone, a-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, p. 2045-2057, 2002.
- HOSNY, M.; ABO-ELYOUSR, K. A. M.; ASRAN, M. R.; SAEAD, F. A. Chemical control of potato common scab disease under field conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2014.
[http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317294/1/Correa_DanieleBussio- Alves_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317294/1/Correa_DanieleBussio_liAlves_D.pdf)
- HUGUET-TAPIA, J. C., BIGNELL, D. R., & LORIA, R. Characterization of the integration and modular excision of the integrative conjugative element PAISt in

- Streptomyces turgidiscabies Car8. *PloS one*, v. 9, p. 1-12, 2014.
- HUNJAN, M. S.; SABHIKHI, H. S. Designing a crop rotation strategy to manage *Streptomyces scabies* causing potato scab in north India. *Journal of Phytopathology*, v. 168, p. 469-477, 2020.
- IMARK, M. Produção de Batata na Região de São Mateus do Sul. Batata Show, ano 7, n. 17, p. 10, abr. 2007.
- JADOSKI, S. M.; MAGGI, A. S. L.; BRUNETTA, L.; WAZNE, R. Sucessão de culturas na fitossanidade e produtividade da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.). *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, v. 2, n. 1, p. 161-166, 2009.
- JAIN, C., RODRIGUEZ-R, L. M., PHILLIPPY, A. M., KONSTANTINIDIS, K. T., & ALURU, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications*, 9(1), 1-8. 2018.
- JANSKY, S., DOUCHES, D., & HAYNES, K. Germplasm release: three tetraploid potato clones with resistance to common scab. *American Journal of Potato Research*, v.95, p. 178– 182, 2017.
- JOHANSEN, T. J., DEES, M. W., & HERMANSEN, A. High soil moisture reduces common scab caused by *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces europaeiscabiei* in potato. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, v. 65, p.193-198, 2015.
- JOSHI, B. B.; BHATT, R. P.; BAHUKHANDI, D. Antagonistic and plant growth activity of Thichoderma isolates of Western Himalayas. *Journal of environmental biology*, 2010.
- KALANTAR ZADEH, M.; SHAHIDI BONJAR, G.; RASHID FARROKHI, P.; GHASEMI, A.; AGHIGHI, S.; MAHDAVI, M. Antagonistic potential of two native *Streptomyces* strains in biocontrol of the major causals of common scab of potato in Iran. *Asian J. Plant Sci*, v. 5, p. 5–8, 2006.

- KAUR, A. S., SINGH, N., RAINA, S., & SINGH, D. Biological approach for management of *Streptomyces setonii* causing common scab of potato. *Agricultural Research Journal*, v. 55, p. 104-112, 2018.
- KHATRI; B.B., R.S. TEGG; P.H BROWN; C.R. WILSON. Temporal association of potato tuber development with susceptibility to common scab and *Streptomyces scabiei*-induced responses in the potato periderm. *Plant Pathology* v.60, p.1-11, 2011.
- KIM, J.S., PARK, D.H., LIM, C.K, CHOI, Y.C., HANHM, H.I. & CHO, W.D. Potato common scab by *Streptomyces turgidiscabies*. *Korean Journal of Plant Pathology* 14:551-554. 1998.
- KIM, M.; OH, H.-S.; PARK, S.-C.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 346-351, 2015.
- KING RR, LAWRENCE CH, CALHOUN LA, RISTAINO JB. 1994. Isolation and characterization of thaxtomin type phytotoxins associated with *Streptomyces ipomoeae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p.1791-1794, 1994.
- KING RR, LAWRENCE CH, CALHOUN LA. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.40, p.834-837, 1992.
- KING, R.R; LAWRENCE C.H.; CALHOUN L.A, Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies* the causal organism of potato common scab. *J. Agric. Food Chem*, v.40, p.834–837, 1992.
- KING, R.R; LAWRENCE C.H.; CALHOUN L.A; RISTAINO, J.B. Isolation and Characterization of Thaxtomin-Type Phytotoxins Associated with *Streptomyces ipomoeae*. *J. Agric. Food Chem*. V.42, p. 1791–1794, 1994.

- KITAJIMA, E. W. ; LEITE, B. . Microscopia eletrônica de varredura de pressão variável (MEVpv). 1999. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).
- KONEMAN E. W., ALLEN S. D., JANDA W. M., SCHRECKENBERGER P. C. AND WINN W. C. JR., Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed., *Lippincott- Raven Publishers*, Philadelphia. 1643pags, 1997.
- KRAINSKY, A. Die Aktinomycten und ihren Bedeutung in der Natur. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II*, v. 41, p. 649-688, 1914 (in German).
- KREUZE, J. F.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; VALKONEN, J. P. T. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology*, v. 89, p. 462-469, 1999.
- KRITZMAN, G., SHANI-KAHANI, A., KIRSHNER, B., RIVEN, Y., BAR, Z., KATAN, J. & GRINSTEIN, A. Potato wart disease of peanut. *Phytoparasitica*, v. 24, p. 293-304, 1996.
- KUMAR, R.R. & JADEJA, V.J. Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* v. 5, p. 606–618, 2016.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35(6):1547-1549, 2018.
- LABEDA, D. P. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p.2525–2531, 2011.
- LABEDA, D. P.; M. GOODFELLOW ; R. BROWN; A. C. WARD; B. LANOOT; M. VANNCANNEYT; J. SWINGS; S.B. KIM; Z. LIU ; J. CHUN; T. TAMURA; A. OGUCHI;T. KIKUCHI; H. KIKUCHI; T. NISHII; K. TSUJI; Y. YAMAGUCHI; A.

- TASE; M. TAKAHASHI; T. SAKANE; K. I. SUZUKI; K. HATANO Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 101, p. 73-104, 2012.
- LAMBERT, D. H., & LORIA, R. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.39, p. 393-396, 1989b.
- LAMBERT, D. H., & LORIA, R.. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 39, p.387-392, 1989a.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley and Sons, New York, NY, p. 115-175, 1991.
- LAPAZ, M. I., HUGUET-TAPIA, J. C., SIRI, M. I., VERDIER, E., LORIA, R., & PIANZZOLA, M. J. Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant Disease*, v. 101, p. 1362-1372, 2017.
- LARKIN, R. P.; GRIFFIN, T. S.; HONEYCUTT, C. W. Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Disease*, v. 94, p.1491–1502, 2010.
- LARKIN, R. P.; HONEYCUTT, C. W.; GRIFFIN, T. S.; OLANYA, O. M.; HALLORAN, J. M.; HE, Z. Effects of different potato cropping system approaches and water management on soilborne diseases and soil microbial communities. *Phytopathology*, v. 101, p. 58–67, 2011.
- LARSEN, H. Halophilic and halotolerant microorganisms—an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Letters*, v.39, p.5-7, 1986.
- LAW, J. W. F., TAN, K. X., WONG, S. H., AB MUTALIB, N. S., & LEE, L. H. Taxonomic and characterization methods of *Streptomyces*: a review. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, v.1, p. 20-34, 2018.

- LEHTONEN, M. J.; RANTALA, H.; KREUZE, J. F. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology*, v. 53, p. 280-287, 2004.
- LEIMINGER, J.; FRANK, M.; WENK, C.; POSCHENRIEDER, G.; KELLERMANN, A.; SCHWARZFISCHER, A. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathology*, v. 62, p. 611-623, 2013.
- LERAT, S.; SIMAO-BEAUNOIR, A. M.; BEAULIEU, C. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, v. 10, p. 579–585, 2009.
- LEWIS, B. G. Effects of water potential on the infection of potato tubers by *Streptomyces scabies* in soils. *Annals of Applied Biology*, v. 66, p. 83-88, 1971.
- LAYVA-MIR, S.J.; F. GARAY-LIZARRAGA; O.G. ALVARADO-GOMEZ; L.E. CASTILLO-MARQUEZ.; J.M. TOVAR-PEDRAZA. Detección y control de *Streptomyces scabies* en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el valle del Mayo, Sonora, México. *Chilean Journal of Agriculture & Animal Science, ex Agro-Ciencia*, v.30, p. 5–13, 2014.
- LEINER, R. H., FRY, B. A., CARLING, D. E., & LORIA, R. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology*, 1996.
- LI, B., WANG, B., PAN, P., LI, P., QI, Z., ZHANG, Q., LIN, R. *Bacillus altitudinis* strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab. *Biocontrol Science and Technology*, v.29, p. 1009-1022, 2019a.
- LI, Y., LIU, J., DÍAZ-CRUZ, G., CHENG, Z.; BIGNELL, D. R. Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*, v.165, p. 1025-1040, 2019b.

- LIANG F.; LIN R.; YAO Y.; XIAO Y.; ZHANG M.; SHI C.; HE X.; ZHOU B.; WANG B. Systematic Identification of Pathogenic *Streptomyces* sp. AMCC400023 That Causes Common Scab and Genomic Analysis of Its Pathogenicity Island. *Phytopathology*, v.109, p 1115-1128, 2019.
- LIN, L.; GE, H. M.; YAN, T.; QIN, Y. H.; TAN, R. X. Thaxtomin A-deficient endophytic *Streptomyces* sp. enhances plant disease resistance to pathogenic *Streptomyces* scabies. *Planta*, v. 236, p. 1849–61, 2012.
- LINDHOLM, P.; KORTEMA, H.; KOKKOLA, M.; HAAHTELA, K.; SALKINOJASALONEN, M.; VALKONEN, J. P. T. *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Disease*, v. 81, p. 1317-1322, 1997.
- LIU, Z.; SHI, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z. O.; LU, Z.; LI, W.; HUANG, Y.; RODRIGUEZ, C.; GOODFELLOW, M. Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of ‘*Microstreptospora cinerea*’ to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p.1605-1610, 2005.
- LIU, T; LUO, H; GAO, F. Position preference of essential genes in prokaryotic operons. *PLoS ONE*, 16(4), 2021.
- LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A. M.; CARVALHO, D. D. Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum: Embrapa Arroz e Feijão. *Santo Antônio de Goiás, GO. Embrapa Arroz e Feijão*, 5pags, 2009.
- LOCCI, R. Actinomycetes as plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* v.100, p.179–200, 1994.
- LOPES C; DUVAL A.. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In:

ZAMBOLIM L; LOPES CA; PICANÇO MC; COSTA H.(Eds.). *Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Hortaliças. Viçosa: Editora UFV*, 502pags. 2007.

LOPES, C. A.; ZAMBOLIM Medidas integradas de controle das doenças bacterianas da batata. *Viçosa: Universidade Federal de Viçosa*, 28pags, 2007.

LORANG, J. M.; LIU, D.; ANDERSON, N.A.; SCHOTTEL, J. L. Identification of potato scab inducing and suppressive species of Streptomyces. *Phytopathology*, v. 85, p. 261-268, 1995.

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; FRY, B. A.; KING, R. R. Plant pathogenicity in the Genus Streptomyces. *Plant Disease*, v. 81, n. 8, p. 836-846, 1995.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in Streptomyces. *Annual Review of Phytopathology*, v. 44, p. 469-487, 2006.

LORIA, R., BIGNELL, D. R., MOLL, S., HUGUET-TAPIA, J. C., JOSHI, M. V., JOHNSON, E. G., & GIBSON, D. M. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus Streptomyces. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 3-10. 2008.

LUTMAN, B.F. Potato scab. *Vermont Agricultural Experiment Station*, 1073pags, 1914.

LYSENKO, Y.N.; PLUZHNIKOVA, I. A system of potato protection from diseases with the use of biological control agents. *Kartof. Ovoshchi*, v.3, p. 28–29, 2005.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 561-588, 2006.

MANZER, F. E.; STORCH, R. H.; SEWELL, G. H. Evidence for a relationship between certain soil arthropods and acid scab development. *American Potato Journal*, v. 61, p. 741-746, 1984.

- MANZER, F.E., G.A. MCINTYRE, D.C. MERRIAM. A new potato scab problem in Maine. *Life Sciences and Agriculture Experiment Station Technical Bulletin*. V.85, p. 1-27, 1977.
- MAPA, Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 25 de 27 de junho de 2017. Estabelecer as Normas para a Produção e a Comercialização de Material de Propagação de Batata (*Solanum tuberosum* L.) e os seus padrões, com validade em todo o território nacional, visando à garantia de sua identidade e qualidade. Brasília, DF, Processo nº 21000.006442/2018-77, 2018.
- MARQUES, H. M C.; Avaliação do efeito do ph do solo e irrigação na incidência e severidade da sarna da batata causada por *Streptomyces* spp. *Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, Campinas.* 71pags, 2019. Disponível em: <http://repositoriobiologico.com.br/jspui/bitstream/123456789/111/1/HARIELLY%20MARIANNE%20COSTA%20MARQUES.pdf>
- MAYFIELD, C. I.; WILLIAMS, S. T.; RUDDICK, S. M.; HATFIELD, H. L. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. iV. Observations on the form and growth of *Streptomyces* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 4, p. 79-91, 1972.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P., AUCH, A. F., KLENK, H. P., & GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-14. 2013.
- MENG, Q.; HANSON, L. E.; DOUCHES, D.; HAO, J. J. Managing scab diseases of potato and radish caused by *Streptomyces* spp. using *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 and other biomaterials. *Biological Control*, v. 67, p. 373-379, 2013.
- MILLARD, W. A.; BURR, S. A study of twenty-four strains of *Actinomyces* and their relation to types of common scab of potato. *Annals of Applied Biology*, v. 13, p. 580-644, 1926.

- MIYAJIMA, K.; TANAKA, F., TAKEUCHI, T.; KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p. 495-502, 1998.
- MIZUNO, N.; YOSHIDA, H.; TADANO, T. Efficacy of Single Application Ammonium Sulfate in Suppressing Potato Common Scab. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 46, n. 3, p. 611-616, 2000.
- MULDER A; TURKENSTEEN LJ. Potato diseases, *NIVAP: Den Haag*, Holanda, 280pags, 2005.
- MUN, H.-S.; OH, E.-J.; KIM, H.-J.; LEE, K.-H.; KOH, Y.-H.; KIM, C.-J.; HYUN, J.-W.; KIM, B.-J. Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 30, p. 401-407, 2007.
- NAVARRO, F. M. et al. Varietal Resistance to Common Scab. 2012. Disponível em: . Acesso em 2020.
- ONIKI, M.; SUZUI, T.; ARAKI, T.; SONODA, R.; CHIBA, T.; TAKEDA, T. Causal agent of russett scab of potato. *Bull Natl Inst Agro Environ Sci* v. 2, p. 45–59, 1986.
- OTTO-HANSON, L. K.; GRABAU, Z.; ROSEN, C.; SALOMON, C. E.; KINKEL, L.L. Pathogen variation and urea influence selection and success of *Streptomyces* mixtures in biological control. *Phytopathology*, v. 103, p. 34-42, 2013.
- PARK, D. H.; KIM, J. S.; KWON, S. W.; WILSON, C.; YU, Y. M.; HUR, J. H.; LIM, C. K. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 2049- 2054, 2003.
- PARTE, A.C. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, v.68, p.1825-1829, 2018.

PELCZAR, M.E. Vascular access: an historical review. *Asepsis 3rd Quarter*, 18, 9–13. 1996.

PERSON, L. H.; MARTIN W. J. Soil rot of sweet potatoes in Louisiana. *Phytopathology*, v. 30, p. 913-926, 1940.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J., Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 151-156, 1989.

PRIDHAM, T. G., ANDERSON, P., FOLEY, C., LINDENFELSER, L. A., HESSELTINE, C. W., & BENEDICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes, *Antibiot Anu*, p.947-953, 1957.

PUNG, H.; CROSS, S. Common scab incidence on seed potatoes, and seedborne disease control. *Conference proceedings of Potatoes*. 2000.

RICHTER, M., & ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131. 2009.

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

RONG, X; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Syst Appl Microbiol*. 2012

SANTOS-CERVANTES, M. E., FELIX-GASTELUM, R., HERRERA-RODRÍGUEZ, G., ESPINOZA-MANCILLAS, M. G., MORA-ROMERO, A. G., & LEYVA-LÓPEZ, N. E. Characterization, pathogenicity and chemical control of *Streptomyces* acidiscabies associated to potato common scab. *American journal of potato*

research, v. 94, p. 14-25, 2017.

SARWAR, A., LATIF, Z., & CABALEIRO, C. First report of *Streptomyces turgidiscabies* causing potato common scab in Spain. *Plant Disease*, v.101, p. 1671-1671, 2017.

SARWAR, A., LATIF, Z., OSORIO, C. R., & CABALEIRO, C. First report of *Streptomyces scabies* causing potato common scab in Punjab, Pakistan. *Plant Disease*, v.101, p.378, 2017.

SARWAR, A., LATIF, Z., ZHANG, S., HAO, J., & BECHTHOLD, A. A Potential Biocontrol Agent *Streptomyces violaceusniger* AC12AB for Managing Potato Common Scab. *Frontiers in microbiology*, v.10, p. 202, 2019.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *American Phytopathological Society*. 611pags, 2001.

SCHOLTE, K.; LABRUYÈRE, R. E. Netted scab: a new name for an old disease in Europe. *Potato Research*, v. 28, p. 443-448, 1985.

SEIPKE RF, KALTENPOTH M, HUTCHINGS MI. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS Microbiol Ver*. v.36, p. 862-876, 2013.

SEITOU, N; NEI, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees., *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406–425, 1987.

SHEPHERD, M. D., KHAREL, M. K., BOSSERMAN, M. A., & ROHR, J. (2010). Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Current protocols in microbiology*, v.18, p. 10. 21, 2010.

SHIMOYAMA, N. Y. A cadeia brasileira da batata – situação atual, 2014. Disponível em: <http://consumoymercadodepapa.wordpress.com/2014/11/28/a-cadeia-brasileira-dabatata-situacao-atual>. Acesso em: 11 de outubro de 2019.

- SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 16, p. 313-340, 1966.
- SILVA, J. B. T; MELLO, S. C. M. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 17pags, 2007.
- SLABBERT, R.; KLERK, A.D.; PRETORIUS, E. Isolation of the phytotoxin thaxtomin A associated with *Streptomyces scabies* (common scab) in potatoes. *J. S. Afr. Soc. Hortic. Sci.*v. 4, p. 33–34, 1994.
- SOLTANI, N., CONN, K. L., ABBASI, P. A., & LAZAROVITS, G. Reduction of potato scab and verticillium wilt with ammonium lignosulfonate soil amendment in four Ontario potato fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.24, p. 332-339, 2002.
- SONG, J.; LEE, S.-C.; KANG, J.-W.; BAEK, H.-J.; SUH, J.-W. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 203-209, 2004.
- SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 312-316, 1999.
- STARK, C.; THORNTON, M; NOLTE, P. Potato production systems. *Springer Nature*, 675pags, 2020.
- ST-ONGE, R.; GADKAR, V. J.; ARSENEAULT, T.; GOYER, C.; FILION, M. The ability of *Pseudomonas* sp. LBUM 223 to produce phenazine-1-carboxylic acid affects the growth of *Streptomyces scabies*, the expression of thaxtomin biosynthesis genes and the biological control potential against common scab of potato. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 75, n. 1, p. 173-183, 2011.

- ST-ONGE, R.; GOYER, C.; COFFIN, R.; FILION, M. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 31, p. 474-484, 2008.
- STURZ, A. V.; RYAN, D. A. J.; COFFIN, A. D.; MATHERSON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; KIMPINSKI, J.; CHRISTIE, B. R. Stimulating disease suppression in soils: sulphate fertilizers can increase biodiversity and antibiosis ability of root zone bacteria against *Streptomyces scabies*. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36, p. 343-352, 2004.
- TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46, p. 476-479, 1996.
- TANIZAWA, Y., FUJISAWA, T., & NAKAMURA, Y. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics*, 34(6), 1037-1039, 2018.
- TAVARES, G.M. Podridão do pé do mamoeiro: infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e *Trichoderma* e avaliação dos mecanismos de defesa envolvidos. *Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife*. 2009.
- TOTH, L., MAEDA, M., TANAKA, F.; KOBAYASHI, K. Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v. 48, p. 575- 585, 2001.
- TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, p. 327–338, 1999.
- UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. Two distinct

- mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 78- 82, 1999.
- VAN DISSEL, D., CLAESSEN, D., & VAN WEZEL, G. P. Morphogenesis of Streptomyces in submerged cultures. *Advances in applied microbiology*, v. 89, p. 1-45, 2014.
- VAN TONDER, A. J., MISTRY, S., BRAY, J. E., HILL, D. M., CODY, A. J., FARMER, C. L., & BRUEGGEMANN, A. B. Defining the estimated core genome of bacterial populations using a Bayesian decision model. *PLoS computational biology*, 10(8), 2014.
- WAKSMAN, S. A. Cultural studies of species of Actinomyces. *Soil Sci.* v. 8, p. 71-215, 1919.
- WAKSMAN, S. A.; HENRICI, A. T. Family II. Actinomycetaceae Buchanan and family Streptomycetaceae Wakesman and Henrici. In: BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., 136 HITCHENS, A. P. (Eds.). *Bergey's Manual of Determinative Microbiology*, 6th ed. The Williams & Wilks Co., Baltimore, p. 892-980, 1948.
- WAKSMAN, S. A.; R. E. CURTIS. The Actinomyces of the soil. *Soil Sci.* v.1, p. 99-134, 1916.
- WANNER, L. A. A new strain of Streptomyces causing common scab in potato. *Plant Disease*, v. 91, p. 352-359, 2007.
- WANNER, L. A. A survey of genetic variation in Streptomyces isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopatology*, v. 96, n. 12, p. 1363-1371, 2006.
- WANNER, L. A., & KIRK, W. W. Streptomyces—from basic microbiology to role as a plant pathogen. *American Journal of Potato Research*, v. 92, p. 236-242, 2015.
- WANNER, L.A., HAYNES, K.G. Aggressiveness of Streptomyces on Four Potato Cultivars and Implications for Common Scab Resistance Breeding. *Am. J. Pot* v.

86, p. 335–346, 2009.

WAYNE, L. G., BRENNER, D. J., COLWELL, R. R., GRIMONT, P. A. D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M. I., ... & TRUPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464. 1987.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHARTON, P.; DRISCOLL, J.; DOUCHES, D.; KIRK, W. Common scab of potato. 2011. Disponível em: <http://www.potatodiseases.org/scab.html>. Acesso: 14 de abril de 2020.

WIETZ M, DUNCAN K, PATIN NV, JENSEN PR. Antagonistic interactions mediated by marine bacteria: the role of small molecules. *J Chem Ecol*, v. 39, p.879–891, 2013.

WIJESINHA-BETTONI, R.i; MOUILLÉ, B. The Contribution of Potatoes to Global Food Security, Nutrition and Healthy Diets. *American Journal of Potato Research*, v. 96, n. 2, p. 139-149, 2019.

WILLIAMS, S. T.; SHARPLES, G. P.; BRADSHAW, R. M. (1973). The fine structure of the Actinomycetales, In: SYKES, G.; SKINNER, F.A. (eds). Actinomycetales. Academic Press, 1973, p. 113-130.

WILSON C. R.; PEMBERTON, B. M.; RANSOM, L. M. The effect of irrigation strategies during tuber initiation on marketable yield and development of common scab disease of potato in Russet Burbank in Tasmania. *Potato Research*, v. 44, p. 243–251, 2001.

WILSON, C. R.; RANSOM, L. M.; PEMBERTON, B. M. The relative importance of

seed-borne inoculum to common scab disease of potato and the efficacy of seed tuber and soil treatments for disease control. *Journal of Phytopathology*, 2008.

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

WILSON, C. R.; TEGG, R. S.; WILSON, A. J.; LUCKMAN, G. A.; EYLES, A.; YUAN, Z. Q.; HINGSTON, L. H.; CONNER, A. J. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection. *Phytopathology*, v. 100, n. 5, p. 460–467, 2010.

YOON, S. H., HA, S. M., LIM, J., KWON, S., & CHUN, J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie VanLeeuwenhoek*, 110(10), 1281-1286. 2017.

YOSSEN; R. ROJO; V. BARRERA; G. CHIESSA; G. ZUMELZU; J. COZZI; K. KOBAYASHI; L. GASONI. Effect of green manure and biocontrol agents on potato crop in cordoba, argentina. *Journal of Plant Pathology*, 93 (3), 713-717, 2011.

ZAHEER, K; AKHTAR, M. H.. Potato production, usage, and nutrition—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 56, p. 711-721, 2016.

ZAMBOLIM, L.; CÁSSIA, R. M.; PICANÇO, M. C.; MANTOVANI, E. C.; QUEIROZ, M. E.; SOUZA, D. O.; BITTENCORT, L.; DUARTE, H. S. S.; PALOCCI NETO, O.; RIBEIRO, J. D. R.; PADUA, J. G. Produção Integrada de Batata. In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Produção integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros. Brasília: Mapa/ACS; cap. 11, p. 261-328, 2009.

ZHANG B., WU X., ZHANG G., LI S., ZHANG W., CHEN X., SUN L., ZHANG B., LIU G., CHEN T. The diversity and biogeography of the communities of Actinobacteria in the forelands of glaciers at a continental scale. *Environ Res Lett*,

v.11, p 1-15, 2016.

ZHANG, J.; YIN, Y.; YAN, R.; HA, S.; LIN, T.; CHENG, Y.; Hu, B. Occurrence and control approach of potato common scab (caused by *Streptomyces scabiei*) in Nei Menggu, China. *Potato J.* v. 27, p. 56–59, 2013.

ZHAO, W. Q., LIU, D. Q., & YU, X. M. First report of potato scab caused by *Streptomyces turgidiscabies* in China. *Plant disease*, v. 92, p.1587-1587, 2008.

ZHBANNIKOV, I. Y., HUNTER, S. S., FOSTER, J. A., & SETTLES, M. L. SeqyClean: a pipeline for high-throughput sequence data preprocessing. **In *Proceedings of the 8th ACM International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics***, 407-416, 2017.

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

	2049	2023	2085	2110	2086	2114	2051	2106	2011	2012	2111	2117	2805 G6	2806 G6	2807 G6	2815 G6	2865 G6	2949 G6	2953 G6	2394 G9	2503 G9	2507 G9	2968 G9	3135 G9	2435 G16	3010 G16	3018 G16	
2049																												
2023	97,94																											
2085	97,64	96,20																										
2110	91,45	90,64	90,63																									
2086	96,35	94,88	96,12	89,88																								
2114	96,04	94,73	95,81	90,71	97,33																							
2051	96,65	95,11	97,18	90,71	96,04	95,81																						
2106	95,50	94,10	95,81	90,22	95,19	94,73	98,23																					
2011	96,35	95,04	96,88	90,71	95,73	95,50	99,49	97,93																				
2012	96,20	94,88	96,65	90,21	95,50	95,12	98,97	97,48	98,75																			
2111	94,88	93,39	94,41	89,73	94,80	95,11	95,27	93,86	94,96	94,65																		
2117-2	97,56	96,04	97,18	90,38	95,89	95,66	96,11	94,72	95,88	95,34	94,65																	
2805G6	98,08	96,58	97,56	92,18	97,26	96,88	97,56	96,42	97,18	97,03	95,66	96,65																
2806G6	98,01	96,43	97,49	92,26	97,26	96,96	97,71	96,49	97,33	97,03	95,73	96,73	99,71															
2807G6	96,42	95,04	96,35	90,97	95,50	95,04	95,66	94,80	95,35	94,96	94,18	95,35	97,03	97,33														
2815G6	97,71	96,35	97,56	92,02	97,33	97,26	97,63	96,26	97,25	96,80	95,66	96,96	99,34	99,49	97,26													
2865G6	96,12	94,80	95,74	91,21	94,88	94,81	95,27	94,64	94,96	94,73	93,78	94,80	96,96	96,88	97,03	96,80												
2949G6	97,86	96,35	97,64	92,10	97,26	97,03	97,86	96,49	97,48	97,03	95,89	96,88	99,71	99,85	97,33	99,64	96,88											
2953G6	97,94	96,43	97,71	92,34	97,18	96,88	97,63	96,27	97,26	96,80	95,89	97,03	99,34	99,49	97,49	99,42	97,03	99,64										
2394G9	93,07	91,78	93,39	88,29	92,03	92,67	93,78	92,59	93,63	93,23	94,80	92,66	93,15	93,31	92,27	92,99	91,94	93,39	93,63									
2503G9	95,12	93,78	95,50	89,97	94,02	94,18	95,81	94,41	95,66	95,27	96,73	94,57	95,19	95,27	94,18	95,11	93,94	95,43	95,73	97,71								
2507G9	94,41	93,15	94,73	88,88	93,47	93,55	95,43	93,94	95,12	94,80	95,35	93,94	94,41	94,65	93,63	94,65	93,07	94,73	94,80	97,11	97,56							
2968G9	92,42	91,45	92,67	88,11	91,94	91,62	93,07	92,02	92,91	92,75	93,47	91,77	92,42	92,50	92,18	92,26	91,37	92,42	92,83	94,18	95,73	94,41						
3135G9	95,42	93,86	95,81	90,22	94,02	94,26	96,35	94,96	96,04	95,73	96,58	94,95	95,42	95,65	94,65	95,34	94,10	95,73	95,96	97,03	98,53	97,41	96,27					
2435G16	94,25	92,98	94,09	89,38	94,08	94,40	94,95	93,69	94,72	94,25	95,58	95,65	94,72	94,95	93,22	94,80	92,74	95,03	95,11	94,41	95,50	94,09	91,93	95,11				
3010G16	94,02	92,51	94,65	89,89	93,70	94,02	95,42	94,25	95,19	94,80	96,27	94,88	94,80	94,88	93,31	94,80	93,07	95,03	95,11	93,55	95,66	94,02	92,34	95,35	96,50			
3018G16	94,33	93,07	94,72	88,88	94,24	94,41	95,57	94,24	95,34	94,95	95,19	94,56	94,95	95,03	93,06	94,95	92,58	95,19	95,26	93,70	95,73	94,33	92,50	95,34	96,65	95,65		

Tabela Compl. 1 – Matriz de similaridade computadas pelo gene parcial do 16S RNAr de *Streptomyces* spp.

	2049	2023	2085	2110	2086	2114	2051	2106	2011	2012	2111	2117	2805 G6	2806 G6	2807 G6	2815 G6	2865 G6	2949 G6	2953 G6	2394 G9	2503 G9	2507 G9	2968 G9	3135 G9	2435 G16	3010 G16	3018 G16	
2049																												
2023	0,054																											
2085	0,025	0,049																										
2110	0,078	0,078	0,077																									
2086	0,088	0,073	0,088	0,097																								
2114	0,088	0,072	0,087	0,097	0,003																							
2051	0,121	0,119	0,121	0,118	0,121	0,121																						
2106	0,121	0,119	0,122	0,118	0,120	0,121	0,006																					
2011	0,123	0,120	0,126	0,113	0,121	0,121	0,033	0,035																				
2012	0,124	0,120	0,126	0,115	0,122	0,122	0,034	0,036	0,004																			
2111	0,113	0,117	0,113	0,108	0,121	0,121	0,114	0,113	0,110	0,110																		
2117	0,086	0,090	0,082	0,092	0,102	0,102	0,103	0,104	0,106	0,107	0,115																	
2805G6	0,068	0,062	0,067	0,067	0,088	0,088	0,109	0,110	0,110	0,111	0,103	0,084																
2806G6	0,081	0,076	0,081	0,081	0,102	0,102	0,125	0,125	0,126	0,126	0,118	0,097	0,028															
2807G6	0,097	0,098	0,095	0,088	0,118	0,118	0,139	0,138	0,139	0,140	0,127	0,111	0,057	0,075														
2815G6	0,069	0,064	0,069	0,070	0,090	0,090	0,113	0,113	0,113	0,114	0,106	0,085	0,015	0,030	0,061													
2865G6	0,109	0,113	0,109	0,111	0,131	0,131	0,160	0,160	0,164	0,164	0,141	0,128	0,076	0,089	0,060	0,078												
2949G6	0,065	0,061	0,065	0,065	0,087	0,087	0,108	0,108	0,109	0,110	0,103	0,081	0,012	0,023	0,058	0,014	0,076											
2953G6	0,077	0,075	0,076	0,075	0,099	0,099	0,119	0,119	0,119	0,120	0,116	0,094	0,028	0,044	0,054	0,031	0,073	0,027										
2394G9	0,138	0,142	0,136	0,135	0,152	0,152	0,161	0,162	0,160	0,160	0,151	0,149	0,134	0,153	0,156	0,139	0,179	0,135	0,143									
2503G9	0,093	0,100	0,093	0,097	0,107	0,107	0,121	0,121	0,120	0,121	0,111	0,101	0,088	0,101	0,110	0,090	0,127	0,085	0,095	0,117								
2507G9	0,103	0,107	0,102	0,107	0,116	0,116	0,128	0,126	0,126	0,127	0,116	0,110	0,096	0,109	0,120	0,098	0,138	0,096	0,105	0,122	0,036							
2968G9	0,110	0,112	0,110	0,109	0,123	0,122	0,137	0,138	0,139	0,140	0,131	0,118	0,103	0,116	0,129	0,106	0,147	0,103	0,113	0,133	0,066	0,070						
3135G9	0,090	0,093	0,089	0,092	0,103	0,103	0,117	0,117	0,119	0,119	0,112	0,100	0,087	0,101	0,109	0,089	0,128	0,086	0,098	0,113	0,051	0,055	0,044					
2435G16	0,139	0,146	0,139	0,138	0,147	0,147	0,145	0,146	0,142	0,142	0,138	0,137	0,133	0,145	0,157	0,135	0,174	0,133	0,143	0,179	0,145	0,151	0,154	0,138				
3010G16	0,129	0,134	0,127	0,128	0,134	0,134	0,125	0,124	0,124	0,124	0,124	0,127	0,122	0,137	0,148	0,122	0,168	0,120	0,131	0,164	0,127	0,134	0,145	0,127	0,088			
3018G16	0,123	0,131	0,123	0,125	0,130	0,130	0,124	0,124	0,124	0,125	0,115	0,126	0,121	0,137	0,147	0,123	0,167	0,119	0,130	0,165	0,126	0,134	0,147	0,128	0,082	0,065		

Tabela Compl. 2 – Matriz de similaridade computadas a partir do concateneamento das seqüências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* de *Streptomyces* spp.

	2049	2023	2085	2110	2086	2114	2051	2106	2011	2012	2111	2117-2	2805G6	2806G6	2807G6	2815G6	2865G6	2949G6	2953G6	2394G9	2503G9	2507G9	2968G9	3135G9	2435G16	3010G16	3018G16	
2049																												
2023	0,046																											
2085	0,025	0,046																										
2110	0,080	0,082	0,081																									
2086	0,075	0,067	0,075	0,098																								
2114	0,076	0,067	0,076	0,096	0,008																							
2051	0,099	0,101	0,097	0,112	0,101	0,101																						
2106	0,102	0,104	0,102	0,113	0,102	0,104	0,009																					
2011	0,101	0,102	0,102	0,108	0,101	0,102	0,026	0,032																				
2012	0,102	0,103	0,102	0,110	0,102	0,103	0,028	0,033	0,006																			
2111	0,098	0,105	0,098	0,107	0,103	0,103	0,097	0,100	0,095	0,096																		
2117-2	0,070	0,077	0,069	0,093	0,087	0,087	0,087	0,091	0,090	0,092	0,100																	
2805G6	0,056	0,055	0,056	0,069	0,073	0,073	0,088	0,091	0,089	0,090	0,088	0,072																
2806G6	0,066	0,066	0,067	0,080	0,083	0,084	0,099	0,102	0,101	0,102	0,099	0,081	0,022															
2807G6	0,082	0,086	0,080	0,088	0,100	0,101	0,115	0,116	0,116	0,117	0,110	0,095	0,051	0,063														
2815G6	0,058	0,058	0,058	0,072	0,074	0,074	0,090	0,094	0,091	0,093	0,090	0,072	0,013	0,024	0,052													
2865G6	0,091	0,097	0,092	0,105	0,111	0,111	0,131	0,133	0,134	0,135	0,121	0,109	0,065	0,074	0,052	0,067												
2949G6	0,054	0,055	0,055	0,068	0,072	0,073	0,086	0,090	0,088	0,089	0,087	0,068	0,010	0,018	0,050	0,012	0,065											
2953G6	0,063	0,066	0,062	0,075	0,082	0,082	0,095	0,098	0,095	0,097	0,097	0,078	0,022	0,034	0,047	0,025	0,062	0,021										
2394G9	0,121	0,127	0,119	0,131	0,134	0,132	0,136	0,139	0,136	0,137	0,126	0,130	0,118	0,131	0,136	0,121	0,154	0,118	0,123									
2503G9	0,082	0,091	0,081	0,098	0,096	0,095	0,101	0,105	0,101	0,102	0,091	0,089	0,078	0,088	0,097	0,080	0,111	0,076	0,082	0,093								
2507G9	0,091	0,097	0,090	0,108	0,103	0,103	0,107	0,110	0,107	0,108	0,099	0,097	0,086	0,095	0,106	0,087	0,121	0,085	0,091	0,098	0,033							
2968G9	0,101	0,105	0,101	0,111	0,112	0,113	0,120	0,124	0,122	0,123	0,115	0,109	0,097	0,106	0,117	0,099	0,131	0,096	0,103	0,114	0,061	0,067						
3135G9	0,079	0,085	0,077	0,094	0,092	0,092	0,096	0,100	0,099	0,100	0,092	0,088	0,077	0,087	0,095	0,078	0,111	0,075	0,084	0,092	0,042	0,048	0,042					
2435G16	0,118	0,127	0,119	0,130	0,125	0,124	0,121	0,125	0,119	0,121	0,114	0,113	0,113	0,121	0,135	0,114	0,148	0,112	0,119	0,147	0,119	0,127	0,135	0,115				
3010G16	0,111	0,119	0,109	0,121	0,116	0,116	0,105	0,108	0,105	0,106	0,102	0,108	0,105	0,115	0,127	0,105	0,143	0,102	0,110	0,139	0,106	0,116	0,128	0,106	0,074			
3018G16	0,106	0,116	0,105	0,122	0,111	0,111	0,104	0,107	0,104	0,106	0,098	0,107	0,103	0,114	0,127	0,104	0,143	0,101	0,109	0,139	0,105	0,115	0,129	0,107	0,070	0,059		

Tabela Compl. 3 – Matriz de similaridade computadas a partir do concateneamento das sequências dos genes 16S RNAr, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* de *Streptomyces* spp.