

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE *Streptomyces* spp. EM CULTIVARES DE BATATA E QUANTIFICAÇÃO DA TAXTOMINA A PRODUZIDA POR DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO

MARCEL COSTA ALPISTE

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

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

São Paulo

2018

Eu **Marcel Costa Alpiste**, 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 ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Marcel Costa Alpiste Data 19/06/18

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

Alpiste, Marcel Costa.

Avaliação da agressividade de *Streptomyces* spp. em cultivares de batata e quantificação da taxomina A produzida por diferentes espécies do gênero. / Marcel Costa Alpiste. - São Paulo, 2018.

73 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018.D.MA09

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Suzete Aparecida Lanza Destéfano.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the aggressiveness of *Streptomyces* spp. in potato cultivars and quantification of thaxomin A produced by different species of the genus.

1. *Solanum tuberosum* 2. Resistência de cultivares 3. Fitotoxina txtA 4. TLC
I. Alpiste, Marcel Costa II. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Marcel Costa Alpiste

Título: Avaliação da agressividade de linhagens de *Streptomyces* spp. em cultivares de batata e quantificação da taxtomina A produzida por diferentes espécies do gênero.

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: 19 / 06 / 18

Banca Examinadora

Prof.Dr. Suzete A. L. Destéfano Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Prof.Dr. Sérgio F. Pascholati Instituição: IGAMA / USP
Julgamento: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Prof.Dr. César J. Bueno Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano pelos ensinamentos, pela confiança e pelo empenho com que sempre me orientou neste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio F. Pascholati pela disponibilidade e treinamento para a realização dos experimentos de cromatografia de camada delgada.

Ao professor Dr. César Junior Bueno pelo auxílio com testes estatísticos.

Às professoras Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini (CPQBA/DRM – Unicamp) e Dra. Anete Pereira de Souza (CBMEG-Unicamp) por cederem seus equipamentos para realização de alguns experimentos.

Às Dra. Mariana Ferreira Tonin e Dra. Daniele B. A. Corrêa pela amizade e colaboração nos ensaios realizados.

Ao pesquisador do Laboratório de Bacteriologia Vegetal Dr. Luís Otávio S. Beriam pela amizade e acolhimento no laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 2016/19709-8) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Associação Brasileira da Batata (ABBA) pelo apoio e fornecimento de material para realização do projeto, em especial ao engenheiro agrônomo Natalino Yassushi Shimoyama.

Ao engenheiro agrônomo Sr. Pedro Hayashi pelo fornecimento das amostras de minitubérculos de batata utilizadas no estudo.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal Alex, Mari Appy, Harielly Barbara, Regiane, Karen, Alan, Júlia, Thamy, Gustavo e Hevelyn pela amizade, companheirismo e grande contribuição nesse trabalho.

À minha namorada Grazi por todo amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

À minha família pelos incentivos, pela dedicação e por estarem sempre presentes.

RESUMO

ALPISTE, M. C. Avaliação da agressividade de *Streptomyces* spp. em cultivares de batata e quantificação da taxtomina A produzida por diferentes espécies do gênero. São Paulo. 2018. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

A batata é uma cultura de grande importância econômica em muitos países e sua produtividade vem aumentando gradativamente, porém a produção ainda é considerada baixa devido a doenças como a sarna da batata, causada por diferentes espécies do gênero *Streptomyces*. O mecanismo de patogenicidade da maioria das espécies deste gênero envolve diferentes fatores, tais como as proteínas Nec1 e tomatinase, que auxiliam na evasão da defesa do hospedeiro, e a fitotoxina taxtomina A, responsável pelo desenvolvimento das lesões. O objetivo deste estudo foi avaliar a agressividade de 30 linhagens de *Streptomyces* em cultivares de batata Ágata, Asterix, Atlantic, Challenger e Markies por meio de testes de patogenicidade em fatias de minitubérculos. Além disso, o trabalho também teve como objetivo extrair e quantificar a fitotoxina taxtomina A produzida por essas linhagens e verificar se existe correlação entre a produção da fitotoxina e agressividade do patógeno. A taxtomina extraída foi purificada por meio de cromatografia de camada delgada (TLC – *Thin Layer Chromatography*) e quantificada por leitura de absorvância em espectrofotômetro. Nos testes de patogenicidade, as linhagens se mostraram mais agressivas nas cultivares Challenger e Atlantic, e menos agressivas em Ágata e Markies. Entretanto, foi possível observar variações no grau de agressividade dependendo da linhagem e da cultivar testadas. Nos experimentos de quantificação de taxtomina A, os maiores valores foram observados pelas espécies *S. europaeisabiei* (IBSBF 2498) e *S. scabiei* (IBSBF 2242, 2250 e 2359). Não foi possível correlacionar a quantidade de taxtomina A produzida com a agressividade do patógeno, uma vez que algumas linhagens com baixa produção da fitotoxina se mostraram muito agressivas e outras com alta produção se mostraram pouco agressivas.

PALAVRAS-CHAVE: *Solanum tuberosum*, resistência de cultivares, fitotoxina txtA, TLC.

ABSTRACT

ALPISTE, M.C. Evaluation of the aggressiveness of *Streptomyces* spp. in potato cultivars and quantification of thaxtomin A produced by different species of the genus. São Paulo. 2018. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Potato crop has a great economic importance in many countries and its productivity has been increasing gradually, however the production is still considered low due to diseases such as potato scab caused by different species of *Streptomyces*. The pathogenicity mechanism of most species of this genus involves different factors, such as the Nec1 and tomatinase proteins, which aid in the evasion of host defense; and the phytotoxin thaxtomin A, responsible for the development of the lesions. The objective of this study was to evaluate the aggressiveness of 30 *Streptomyces* strains on potato cultivars Ágata, Asterix, Atlantic, Challenger and Markies through of pathogenicity tests on minituber slices. In addition, the work also aimed to extract and quantify the phytotoxin thaxtomin A produced by these strains and to verify the correlation between the production of phytotoxin and pathogen aggressiveness. The extracted thaxtomin was purified by thin layer chromatography (TLC) and quantified by absorbance data in a spectrophotometer. In the pathogenicity tests, the strains were more aggressive in the Challenger and Atlantic cultivars, and less aggressive in Ágata and Markies. However, variations in the aggressiveness level were observed depending on the strain and cultivar tested. In the thaxtomin A quantification experiments, the highest values were observed by the species *S. europaeisabiei* (IBSBF 2498) and *S. scabiei* (IBSBF 2242, 2250 and 2359). There was no correlation between thaxtomin A production and pathogen aggressiveness, since some strains with low phytotoxin production were very aggressive and others with high production showed low aggressiveness.

KEYWORDS: *Solanum tuberosum*, phytotoxin txtA, cultivars resistance, TLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	17
Figura 2. Ilha de patogenicidade de algumas espécies de <i>Streptomyces</i>	19
Figura 3. (A) via biossintética da taxtomina A; (B) supostos genes envolvidos na biossíntese da taxtomina A.	22
Figura 4. Esquema da avaliação do teste de patogenicidade de linhagens de <i>Streptomyces</i>	30
Figura 5. Teste de patogenicidade de linhagens de <i>Streptomyces</i> em minitubérculos de batata da cultivar Ágata.....	31
Figura 6. Método de produção e extração de taxtomina bruta utilizado.	34
Figura 7. Teste de patogenicidade de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp. em minitubérculos de batata da cultivar Ágata após 10 dias de inoculação.	36
Figura 8. Necrose em fatias de minitubérculos de batata das cultivares (A) Ágata, (B) Asterix, (C) Challenger, (D) Markies e (E) Atlantic	40
Figura 9. Necrose em tubérculos de batata das cultivares (A) Asterix e (B) Challenger.	41
Figura 10. Necrose em minitubérculos de batata causada por <i>S. caviscabies</i> IBSBF 2400 nas seguintes cultivares: (A) Ágata, (B) Asterix, (C) Challenger, (D) Markies e (E) Atlantic.	42
Figura 11. Agressividade de <i>Streptomyces</i> spp. em minitubérculos de batata das cultivares Ágata, Asterix, Challenger, Markies e Atlantic.....	43
Figura 12. Amplificação por PCR do operon <i>txtAB</i> das diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i>	45
Figura 13. Cromatografia de camada delgada (TLC) de extratos de linhagens de <i>S. scabiei</i>	46
Figura 14. Cromatografia de camada delgada (TLC) de extratos de linhagens de <i>Streptomyces</i> evidenciando a produção de taxtomina	47

Figura 15. Cromatografia de camada delgada (TLC) de extratos de linhagens de <i>Streptomyces</i> , evidenciando a produção de taxtomina	47
Figura 16. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Ágata de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	51
Figura 17. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Asterix de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	52
Figura 18. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Atlantic de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	52
Figura 19. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Challenger de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	53
Figura 20. Comparação da produção de Taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Markies de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Streptomyces</i> spp. utilizadas neste estudo.....	28
Tabela 2. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de <i>Streptomyces scabiei</i> em minitubérculos de batata.	37
Tabela 3. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de <i>Streptomyces scabiei</i> em minitubérculos de batata.	37
Tabela 4. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> e <i>Streptomyces ipomoeae</i> em minitubérculos de batata.	38
Tabela 5. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de <i>Streptomyces caviscabies</i> e <i>Streptomyces</i> sp. em minitubérculos de batata.	38
Tabela 6. Agressividade de linhagens de <i>Streptomyces</i> spp demonstrando a suscetibilidade de diferentes cultivares de batatas em testes de patogenicidade em minitubérculos	39
Tabela 7. Amplificação do operon <i>txtAB</i> , quantificação de taxtomina A, e agressividade das linhagens de <i>Streptomyces</i> no teste de patogenicidade nas cinco cultivares de batata testadas.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABBA - Associação Brasileira da Batata

BSA - Albumina sérica bovina

°C - graus Celsius

cm - centímetro

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA - ácido etilenodiamino tetracético

g - gravidade

h - hora

há - hectare

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBSBF - Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico

Kb - Kilobases

Kg - Kilograma

LiCl - cloreto de lítio

L - litro

M - molar

Mg - miligrama

MgCl₂ - cloreto de magnésio

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

µg - micrograma

µL - microlitro

NaCl - cloreto de sódio

NaOCl - hipoclorito de sódio

nm - nanômetro

OMB - *Oatmeal Broth*

PAI - *pathogenicity island*.

Pb - pares de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH - potencial hidrogeniônico

RNase - ribonuclease

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

TAE - Tris - Acetato – EDTA

Taq - *Thermus aquaticus* (enzima DNA polimerase)

TE - Tris – EDTA

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

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

U - Unidade

YME - *Yeast Malt Extract*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Dados de Produção da Cultura da Batata.....	13
2.2. Espécies do gênero <i>Streptomyces</i> e Sarna da batata	14
2.3. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp.....	16
2.4. Patogenicidade em <i>Streptomyces</i>	18
2.5. Fitotoxinas.....	20
2.6. Estratégias de manejo da sarna da batata.....	24
3. OBJETIVO GERAL	27
3.1. Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Linhagens e meio de cultivo.....	28
4.2. Teste de patogenicidade em discos de tubérculos de batata das cultivares comerciais Ágata, Asterix, Atlantic, Challenger e Markies.	29
4.3. Extração de DNA cromossômico	31
4.4. Amplificação do operon <i>txtAB</i> de linhagens de <i>Streptomyces</i> por PCR	32
4.5. Extração e preparação bruta da fitotoxina taxtomina A.....	33
4.6. Purificação e quantificação da fitotoxina taxtomina A	34
5. RESULTADOS	36
5.1. Testes de patogenicidade em tubérculos de batata em cultivares comerciais.....	36
5.2. Amplificação do operon <i>txtAB</i> ligado a patogenicidade de <i>Streptomyces</i> spp.	44
5.3. Quantificação de taxtomina A produzida por linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.	45
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A batata é uma cultura de grande importância econômica e um dos alimentos mais completos em termos nutricionais, representando o terceiro principal cultivo, após o arroz e trigo (AGRIANUAL, 2016). Devido às suas características nutricionais, a batata é um dos vegetais mais importantes na dieta de muitos países e, além disso, é um alimento de fácil cultivo com alto rendimento por área, quando comparada a outros alimentos e com demanda crescente da sua produção (FAO, 2016).

No Brasil, a produtividade da batata está aumentando, porém, a mesma ainda é considerada baixa devido às pragas e doenças que afetam a cultura. Dentre as doenças bacterianas, a sarna da batata, causada por diferentes espécies de *Streptomyces*, é uma das mais comuns e economicamente importante (HOOKER, 1981). Essa doença já foi relatada em grande parte das áreas produtoras de batata no mundo e no país e tem por característica a depreciação do produto devido à formação de lesões nos tubérculos, tanto superficiais quanto profundas. Por muitos anos a sarna da batata foi considerada uma doença sem importância no Brasil, mas recentemente esse quadro mudou (Natalino Shimoyama, gerente geral da Associação Brasileira da Batata – ABBA*). As perdas econômicas causadas por esta afetam diversos setores, não só o mercado de produto fresco, mas também a produção de batata semente e batata processada (batata frita e tipo chips) (WANNER; KIRK, 2015; CORRÊA, 2011).

A principal espécie causadora da sarna da batata e amplamente distribuída no mundo é *Streptomyces scabiei* (LAMBERT; LORIA, 1989a), entretanto, outras espécies associadas a essa doença também já foram descritas. Embora existam diferentes espécies de bactérias deste gênero que causam sintomas semelhantes, um dos principais fatores responsáveis pela sua patogenicidade é a produção da toxina denominada taxtomina A (STEWART; GLOBIG, 2011).

Comunicação pessoal

Essa fitotoxina é considerada o metabólito chave para a patogenicidade de linhagens de *Streptomyces* spp., sendo responsável pelos sintomas característicos da sarna comum (AITTAMAA et al., 2010; DEES; WANNER, 2012; LORIA et al., 2008; LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Ao longo dos anos, trabalhos utilizaram a seleção *in vitro* de genótipos de plantas resistentes a doenças e algumas destas utilizaram fitotoxinas na seleção destas plantas resistentes. Agora com o avanço da biotecnologia na utilização de compostos fitotóxicos, o auxílio desse composto na seleção de plantas resistentes ao patógeno se tornou uma direção interessante para estudos, uma vez que a resistência varietal também representa uma das principais formas de controle de doenças proporcionando redução no uso de defensivos e o conseqüente aumento de lucro para o produtor (DAUB, 1986; DURBIN, 1981; HENSEL; HOLDEN, 1996; WALTON, 1996; HUANG, 2001; WENZEL, 1985).

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação da agressividade de linhagens de *Streptomyces* spp. frente a diferentes cultivares de batata e a quantificação da taxtomina A produzida por essas linhagens.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dados de Produção da Cultura da Batata

A produção mundial de batata está em crescente aumento e segundo dados da FAO, a produção de batata em 2016 foi cerca de 376 milhões de toneladas, sendo que os maiores produtores foram a China, Índia, Rússia e Ucrânia. O Brasil, considerado o segundo maior produtor da América Latina, foi responsável por 1% da produção mundial com produção de 3,85 milhões toneladas de batata, em uma área de cerca de 131 mil ha, com rendimento de 29,31 t/há (FAO, 2018).

. Os principais estados produtores foram Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul (IBGE, 2016). As cultivares mais plantadas no país atualmente são importadas, sendo estas, Ágata, Monalisa, Asterix, Atlantic, Cupido e Mondial (FAO, 2008).

Os problemas fitossanitários presentes na cultura em nosso país são de grande importância, causando perdas diretas significativas e aumento nos custos de produção já que esta cultura é suscetível a diversas pragas e doenças causadas por insetos, nematóides, vírus, fungos e bactérias (FIERS et al., 2012).

Estimativas realizadas pela Associação Brasileira de Batata indicam que a cultura da batata sofre perdas por descarte e problemas fitossanitários que correspondem a aproximadamente 10% da produção (SHIMOYAMA, 2014). Uma parcela dessas perdas pode ser devido à doenças como a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e canela preta (*Pectobacterium* spp.) na safra das águas, enquanto que na safra da seca e de inverno destaca-se a sarna comum (*Streptomyces scabiei*), que afeta principalmente os tubérculos (ZAMBOLIM et al., 2009).

2.2. Espécies do gênero *Streptomyces* e Sarna da batata

Atualmente, o gênero *Streptomyces* está composto por 820 espécies (PARTE, 2018), sendo que a maioria é considerada saprófita que vive no solo. Essas espécies produzem enzimas responsáveis pela degradação de polímeros derivados de plantas, sendo esses a celulose, lignina e quitina (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Esse gênero produz também metabolitos secundários como antibióticos, antitumorais e antifúngicos, sendo que, do ponto de vista do microrganismo, é um modo de adaptação para competição no solo (HOPWOOD, 2007; CUNHA et al., 2009; EVANGELISTA-MARTÍNEZ; MORENO-ENRÍQUEZ, 2007).

Bactérias pertencentes a esse gênero são Gram positivas, possuem estrutura filamentosa e esporos, uma alta proporção de citosina e guanina no DNA e em sua maioria um único cromossomo linear (LIN et al., 1993). Essas bactérias filamentosas secretam enzimas que degradam o substrato orgânico para assimilar os nutrientes, promovendo o crescimento da colônia. As hifas aéreas começam a se desenvolver na falta de nutrientes e outros fatores ambientais, fazendo com que se fragmentem formando as cadeias de esporos. Os esporos são resistentes à dessecação e podem ser levados pela água ou por animais presentes no solo (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

A espécie *S. scabiei* é a mais relata no mundo causando a sarna comum, mas outras espécies como *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. caviscabies* também podem incitar sintomas da doença. Estas espécies diferenciam-se entre si por critérios morfológicos, fisiológicos e genéticos (FAUCHER et al., 1995; TAKEUCHI et al., 1996; MIYAJIMA et al., 1998).

A espécie *S. scabiei* produz esporos de coloração cinza, em forma de barril, arranjados em cadeia formando um espiral; produz melanina, utiliza todos os açúcares empregados na caracterização de espécies de *Streptomyces*, conforme recomendado pelo Projeto Internacional de *Streptomyces* (ISP) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Essa espécie bacteriana é encontrada em solos secos, neutros a alcalinos e não se desenvolve em pH abaixo de 5 (LAMBERT; LORIA, 1989a; WATERER, 2002).

A espécie *S. acidiscabies* causadora da sarna em solos ácidos, diferencia-se morfológicamente de *S. scabies* pela produção de esporos de coloração esbranquiçada a avermelhada formados em cadeias flexuosas e pela não produção do pigmento melanina. Essa espécie não é capaz de utilizar rafinose como única fonte de carbono e consegue se desenvolver em meio de cultivo em pH 4,0 (LAMBERT; LORIA, 1989b).

A espécie *S. turgidiscabies*, descrita no Japão, produz esporos em cadeia flexuosa de coloração cinza; não produz melanina ou outro pigmento difusível e apresenta baixa similaridade ao nível de DNA com as outras espécies causadoras da sarna comum (MIYAJIMA et al., 1998; KIM et al., 1998).

Streptomyces caviscabies causadora de lesões aprofundadas, diferencia-se de *S. turgidiscabies* por apresentar os esporos de coloração dourada e também pela baixa similaridade em nível de DNA (GOYER et al., 1996).

Outras espécies como *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. niveiscabiei* (PARK et al., 2003) foram descritas na Coreia causando lesões erupcentes em batatas cultivadas em solos ácidos. Além disso, são citadas as espécies *S. reticuliscabiei*, causadora da sarna reticulada (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000); *S. aureofaciens* e *S. griseus* causadoras da sarna avermelhada (FAUCHER et al., 1993); *S. setonii* (MILLARD; BURR, 1926; LIU et al., 2005) que eventualmente podem causar doenças em batata, *S. sampsonii*, considerada saprófita, mas que já foi isolada de lesões de sarna (LAMBERT; LORIA, 1989a) e *S. ipomoeae* que causa a sarna da batata-doce (LABEDA; LYONS, 1992).

A sarna da batata é uma doença bacteriana complexa com diversidade de sintomas e de agentes causais. A severidade da sarna da batata e a ocorrência dos sintomas podem variar de acordo com o ambiente, suscetibilidade da cultivar e agressividade do patógeno (LORANG et al., 1995; TOTH et al., 2001). É caracterizada por lesões que podem tomar toda a superfície do tubérculo acarretando diminuição do seu valor comercial ou até mesmo impedindo a sua comercialização. Os tecidos afetados variam a coloração de castanho claro ao marrom (HOOKER, 1981). As lesões podem ser caracterizadas sendo

tipicamente arredondadas com uma textura áspera e corticosa e variam em profundidade e coloração, de pardo-clara a pardo-escura (LORIA et al., 1997).

A doença já foi relatada em todos os continentes do mundo, sendo considerada a quarta doença mais importante da batata na América do Norte (SLACK, 1991). Porém, 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 cultivo (CORRÊA, 2011).

2.3. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.

O ciclo de vida de *Streptomyces* é iniciado a partir das hifas aéreas que se diferenciam formando cadeias de esporos uninucleados e resistentes a dessecação. Esses esporos germinam e formam micélios ramificados multinucleados, podendo ser carregados pela água ou por nematóides e artrópodes presentes no solo. A rede de filamentos secreta enzimas que degradam o substrato orgânico quebrando-o em nutrientes assimiláveis que promovem, assim, o crescimento da colônia (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Quando existe falta de nutrientes e outros fatores ambientais, hifas aéreas são desenvolvidas e fragmentam-se formando cadeias de esporos. A cadeia de esporos de *Streptomyces* pode apresentar diferentes formatos e os esporos de diferentes colorações, sendo essas características taxonômicas importantes para identificação do patógeno (Figura 1) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

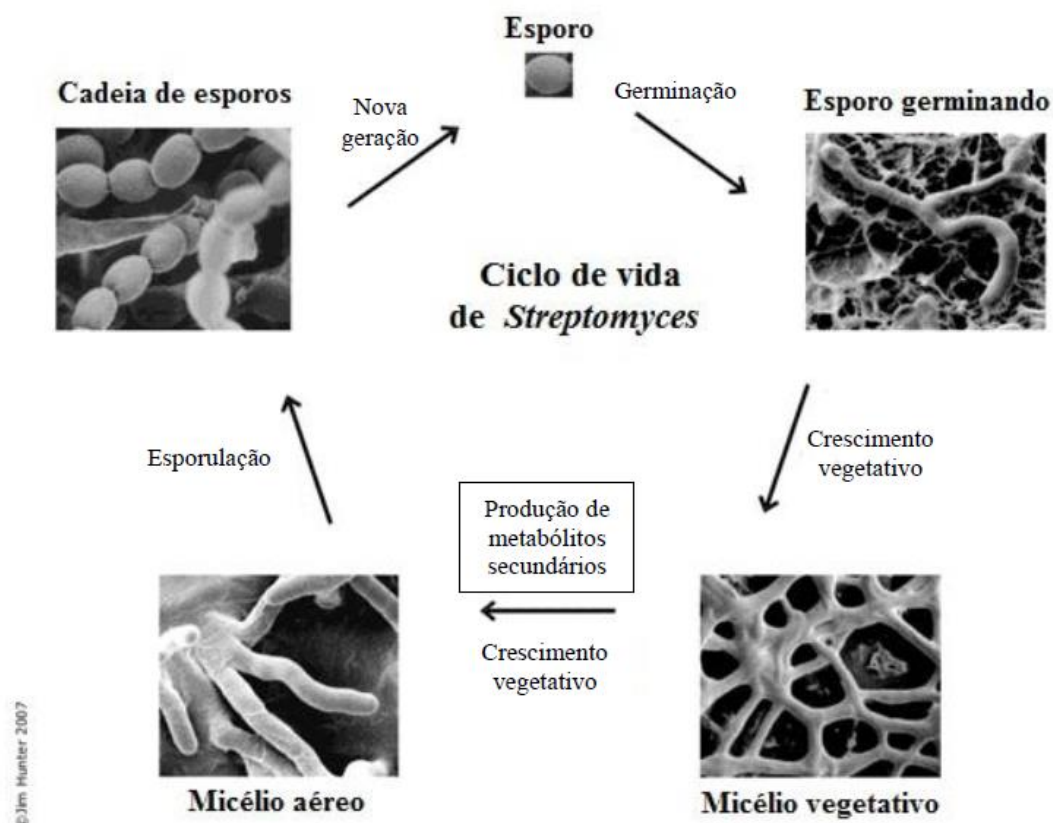


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*.

Fonte: <http://Streptomyces.openwetware.org>, traduzido por Corrêa (2011).

Os esporos são células resistentes a dessecação e a temperaturas levemente elevadas. Sua função no ciclo de vida é ajudar na dispersão do organismo e permitir que passe por períodos de falta de nutrientes, dessecação e eventuais temperaturas elevadas no solo (DWORKIN, 2006).

Os esporos de *Streptomyces* normalmente são disseminados pela água de chuva se movendo pela superfície de solos contaminados e penetram no hospedeiro através de estruturas como lenticelas, estômatos ou ferimentos (AGRIOS, 2005). Os ferimentos em que os patógenos penetram são produzidos durante a fase de crescimento dos tubérculos, que normalmente estão em solos secos (LEWIS, 1971). No início da tuberização, o tecido tem um crescimento contínuo, onde os nódulos são separados devido ao alargamento dos internódios (ADAMS, 1975). Por isso, nesse período ocorre a maior suscetibilidade do

tubérculo à infecção por *Streptomyces*, já que as lenticelas não estão totalmente suberizadas, tornam menos resistentes à infecção (ADAMS; LAPWOOD, 1978).

Assim que ocorre a penetração do patógeno no tubérculo, acontece a colonização nos espaços intercelulares e, logo após os intracelulares (ADAMS; LAPWOOD, 1978). A bactéria cresce entre as camadas da periderme, nutrindo-se do tecido morto (AGRIOS, 2005) e produz fitotoxinas que induzem a produção de suberina nas células adjacentes e levam à formação de uma camada corticosa ao redor do tecido infectado. Quando esse processo se intensifica, empurra a periderme infectada para o exterior tornando a superfície áspera e suberificada (BABCOCK; ECKWALL; SCHOTTEL, 1993). Este ciclo ocorre muitas vezes durante o crescimento do tubérculo, aumentando o tamanho da lesão. Assim quanto mais cedo o tubérculo for infectado, maior será a extensão da lesão (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

2.4. Patogenicidade em *Streptomyces* spp.

Em geral as plantas se defendem de patógenos utilizando substâncias químicas e barreiras estruturais, impedindo-o de entrar em seus tecidos e produzindo substâncias tóxicas ou criando condições que impeçam o seu crescimento (AGRIOS, 2005).

Mesmo que as bactérias do gênero *Streptomyces* tenham grande diversidade de características morfológicas, fisiológicas e genéticas, os genes responsáveis pela patogenicidade e virulência são compartilhados por algumas espécies causadoras da sarna comum, em uma região do cromossomo denominada ilha de patogenicidade (Figura 2) (WANNER, 2006).

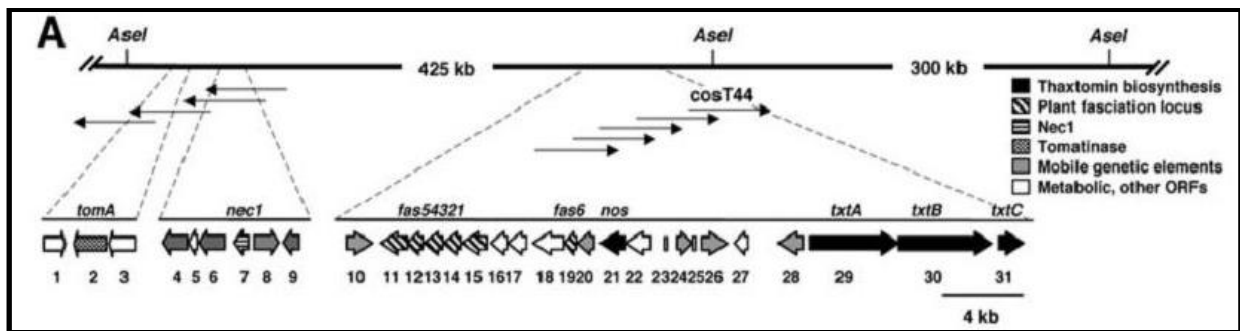


Figura 2. Ilha de patogenicidade de algumas espécies de *Streptomyces*. Modificado de Kers e colaboradores (2005).

A ilha de patogenicidade é uma classe de ilhas genômicas adquiridas através de transferência horizontal, possuindo diferentes genes que contribuem para a virulência das espécies. Essa ilha de patogenicidade pode ser transmitida durante o processo de conjugação e inserir-se em sítios específicos no cromossomo linear de espécies receptoras levando ao surgimento de novas espécies patogênicas. A transmissão desses genes explica a natureza polifilética de espécies causadoras da sarna da batata, conferindo a característica de patogenicidade em espécies consideradas não patogênicas (KERS et al., 2005; LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

A ilha de patogenicidade de *Streptomyces* contém genes como *tomA* que codifica a proteína tomatinase, *nec1* que codifica a proteína Nec1 e ainda, outros genes denominados *txtAB*, *txtC*, *txtE*, *txtR*, relacionados com a síntese da fitotoxina taxtomina A (AITTAMAA et al., 2010; LERAT; SIMAO-BEAUNOIR; BEAULIEU, 2009).

A patogenicidade de *Streptomyces* requer a ligação ao hospedeiro, penetração, colonização e evasão do sistema de defesa da planta. Para isso, a fitotoxina taxtomina afeta a biossíntese de celulose, que compromete a integridade da parede celular, causando a hipertrofia e morte da célula; já a proteína Nec1 e a tomatinase auxiliam na evasão da defesa do hospedeiro (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Os genes que codificam as enzimas tomatinase são tipicamente encontrados em patógenos fúngicos de plantas de tomate, como *Septoria lycopersici* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A tomatinase pertence a uma

classe de enzimas denominadas saponinases, funcionando como glicosil hidrolases que detoxificam fitoanticipinas, que são moléculas antimicrobianas pré-formadas produzidas pelas plantas. A tomatinase detoxifica a tomatoanticipina α -tomatina esteroide por hidrólise de um ou mais resíduos de açúcar que são essenciais para a atividade da α -tomatina (SEIPKE; LORIA, 2008).

O gene *nec1* codifica a proteína necrogênica Nec1, que é secretada e representa um importante fator de virulência independente associado à colonização e supressão da resposta de defesa da planta. Esse gene é conservado entre a maioria de *Streptomyces* spp. causadoras da sarna e está ausente em formas não patogênicas. (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998; JOSHI et al., 2007).

Algumas espécies de *Streptomyces* não produzem a fitotoxina taxtomina, nem a proteína Nec1, mas causam sintomas de sarna comum. Além disso, nessas espécies não foram identificados os genes da ilha de patogenicidade, ou seja, provavelmente estas utilizam outras vias ainda não estudadas (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

2.5. Fitotoxinas

As fitotoxinas são moléculas de baixa massa molecular e ativas em baixas concentrações fisiológicas e interferem em metabolismos importantes na planta, podendo causar sintomas de doenças. Diversas fitotoxinas bacterianas tem sido caracterizadas bioquímica e geneticamente e estão envolvidas na agressividade dos patógenos (GOODMAN; KIRALY; WOOD, 1986; AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2018).

A resistência das plantas às doenças é expressa como tolerância ou insensibilidade às toxinas produzidas pelo patógeno. Algumas fitotoxinas são capazes de ativar vias metabólicas que levam à síntese de substâncias envolvidas na defesa de plantas, como as fitoalexinas. As fitotoxinas também podem causar morte localizada de células vegetais e respostas de hipersensibilidade do hospedeiro podendo restringir o crescimento do patógeno.

Em outros casos, as toxinas também atuam como supressores da resistência induzida (GRANITI, 1991).

Os primeiros metabólitos secundários fitotóxicos associados à patogenicidade de *Streptomyces* foram relatados em 1989 por King e colaboradores, que descreveram o isolamento da fitotoxina taxtomina associada à doença da sarna comum. A taxtomina A está diretamente relacionada com a patogenicidade de *Streptomyces*, tendo a sua estrutura definida e caracterizada como uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina, um dipeptídeo, derivado da fenilalanina e triptofano com radical nitrato (KING et al., 1989).

A biossíntese dos compostos da taxtomina envolve sintetases peptídicas não ribossômicas conservadas (NRPS) codificadas pelos genes *TxtA* e *TxtB*. Esses genes, *TxtA* e *TxtB* (Figura 3), são responsáveis pela produção do dipeptídeo cíclico N-metilado da toxina. A enzima P450 monoxigenase, codificada pelo gene *TxtC*, é necessária para as etapas de hidroxilação (HEALY et al., 2002). O sequenciamento de genes próximos ao *TxtA* e *TxtB* revelou a presença de um gene com alta similaridade de sequência que expressa as sintases de óxido nítrico (NOSs) de mamíferos, sugerindo uma hipótese para o mecanismo de nitração na taxtomina em *Streptomyces* spp. produtoras dessa toxina, sendo uma etapa importante na sua produção (KERS et al., 2005).

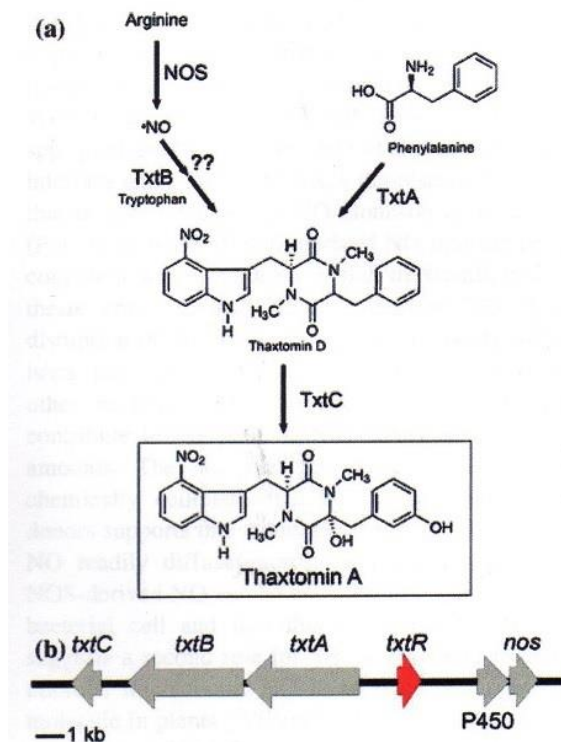


Figura 3. (A) via biossintética da taxtomina A; (B) supostos genes envolvidos na biossintese da taxtomina A. Fonte: Loria et al. (2008).

O gene *TxtR* é conservado em espécies produtoras de taxtomina e está envolvido na biossintese da taxtomina (JOSHI et al., 2007). Uma vez que a proteína decodificada por esse gene liga especificamente a celobiose, pode-se concluir que a celobiose é um ligante para este regulador e é responsável pela indução da produção de taxtomina. Estudos indicaram que a celotriose também é ativa na indução da produção de taxtomina (JOHNSON et al., 2007; WACH et al., 2007).

A taxtomina age na membrana plasmática de células vegetais, provocando alterações na permeabilidade seletiva e interferindo na deposição de celulose, comprometendo a integridade da parede celular. A estrutura da parede celular comprometida combinada com a estrutura filamentosa dos *Streptomyces*, permite a penetração do patógeno nos tecidos em expansão, ocupando os espaços intracelulares e intercelulares. Além disso, a taxtomina estimula a liberação de outras subunidades da celulose gerando um feedback positivo para estimular sua produção (LORIA et al., 2008).

Com relação a atividade biológica da taxtomina A, após a penetração, a bactéria cresce entre as camadas da periderme, nutrindo-se do tecido morto, e o micélio se desenvolve nas áreas mais velhas das lesões. Enquanto se multiplica, a bactéria secreta a taxtomina, que promove uma rápida divisão celular no hospedeiro e a produção de suberina nas células adjacentes ao tecido lesionado, induzindo à formação de várias camadas corticosas de tecido suberificado no ponto de infecção (BABCOCK; ECKWALL; SCHOTTEL, 1993). Este processo determina a morte do tecido ao redor da lesão, do qual a bactéria se alimenta (AGRIOS, 2005).

Os efeitos da taxtomina no crescimento ativo do tecido vegetal, incluindo a expansão das células e a inibição da citocinese e nanismo, sugeriram que a toxina estava direta ou indiretamente afetando a biossíntese da parede celular vegetal (FRY; LORIA, 2002). Como a taxtomina reduziu a incorporação de ^{14}C -glicose na fração celulósica da parede celular da planta *Arabidopsis thaliana*, foi sugerido que esta toxina suprimia a biossíntese de celulose cristalina (SCHEIBLE et al. 2003).

A presença de taxtomina também mostrou desencadear mecanismos de defesa da planta. Uma resposta precoce da planta a taxtomina A em *Arabidopsis thaliana* é o influxo de Ca^{2+} . O cálcio é um mensageiro chave na reação de plantas infectadas por patógenos. Em células de cultura de *A. thaliana*, a resposta da planta mediada por cálcio à taxtomina A, leva à morte celular programada (DUVAL et al., 2005; ERRAKHI et al., 2008; TEGG et al., 2005).

A associação da produção de taxtomina entre espécies de *Streptomyces* causadoras da sarna isoladas de diferentes regiões geográficas, a relação quantitativa entre a produção da toxina e a virulência, e a ausência de produção da toxina por espécies saprófitas de *Streptomyces* suportam a hipótese de que a taxtomina é um determinante da patogenicidade de *Streptomyces* em tubérculos de batata (KING et al., 1989; KINKEL et al., 1998; BUKHALID et al., 2002).

Nesse sentido, estudos que visam investigar a correlação entre severidade da doença e a produção da taxtomina A, tornam-se de extrema

importância para que diferentes cultivares de batata possam ser testados antes de irem para plantio no campo.

2.6. Estratégias de manejo da sarna da batata

A sarna da batata é uma doença com diversos fatores que afetam seu desenvolvimento, e devido a essa complexidade, não é possível controlar a doença aplicando apenas um método específico. Para que a incidência da sarna seja reduzida, é necessária a utilização de vários métodos de controle em conjunto (DIPPENAAR, 1933).

Na agricultura, o controle químico de pragas é o método mais utilizado e consiste no uso de aplicações de qualquer produto de natureza química. Na cultura da batata, o controle químico é direcionado ao controle do patógeno em tubérculos sementes para que limite a infestação do solo, além da redução do inóculo em solos previamente infectados (GOUWS, 2006; WILSON et al., 1999).

Outro método de controle é a irrigação tendo influência direta na suscetibilidade do tubérculo. A umidade adequada do solo é necessária para o desenvolvimento de lenticelas, onde estômatos suscetíveis rapidamente se desenvolvem em lenticelas resistentes. Além disso, existem efeitos diretos no crescimento de patógenos devido a queda de temperatura do solo e a redução da disponibilidade do oxigênio (LABRUYERE, 1971; ADAMS, 1975; LEWIS, 1971).

O pH do solo é um parâmetro utilizado para se detectar a sarna, pois a doença se desenvolve gradativamente conforme o pH aumenta de 5,0 até 8,0. Mantendo-se o pH do solo entre 5,0 e 5,2 pode-se reduzir a incidência da sarna, porém, esse solo estará sujeito a infestação por *Streptomyces acidiscabies*, além de agravar outras doenças causadas por fungos fitopatogênicos e resultar na redução da disponibilidade de nutrientes importantes para a planta (GOTO, 1985; ALEXANDER, 1961; BRADY, 1974).

As bactérias do gênero *Streptomyces* podem sobreviver no solo por longos períodos, por isso, o método de rotação de culturas tem papel importante no manejo integrado da sarna da batata. Plantar culturas como centeio, trigo, feijão caupi e milho-pérola podem reduzir a ocorrência da sarna comum. A

rotação também pode aumentar a concentração de nitrato do solo, que ajuda a reduzir o inóculo do patógeno (PEMBERTON, 1994; OSWALD; LORENZ, 1956; MCGREGOR; WILSON, 1964; MILLARD, 1923).

O controle biológico é outra forma explorada como uma estratégia de manejo para a redução da incidência da sarna com o uso de agentes antagonistas. Esses métodos oferecem meios alternativos aos dos defensivos agrícolas que além de custos elevados, prejudicam a saúde do produtor e o meio ambiente. O controle biológico tem grande importância no manejo de doenças, sendo que atua onde outros métodos tem resultados limitados (BETTIOL; MORANDI, 2009; COMPARONI, 2015; CHEN et al., 2017).

O uso de cultivares resistentes é considerado a melhor estratégia de manejo da sarna. Há uma grande variação do caráter genético entre as cultivares, sendo poucas aquelas consideradas completamente resistentes. Esta situação não é diferente no Brasil, onde as cultivares de batata mais plantadas são suscetíveis à doença (NIEDERHEITMANN, 2016).

Existe pouca informação a respeito de genótipos de batata mais plantados no Brasil (FISCHER et al., 2005; GARCIA, 2008). Uma das principais cultivares utilizadas são Ágata, Asterix e Atlantic, que representam em torno de 60%, 15% e 3% da produção brasileira, respectivamente, sendo consideradas suscetíveis à sarna comum, de acordo com observações da severidade da doença nos campos de produção (IMARK, 2007; GARCIA, 2008; FISCHER et al., 2009; HAYNES et al., 2010; NAVARRO, 2012).

Um modelo genético para explicar a resistência à doença ainda não foi desenvolvido, mas o padrão de distribuição contínua sugere que a resistência é um caráter de herança quantitativa, sendo fortemente influenciado pelo ambiente e heterogeneidade do solo. Conseqüentemente, tem-se observado pouco progresso no desenvolvimento de um sistema baseado em marcadores moleculares para essa característica (DRISCOLL et al., 2009; HAYNES et al., 2010).

Pesquisas têm buscado fontes de resistência já existentes, utilizando métodos que diferenciem o grau de resistência entre clones, com o objetivo de

acumular vários dos atributos positivos, de forma a detectar pequenas diferenças de origem genética e obter novas cultivares mais resistentes em relação às já existentes. As características agronômicas desejáveis têm herança quantitativa e são controladas por muitos genes de pequeno efeito. No entanto, o progresso do melhoramento genético de muitas delas tem sido constante, mesmo que lento (NIEDERHEITMANN, 2016).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a agressividade cultivares de batata à *Streptomyces* e quantificar a fitotoxina taxtomina A produzida por diferentes espécies do gênero.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a agressividade de diferentes linhagens de *Streptomyces* spp. e a suscetibilidade das cultivares de batata Ágata, Asterix, Atlantic, Challenger e Markies por meio de testes de patogenicidade em minitubérculos;
- Verificar a presença do operon *txtAB* em linhagens de *Streptomyces* spp. por meio de amplificação por PCR com *primers* específicos;
- Extrair, purificar e quantificar a fitotoxina taxtomina A de 30 diferentes linhagens de *Streptomyces* spp. por meio de experimentos de cromatografia de camada delgada (TLC).
- Verificar se existe correlação entre a quantidade de taxtomina A produzida e a agressividade do patógeno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens e meio de cultivo

As linhagens utilizadas neste estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP. Trinta linhagens foram analisadas, sendo 18 pertencentes à espécie *S. scabiei*, 4 à *S. europaeiscabiei*, 3 à *S. ipomoeae*, 4 à *S. caviscabiei* e uma *Streptomyces* sp. (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de *Streptomyces* spp. utilizadas neste estudo

Espécie	IBSBF*	Procedência	Cultivar/Hospedeiro
	1774	Desconhecida	Desconhecida
	1884	Capão Bonito (SP)	Ágata
	1886	Ibicoara (BA)	Monalisa
	1936	Itapeva (SP)	Monalisa
	2124	Bueno Brandão (MG)	Monalisa
	2147	Ibicoara (BA)	Ágata
	2203	Tambaú (SP)	Ágata
	2204	Tambaú (SP)	Monalisa
<i>S. scabiei</i>	2228	Ibicoara (BA)	Ágata
	2239	Ibicoara (BA)	Ágata
	2242	Ipuiuna (MG)	Cupido
	2250	Ibicoara (BA)	Mondial
	2298	São Gotardo (MG)	Ágata
	2359	Cristalina (GO)	<i>Beta vulgaris</i>
	2809	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
	2860	Irineópolis (SC)	Ágata
	2950	Canoinhas (SC)	Asterix
	2501	Piedade (SP)	Monalisa
<i>S. europaeiscabiei</i>	1945	Holanda	Vivaldi
	2474	Holanda	Cupido
	2498	Holanda	Ágata
	2510	Holanda	Carreira
<i>S. ipomoeae</i>	2401	Santa Juliana (MG)	Ágata
	2431	Tapira (PR)	Atlantic
	2468	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
<i>S. caviscabies</i>	2260	Mucugê (BA)	Ágata
	2391	Cristalina (GO)	Cupido
	2398	Cristalina (GO)	Ágata
	2400	Itapetininga (SP)	Mondial
<i>Streptomyces</i> sp.	2507	Ibicoara (BA)	Ágata

*IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil).

As linhagens foram cultivadas em meio YME (extrato de levedo 4 g, extrato de malte 10 g, glicose 4 g, ágar 18 g, água destilada q.s.p. 1000 mL; pH 7,2) e incubadas a 28° C, por aproximadamente sete dias, no escuro.

4.2. Testes de patogenicidade em fatias de tubérculos de batata das cultivares comerciais Ágata, Asterix, Atlantic, Challenger e Markies

A suscetibilidade das cultivares de batata Agata, Asterix, Atlantic, Challenger e Markies foi avaliada em experimentos de testes de patogenicidade em fatias de tubérculos, cedidos pela Associação Brasileira da Batata (ABBA) e pela empresa Irish Potato Marketing Ltda (IPM).

Os tubérculos de batata tipo III (30 a 40 mm) receberam o seguinte tratamento: desinfestação superficial com NaOCl 0,5% por 15 min, sob agitação; lavagem em água destilada esterilizada, por 15 min, também sob agitação, para a retirada da solução de hipoclorito da superfície do tubérculo. Após esse processo, os tubérculos foram secos a temperatura ambiente, cortados em cilindros de 2 cm de diâmetro com o auxílio de um cortador de rolhas e, posteriormente, em fatias com cerca de 0,25 cm de espessura com bisturi.

As linhagens de *Streptomyces* testadas foram cultivadas em meio de aveia *Oatmeal Broth* (OMB) acrescido de ágar (LORIA et al., 1995), durante sete dias, a 28 °C. Após o crescimento e esporulação, discos do meio de cultivo com a bactéria (aproximadamente 5 mm de diâmetro) foram recortados e invertidos sobre as fatias dos tubérculos de batata. Foram utilizadas quatro fatias por tratamento, colocados em placas de Petri revestidas com papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. As placas foram incubadas a 28°C em estufa bacteriológica e os sintomas de necrose foram avaliados após dez dias da inoculação. Como controles negativos foram utilizados discos de meio de cultura sem inóculo, invertidos sobre os tubérculos (LORIA et al., 1995, com adaptações). Foram efetuadas 12 repetições (três placas contendo quatro fatias de batata) para cada cultivar testada.

De acordo com a capacidade de causar necrose e sua intensidade, no décimo dia, as linhagens foram classificadas como não patogênicas (-), que não foram capazes de causar necrose em fatias de batata; e patogênicas, causadoras de necrose (Figura 4). As linhagens patogênicas foram, ainda, classificadas em diferentes graus de agressividade de acordo com a área de necrose causada. As linhagens que resultaram em necrose com área de até 13 mm² foram consideradas como pouco agressiva (+), com área de 13,1 até 24 mm², medianamente agressiva (++) , com área de 24,1 até 44 mm², muito agressiva (+++) e finalmente, com uma área maior do que 44 mm² a linhagem foi considerada altamente agressiva (++++) (Figura 5).

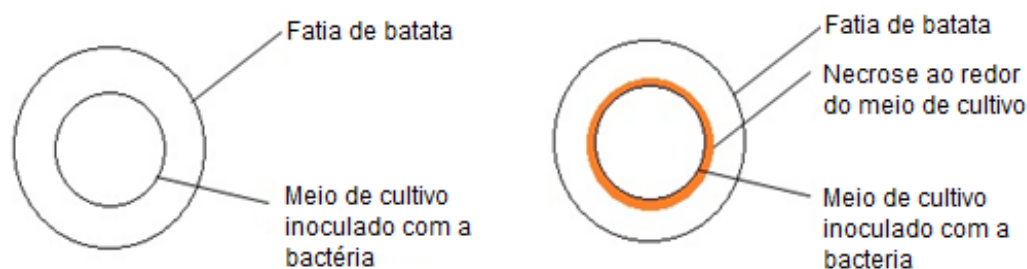


Figura 4. Esquema da avaliação do teste de patogenicidade de linhagens de *Streptomyces*. **(A)** Exemplo de linhagem não patogênica (-); **(B)** necrose causada por linhagem patogênica. A largura da faixa de necrose utilizada na classificação em diferentes graus de agressividade.

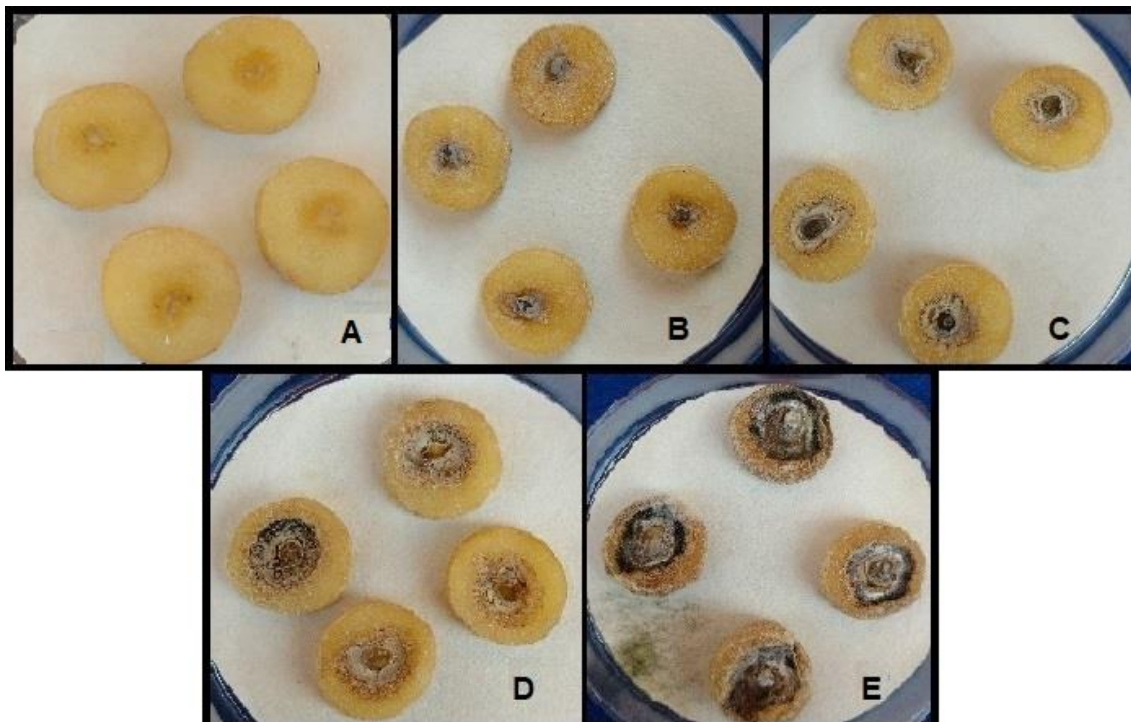


Figura 5. Teste de patogenicidade de linhagens de *Streptomyces* em minitubérculos de batata da cultivar Ágata. (A) Controle negativo; (B) considerada pouco agressiva (+); (C) medianamente agressiva (++); (D) muito agressiva (+++); e (E) Altamente agressiva (++++).

Para a avaliação da necrose causada nas fatias de batata, foi medido o diâmetro da lesão em dois pontos distintos e calculado a média desses valores. A partir deste dado, foi aplicada a forma do cálculo de área da circunferência ($A = \pi \cdot r^2$). Além disso, para realização do teste estatístico de Tuckey foi utilizado o software SASM-Agri (CANTERI et al. 2001).

4.3 Extração de DNA cromossômico

As linhagens de *Streptomyces* spp. selecionadas para a análise de taxtomina A foram submetidas à extração de DNA, de acordo com a metodologia descrita por Pitcher; Saunders; Owen (1989), com algumas modificações.

Cerca de 100 mg de biomassa de bactéria, contida na placa com meio YME incubada 10 dias a 28°C, 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; sacarose 0,75 M). Posteriormente, foram adicionados 180 µL de SDS 10% e 90 µL de lisozima (20 mg/mL), misturados com a utilização de vortex e a mistura incubada a 37 °C por uma hora. Após, foram adicionados 100 µL de proteinase K (10 mg/mL), incubando-se a 55 °C durante duas horas. Em seguida, 1 mL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v) foi adicionado e após agitação manual vigorosa a mistura foi centrifugada a 14.500 g por 10 min 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 µL) e 2 volumes de etanol absoluto (cerca de 4 mL) com incubação a -20°C por aproximadamente 18 h. A seguir, a solução foi centrifugada a 14.500 g por 15 min e o sedimento lavado de duas a três vezes com etanol 70%, aplicando-se pulsos curtos de centrifugação. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois suspenso em 400 µL de tampão TE pH 8 (10 mM Tris; 1 mM EDTA). Foram adicionados 8 µL de RNase (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C por duas horas. Posteriormente, 80 µL de LiCl (4 M) e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi adicionado à solução (cerca de 500 µL). Após centrifugação 14.500 G por 10 min, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (cerca de 1 mL). Os sedimentos foram lavados duas vezes com etanol 70%, secos em temperatura ambiente, o DNA foi suspenso em 40 µL de TE pH 8 e estocado a 4 °C.

A pureza e a 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.

4.4. Amplificação do operon *txtAB* de linhagens de *Streptomyces* por PCR

A análise da presença do operon *txtAB*, relacionado à síntese da fitotoxina taxtomina A, foi realizada por PCR utilizando-se os *primers* específicos *TxtAB1*

(5' CCA CCA GGA CCT GCT CTTC 3') e *TxtAB2* (5' TCG AGT GGA CCT CAC AGA TG 3') (WANNER, 2006), com fragmento esperado de 385 pares de bases (pb).

Os experimentos de amplificação foram realizados preparando-se reações de 25 µL, contendo 200 ng de DNA cromossômico, 2,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 1X tampão da enzima; 1,5 mM de MgCl₂; 1X BSA (Bovine Serum Albumine) (10 mg/mL); 0,2 mM de uma mistura de dNTPs; 0,4 µM de cada *primer*, em termociclador MyCycler, Axygen. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial 95 °C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min; anelamento a 57 °C por 1 min; extensão a 72 °C por 2 min; e um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

4.5. Extração e preparação bruta da fitotoxina taxtomina A

Baseado em estudos realizados anteriormente (CORRÊA, 2011), 30 linhagens de *Streptomyces* spp. consideradas altamente agressivas, medianamente e pouco agressivas foram selecionadas para a realização dos testes produção e extração de taxtomina, com o intuito de se verificar se há correlação direta entre a produção da toxina e a agressividade do patógeno.

Para a produção e extração de taxtomina A, foi adotada a metodologia descrita por Kinkel e colaboradores (1998). Para se determinar a quantidade de taxtomina produzida, as linhagens foram cultivadas em meio de aveia sólido por 30 dias e após esse período, três discos de 10 mm foram recortados e colocados em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de aveia líquido (OMB) (LORIA, et al. 1995). Cada linhagem foi cultivada com sete repetições, sob agitação orbital (150 rpm) em temperatura de 28°C por 4 dias no escuro, quando o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel de filtro Whatmann n°1. De cada repetição, 15 mL do filtrado foi transferido para um funil de separação, onde se procedeu a extração da toxina com 25 mL de acetato de etila. A seguir, foi coletada a fração referente ao acetato de etila e o filtrado submetido novamente à extração em mais 25 mL do solvente. As duas fases de acetato de

etila, contendo a toxina, foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob temperatura ambiente. O pó resultante foi suspenso em 2 mL de metanol e armazenado à -20 °C para posterior realização dos experimentos (Figura 6).

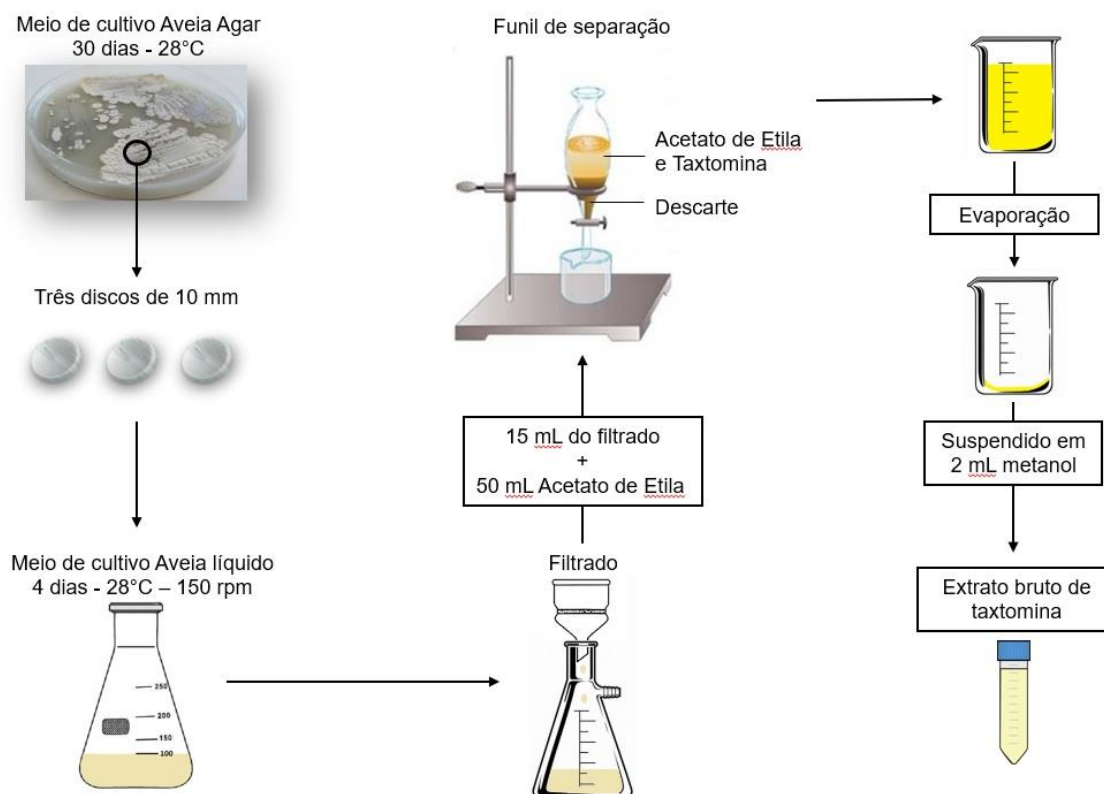


Figura 6. Método de produção e extração de taxtomina bruta utilizado.

Para cada linhagem desse estudo foram realizadas sete repetições da extração. Os sete extratos de cada linhagem foram medidos em espectrofotômetro a 400 nm, e a amostra que apresentou maior absorvância foi selecionada para o experimento de quantificação de taxtomina A por cromatografia de camada delgada (TLC) (Anexo 1).

4.6. Purificação e quantificação da fitotoxina taxtomina A

A taxtomina A foi identificada por cromatografia de camada delgada -TLC, de acordo com Goyer e colaboradores (1998) com base no coeficiente relativo de retenção - R_f ($R_f = \text{Retention factor}$) das amostras.

O extrato bruto proveniente das 30 linhagens de *Streptomyces* com maior absorvância em 400 nm foi aplicado em placas de TLC (*Thin layer chromatography*) utilizando micropipeta, sendo que de cada amostra, foram aplicados 100 µL do extrato na placa de sílica gel 60 com indicador para ultravioleta e espessura de 250 µm. O solvente utilizado foi clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 (v/v).

Com o auxílio de uma lâmina, foi raspada a região com a banda amarela correspondente a taxtomina A e suspendida em 1 mL de metanol. Para separação da amostra da sílica, a mesma foi centrifugada a 10.000 rpm em micro centrifuga por 3 min e recuperado o sobrenadante.

A quantidade de taxtomina produzida pelas linhagens foi avaliada a partir de leituras de absorvância efetuadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm. O cálculo da concentração da taxtomina A purificada foi obtido a partir do parâmetro: 0,525 de absorvância (400 nm) corresponde a aproximadamente 143 µg/mL da toxina, de acordo com Garcia (2008) e Pascholati, S. F. (ESALQ/USP*).

*Comunicação pessoal

5. RESULTADOS

5.1. Testes de patogenicidade em fatias de tubérculos de batata das cultivares comerciais Ágata, Asterix, Atlantic, Challenger e Markies

A agressividade das 30 linhagens de *Streptomyces* analisadas foi avaliada por meio de testes de patogenicidade em fatias de tubérculos das cultivares de batata. Nos testes realizados, todas as linhagens causaram sintomas com graus de agressividade variados nos tubérculos, que foram avaliados pela intensidade da necrose após dez dias da inoculação (Figura 7, Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6).

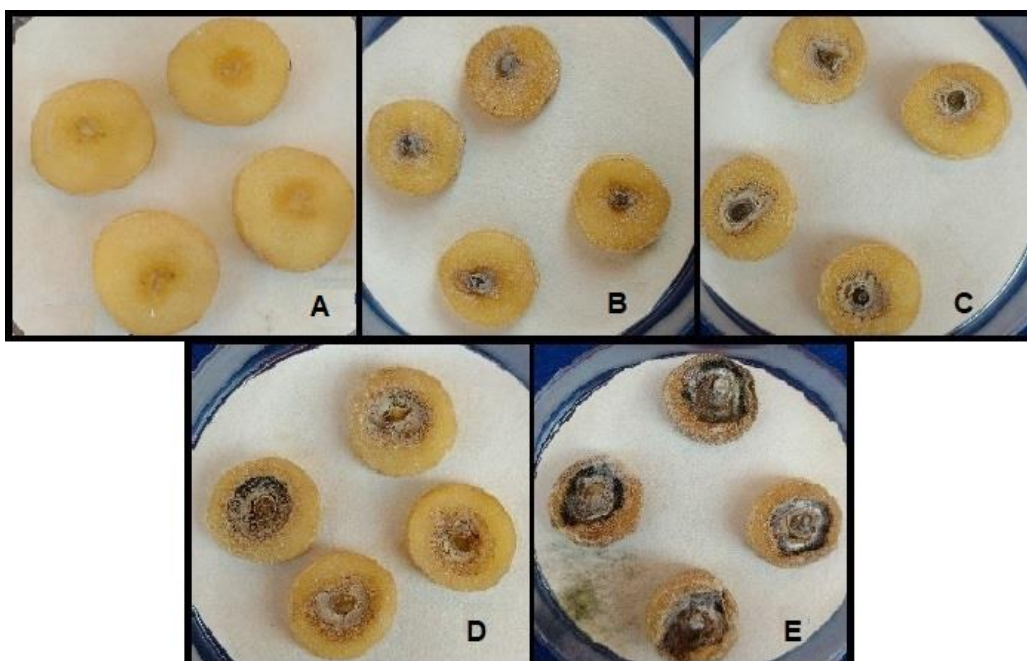


Figura 7. Teste de patogenicidade de linhagens de *Streptomyces* spp. em minitubérculos de batata da cultivar Ágata após 10 dias de inoculação. (A) Controle Negativo; *S. scabiei* (B) IBSBF 1886, considerada pouco agressiva (+); (C) IBSBF 2239, medianamente agressiva (++); *S. europaeiscabiei* (D) IBSBF 2498, muito agressiva (+++); (E) IBSBF 2498, altamente agressiva na cultivar Atlantic.

Tabela 2. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de *Streptomyces scabiei* em minitubérculos de batata.

Espécie	<i>Streptomyces scabiei</i>								
	IBSBF/ Cultivar	1774	1884	1886	1936	2124	2147	2203	2204
Ágata	14,6* b	18,9 c	12,4 b	14,2 b	12,3 b	11,2 cd	13,7 b	14,3 cd	14,5 c
Asterix	17,8 b**	14,8 c	10,9 b	11,7 b	14,3 b	14,5 bc	15,8 b	16,6 c	21,3 b
Challenger	47,4 a	57,6 a	21 a	11,5 b	14,1 b	16,6 b	14,9 b	21,4 b	20,9 b
Markies	25,4 b	42,8 b	21,6 a	10,9 b	14,0 b	7,4 d	16,3 b	12,3 d	14,0 c
Atlantic	22,4 b	41,9 b	25 a	35,5 a	42,8 a	44,5 a	56,5 a	31,6 a	38,7 a

*Média da área de necrose de discos de minitubérculos de batata com 12 repetições (mm²) após 10 dias da inoculação.

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade na comparação entre as cultivares no sentido vertical.

Tabela 3. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de *Streptomyces scabiei* em minitubérculos de batata.

Espécie	<i>Streptomyces scabiei</i>								
	IBSBF/ Cultivar	2239	2242	2250	2298	2359	2501	2809	2860
Ágata	18,1* c	14,0 c	16,3 c	8,6 b	16,1 d	22,3 b	42,6 b	18,6 b	29,1 b
Asterix	23,9 ab**	26,0 b	34,6 b	12,3 b	37,9 b	23,3 b	47,0 b	22,5 b	47,1 a
Challenger	21,9 abc	26,9 b	13,6 c	12,0 b	29,3 bc	25,2 b	53,6 ab	19,3 b	48,8 a
Markies	20,4 bc	16,0 c	63,4 a	13,4 b	21,0 cd	22,8 b	22,3 c	24,4 ab	21,4 b
Atlantic	26,1 a	41,1 a	34,8 b	22,3 a	49,8 a	34,9 a	70,8 a	30,1 a	57,9 a

* Média da área de necrose de discos de minitubérculos de batata com 12 repetições (mm²) após 10 dias da inoculação.

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade na comparação entre as cultivares no sentido vertical.

Tabela 4. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de *Streptomyces europaeiscabiei* e *Streptomyces ipomoeae* em minitubérculos de batata.

Espécie	<i>S. europaeiscabiei</i>				<i>S. ipomoeae</i>			
	IBSBF/ Cultivar	1945	2474	2498	2510	2401	2431	2468
Ágata		27,0 ab	11,8 b	30,0 c	14,5 ab	17,8 a	21,2 ab	9,7 bc
Asterix		31,6 a	14,7 ab	49,2 b	14,5 ab	8,8 b	15,0 c	13,8 b
Challenger		19,6 c	13,7 ab	46,1 b	11,8 b	7,3 b	13,2 c	9,4 c
Markies		23,9 bc	16,0 ab	58,5 a	18,0 a	7,8 b	17,6 bc	11,1 bc
Atlantic		22,8 bc	18,3 a	60,7 a	12,5 b	12,9 ab	25,6 a	33,2 a

* Média da área de necrose de discos de minitubérculos de batata com 12 repetições (mm²) após 10 dias da inoculação.

** Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade na comparação entre as cultivares.

Tabela 5. Área de necrose nos testes de patogenicidade de diferentes linhagens de *Streptomyces caviscabies* e *Streptomyces* sp. em minitubérculos de batata.

Espécie	<i>S. caviscabies</i>				<i>S. sp.</i>	
	IBSBF/ Cultivar	2260	2391	2398	2400	2507
Ágata		15,1 c	10,9 d	14,0 b	7,0 c	7,0 b
Asterix		17,8 bc	17,7 c	15,4 b	16,0 b	10,2 ab
Challenger		24,9 a	23,0 bc	15,8 b	15,4 b	10,7 a
Markies		21,7 ab	23,9 b	14,4 b	16,3 b	11,1 a
Atlantic		23,6 a	31,2 a	22,6 a	28,9 a	12,5 a

* Média da área de necrose de discos de minitubérculos de batata com 12 repetições (mm²) após 10 dias da inoculação.

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si significativamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade na comparação entre as cultivares no sentido vertical.

Tabela 6. Agressividade de linhagens de *Streptomyces* spp demonstrando a suscetibilidade de diferentes cultivares de batatas em testes de patogenicidade em minitubérculos

Espécie	IBSBF*	Procedência	Ágata	Asterix	Challenger	Markies	Atlantic
<i>S. scabiei</i>	1774	Desconhecida	++**	++	++++	+++	++
	1884	Capão Bonito (SP)	++	++	++++	+++	+++
	1886	Ibicoara (BA)	+	+	++	++	+++
	1936	Itapeva (SP)	++	+	+	+	+++
	2124	Bueno Brandão (MG)	+	++	++	++	+++
	2147	Ibicoara (BA)	+	++	++	+	++++
	2203	Tambaú (SP)	++	++	++	++	++++
	2204	Tambaú (SP)	++	++	++	++	+++
	2228	Ibicoara (BA)	++	++	++	++	+++
	2239	Ibicoara (BA)	++	++	++	++	+++
	2242	Ipuiuna (MG)	++	+++	+++	++	+++
	2250	Ibicoara (BA)	++	+++	++	++++	+++
	2298	São Gotardo (MG)	+	+	+	++	++
	2359	Cristalina (GO)	++	+++	+++	++	++++
	2501	Piedade (SP)	++	++	+++	++	+++
	2809	São Francisco de Paula (RS)	+++	++++	++++	++	++++
	2860	Irineópolis (SC)	++	++	++	+++	+++
	2950	Canoinhas (SC)	+++	++++	++++	++	++++
<i>S. europaeiscabiei</i>	1945	Holanda	+++	+++	++	++	++
	2474	Holanda	+	++	++	++	++
	2498	Holanda	+++	++++	++++	++++	++++
	2510	Holanda	++	++	+	++	+
<i>S. ipomoeae</i>	2401	Santa Juliana (MG)	++	+	+	+	+
	2431	Tapira (PR)	++	++	++	++	+++
	2468	Vargem Grande do Sul (SP)	+	++	+	+	+++
<i>S. caviscabies</i>	2260	Mucugê (BA)	++	++	++	++	++
	2391	Cristalina (GO)	+	++	++	++	+++
	2398	Cristalina (GO)	++	++	++	++	++
	2400	Itapetininga (SP)	+	++	++	++	+++
<i>Streptomyces</i> sp.	2507	Ibicoara (BA)	+	+	+	+	++

*IBSBF – Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico

**Escala de agressividade das linhagens de *Streptomyces*: (+) pouco agressiva; (++) medianamente agressiva; (+++) muito agressiva; (++++) altamente agressiva.

Com relação aos testes de patogenicidade das linhagens de *Streptomyces* inoculadas, verificou-se diferentes graus de agressividade de acordo com as cultivares avaliadas. Estatisticamente, as linhagens mostraram-se mais agressivas nas cultivares Challenger e Atlantic, sendo que IBSBF 2809 (*S. scabiei*), 2950 (*S. scabiei*) e 2498 (*S. europaeiscabiei*) foram as que causaram a maior área de necrose. De acordo com a escala de agressividade estabelecida no item 4.2, essas três linhagens foram consideradas muito (+++) e altamente agressivas (++++) em nas cultivares testadas.

As cinco cultivares apresentaram pouca suscetibilidade quando testadas com as linhagens IBSBF 2298 (*S. scabiei*), 2510 (*S. europaeiscabiei*) e 2401 (*S. ipomoeae*). A cultivar Ágata se destacou como menos suscetível, pois nenhuma linhagem testada causou área de necrose superior a 44 mm² (++++) (Figura 8).

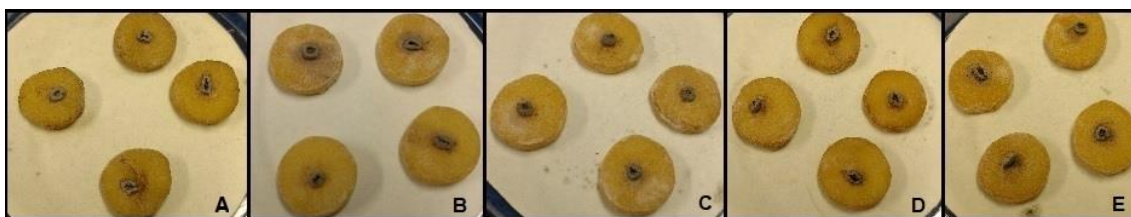


Figura 8. Necrose em fatias de minitubérculos de batata das cultivares (A) Ágata, (B) Asterix, (C) Challenger, (D) Markies e (E) Atlantic, com 10 dias de inoculação no teste de patogenicidade com a linhagem de *Streptomyces europaeiscabiei* IBSBF 2510, considerada pouco agressiva.

Levando-se em consideração todas as avaliações, em quatro cultivares predominou-se área de necrose de 13 mm² até 24mm² (++) e somente na cultivar Atlantic foi observada área de necrose maior, compreendida entre 24mm² e 44mm² (+++).

Foi possível notar também que muitas linhagens apresentaram variação de agressividade dependendo da cultivar testada, como *S. scabiei* IBSBF 2359 e 1774, que se mostraram medianamente agressivas (++) nas cultivares Ágata, Asterix e Atlantic, mas nas cultivares Markies e Challenger essas linhagens se

mostraram muito (+++) e altamente agressivas (++++), respectivamente, como ilustrado parcialmente na Figura 9.

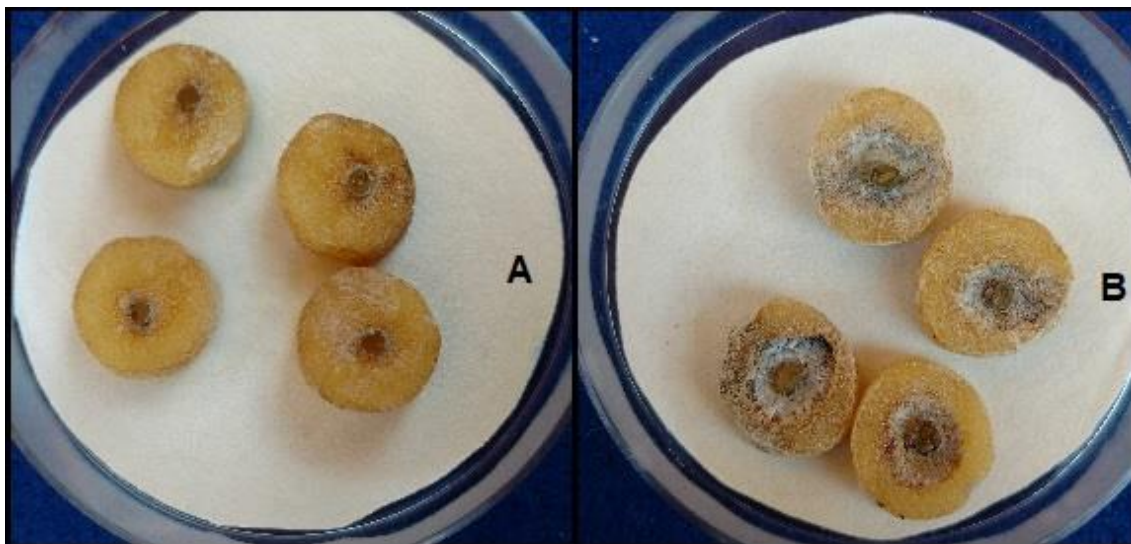


Figura 9. Necrose em tubérculos de batata das cultivares (A) Asterix e (B) Challenger após 10 dias de inoculação no teste de patogenicidade utilizando a linhagem de *S. scabiei* IBSBF 1774.

Outro exemplo dessa variação de agressividade foi verificado com a linhagem IBSBF 2400 (*S. caviscabies*), que causou grande área de necrose (+++) na cultivar Atlantic e média área de necrose (++) nas cultivares Asterix, Challenger e Markies. A cultivar que se destacou no teste contra esta linhagem foi a Ágata, que em média não ultrapassou a área de necrose de 13 mm² como ilustrado parcialmente na Figura 10.

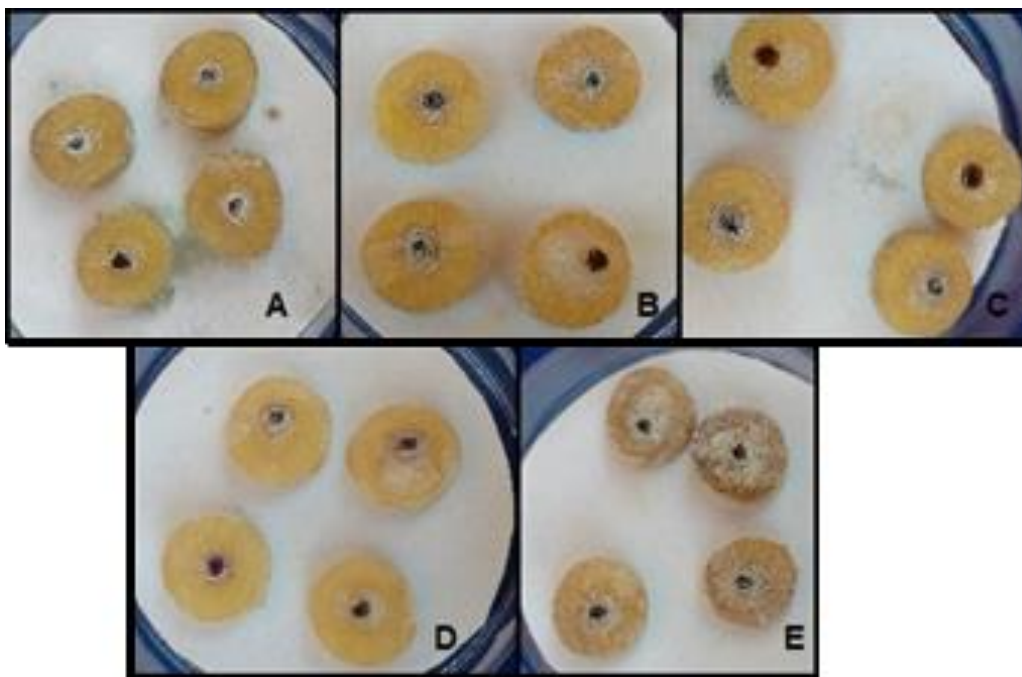


Figura 10. Necrose em minitubérculos de batata causada por *S. caviscabies* IBSBF 2400 nas seguintes cultivares: (A) Ágata, (B) Asterix, (C) Challenger, (D) Markies e (E) Atlantic, após 10 dias de inoculação.

A partir dos resultados obtidos pode-se notar que a cultivar Ágata apresentou menor suscetibilidade quando comparada com as outras cultivares, levando-se em conta as linhagens testadas até o momento. Também pode-se notar que a cultivar Atlantic apresentou maior suscetibilidade, sendo que a média da área de necrose foi maior em 24 linhagens das 30 testadas (Figura 11).

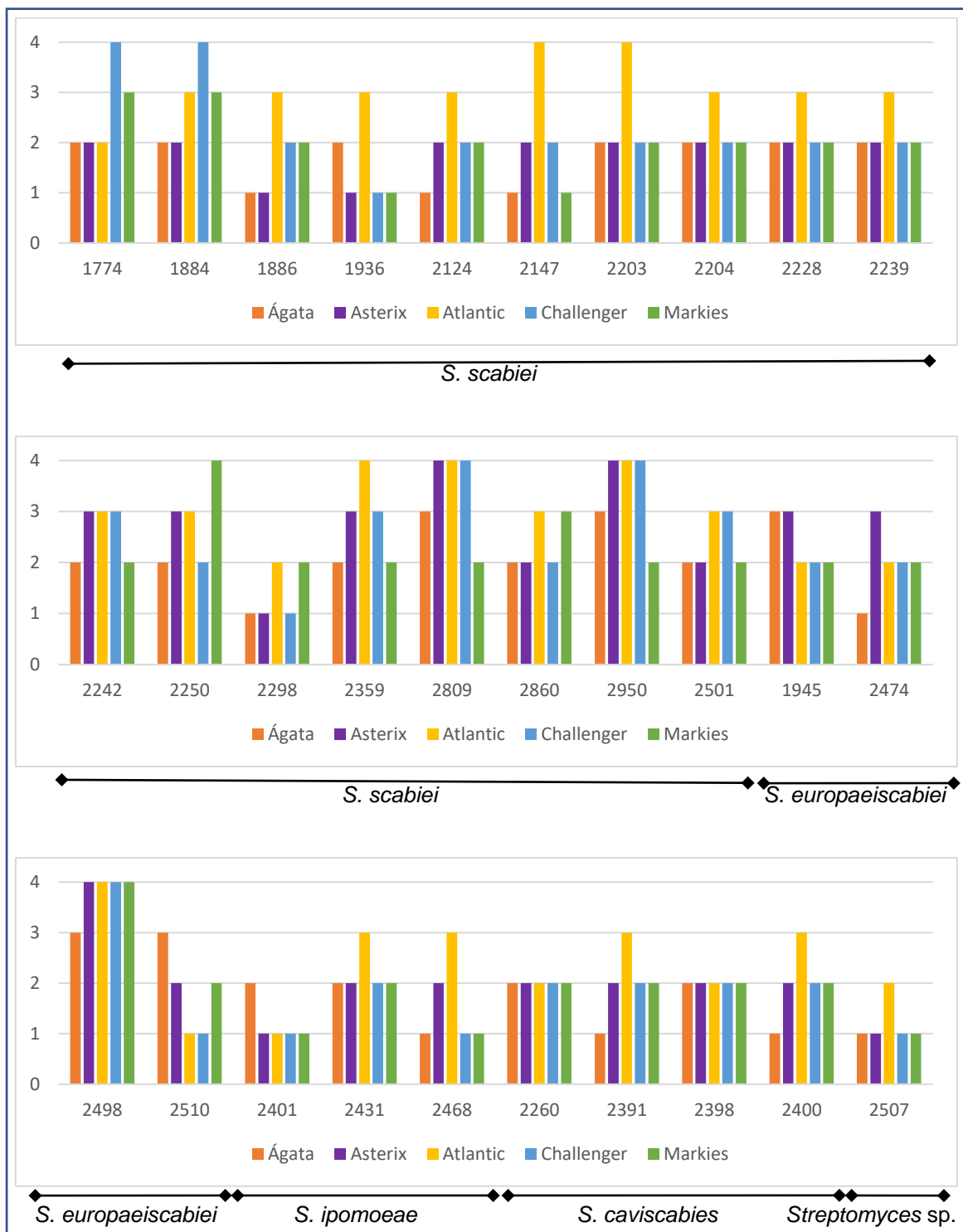


Figura 11. Agressividade de *Streptomyces* spp. em minitubérculos de batata das cultivares Ágata, Asterix, Challenger, Markies e Atlantic, após 10 dias de inoculação. Os números das escalas 1, 2, 3 e 4 correspondem à pouco agressiva (+), medianamente agressiva (++), muito agressiva (+++) e altamente agressiva (++++), respectivamente.

Baseado nos dados apresentados, concluiu-se que as cultivares utilizadas no Brasil são muito suscetíveis à *Streptomyces* spp. Tendo isso em vista, seria preciso a seleção de cultivares menos suscetíveis de acordo com as espécies de *Streptomyces* que ocorrem nas diferentes regiões do país, aliada a um conjunto com diferentes estratégias de manejo, para se alcançar redução dos prejuízos causados pela sarna da batata.

5.2. Amplificação do operon *txtAB* ligado a patogenicidade de *Streptomyces* spp.

As 30 linhagens de *Streptomyces* desse trabalho foram avaliadas quanto à presença do operon *txtAB*, responsável pela biossíntese da taxtomina A, por amplificação por PCR (Tabela 7). A Figura 12 ilustra parte dos experimentos dessa amplificação.

Todas as linhagens de *S. scabiei* e *S. europaeiscabiei* apresentaram amplificação do fragmento específico de 385 pb, correspondente ao operon *txtAB*. As linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2250, 2228, 2147, 2124 e *S. europaeiscabiei* IBSBF 1945 (Figura 12) apresentaram sinal forte de amplificação do operon *txtAB* (+++), assim como todas as outras linhagens dessas duas espécies bacterianas.

Todas as linhagens de *S. ipomoeae* e *S. caviscabies* apresentaram sinal fraco de amplificação do operon *txtAB* (+), com exceção de *S. ipomoeae* IBSBF 2431 que apresentou sinal médio de amplificação (++). Apenas a linhagem de *Streptomyces* sp. IBSBF 2507 não apresentou amplificação desse operon (Figura 12).

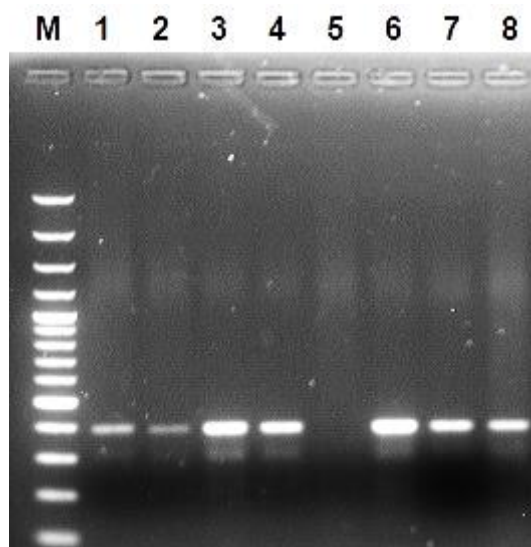


Figura 12. Amplificação por PCR do operon *txtAB* das diferentes linhagens de *Streptomyces*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb; *S. ipomoeae* (1) IBSBF 2401; *S. caviscabies* (2) IBSBF 2260; *S. scabiei* (3) IBSBF 2250; (4) IBSBF 2228; (6) IBSBF 2147; (7) IBSBF 2124; *Streptomyces*. sp. (5) IBSBF 2507; *S. europaeiscabiei* (8) IBSBF 1945.

5.3. Quantificação de taxtomina A produzida por linhagens de *Streptomyces* spp.

Nesse experimento utilizou-se como controle positivo de produção de taxtomina as linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2501 e *Streptomyces* sp. IBSBF 2507, que produziram 17,7 e 18,1 $\mu\text{g/mL}$ de taxtomina purificada, respectivamente, em estudo realizado por Garcia (2008). Para o cálculo de quantidade de taxtomina A produzida utilizou-se o parâmetro de absorvância 0,525 correspondendo a 143 $\mu\text{g/mL}$ de taxtomina de acordo com Garcia (2008) e Pascholati, S. F. (ESALQ/USP*).

*comunicação pessoal

Baseado nos resultados de cromatografia de camada delgada (TLC) foi possível identificar a presença da banda amarela, característica da taxtomina A, em 20 das 30 linhagens testadas. Das 18 linhagens de *S. scabiei*, 16 apresentaram banda característica da toxina, com exceção de IBSBF 2298 e 2501 (Figuras 13A e 14A). Todas as quatro linhagens de *S. europaeiscabiei* apresentaram a banda de taxtomina (Figura 14), porém as linhagens de *S. ipomoeae*, *S. caviscabies* e *Streptomyces* sp. não apresentaram a banda característica (Figuras 15A).

Nas análises das placas de TLC sob luz ultravioleta ficou claro que algumas linhagens não apresentaram a banda correspondente à taxtomina, porém apresentaram outras bandas de altura diferente, indicando tratar-se de outra toxina ou metabólito (Figuras 13B, 14B e 15B).

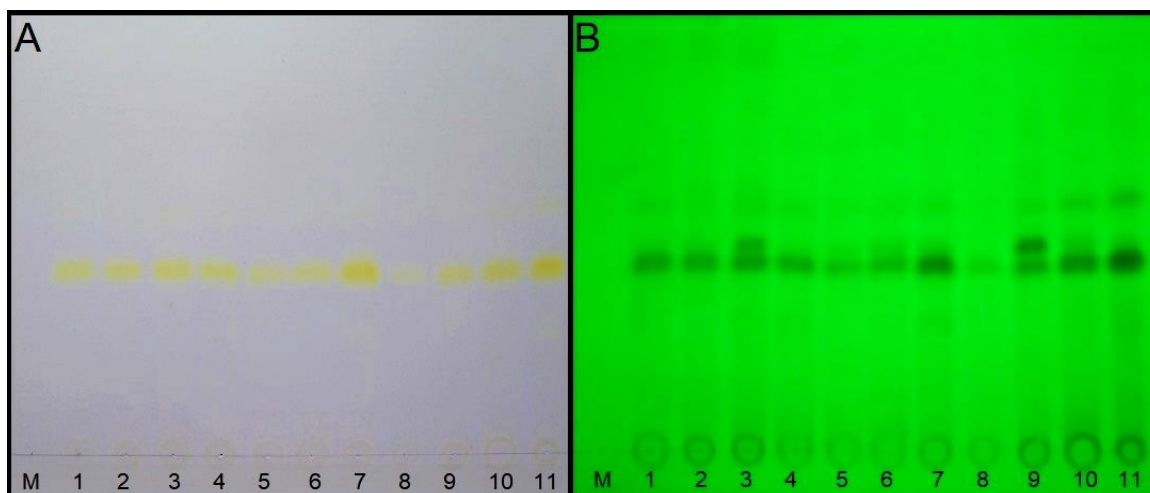


Figura 13. Cromatografia de camada delgada (TLC) de extratos de linhagens de *S. scabiei*, evidenciando a produção de taxtomina (A) sob luz visível e (B) sob luz ultravioleta. (M) Controle negativo com metanol; (1) IBSBF 1774; (2) IBSBF 1884; (3) IBSBF 1886; (4) IBSBF 1936; (5) IBSBF 2124; (6) IBSBF 2147; (7) IBSBF 2203; (8) IBSBF 2204; (9) IBSBF 2228; (10) IBSBF 2239; (11) IBSBF 2242.

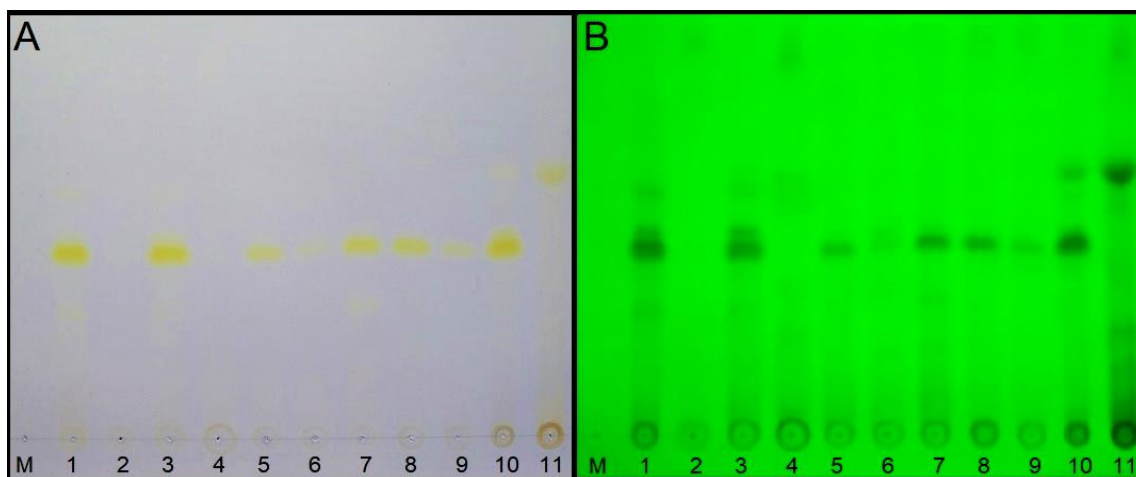


Figura 14. Cromatografia de camada delgada (TLC) de extratos de linhagens de *Streptomyces* evidenciando a produção de taxtomina **(A)** sob luz visível e **(B)** sob luz ultravioleta. **(M)** Controle negativo com metanol; *S. scabiei*: (1) IBSBF 2250; (2) IBSBF 2298; (3) IBSBF 2359; (4) IBSBF 2501; (5) IBSBF 2809; (6) IBSBF 2860; (7) IBSBF 2950; *S. europaeiscabiei* (8) IBSBF 1945; (9) IBSBF 2474; (10) IBSBF 2498; (11) IBSBF 2510.

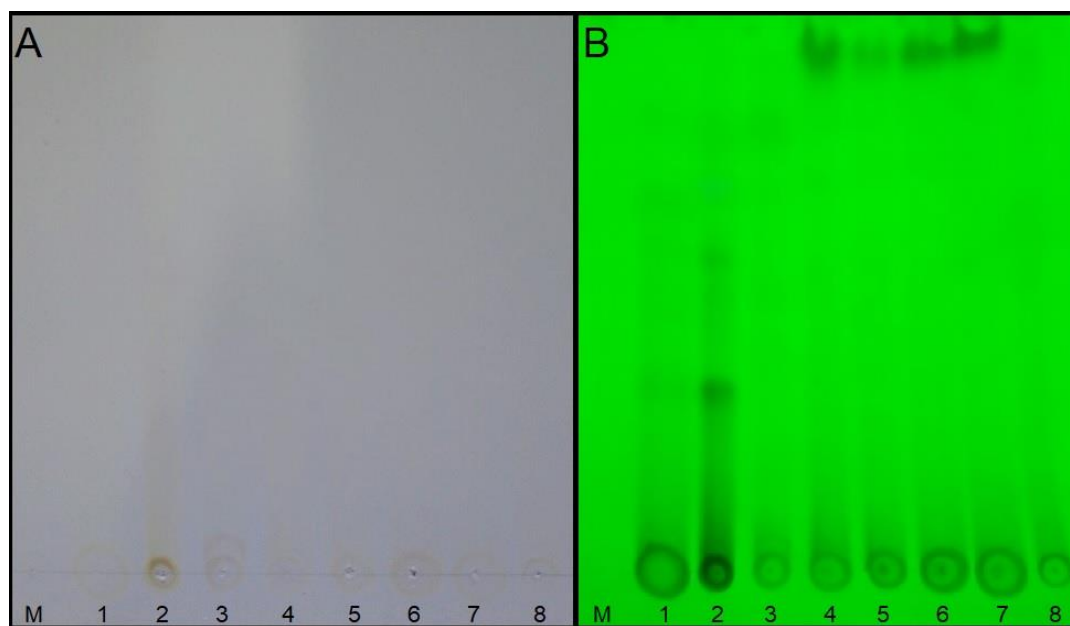


Figura 15. Cromatografia de camada delgada (TLC) de extratos de linhagens de *Streptomyces*, evidenciando a produção de taxtomina **(A)** sob luz visível e **(B)** sob luz ultravioleta. **(M)** Controle negativo com metanol; *S. ipomoea*: (1) IBSBF 2401; (2) IBSBF 2431; (3) IBSBF 2468; *S. caviscabies*: (4) IBSBF 2260; (5) IBSBF 2391; (6) IBSBF 2398; (7) IBSBF 2400; (8) *Streptomyces* sp. IBSBF 2507.

Tabela 7. Amplificação do operon *txtAB*, quantificação de taxtomina A, e agressividade das linhagens de *Streptomyces* no teste de patogenicidade nas cinco cultivares de batata testadas.

Espécie	IBSBF	txtAB*	Taxtomina**	Ágata	Asterix	Atlantic	Challenger	Markies
<i>S. scabiei</i>	1774	+++	33,8	++***	++	++	++++	+++
	1884	+++	23,7	++	++	+++	++++	+++
	1886	+++	18,5	+	+	+++	++	++
	1936	+++	13,9	++	+	+++	+	+
	2124	+++	6,8	+	++	+++	++	++
	2147	+++	10,4	+	++	++++	++	+
	2203	+++	42,2	++	++	++++	++	++
	2204	+++	0	++	++	+++	++	++
	2228	+++	6,3	++	++	+++	++	++
	2239	+++	31,3	++	++	+++	++	++
	2242	+++	53,7	++	+++	+++	+++	++
	2250	+++	53,1	++	+++	+++	++	++++
	2298	+++	-	+	+	++	+	++
	2359	+++	54,7	++	+++	++++	+++	++
	2501	+++	-	++	++	+++	+++	++
	2809	+++	7,9	+++	++++	++++	++++	++
	2860	+++	0	++	++	+++	++	+++
2950	+++	22,6	+++	++++	++++	++++	++	

(-) não houve amplificação do operon *txtAB*; (+) sinal fraco de amplificação; (++) sinal médio de amplificação; (+++) sinal forte de amplificação.

**Concentração de taxtomina A calculada de acordo com Garcia (2008).

(-): Ausência de banda amarela correspondente à taxtomina A no TLC. (0): sinal fraco da banda da taxtomina A, porém leitura de absorbância igual a zero.

***Agressividade das linhagens nos testes de patogenicidade: (+) pouco agressiva; (++) medianamente agressiva; (+++) muito agressiva; (++++) altamente agressiva.

Tabela 7. Continuação

Espécie	IBSBF	txtAB*	Taxtomina**	Ágata	Asterix	Atlantic	Challenger	Markies
	1945	+++	19,3	+++	+++	++	++	++
<i>S. europaeiscabiei</i>	2474	+++	0	+	++	++	++	++
	2498	+++	60,5	+++	++++	++++	++++	++++
	2510	+++	35,1	++	++	+	+	++
	2401	+	-	++	+	+	+	+
<i>S. ipomoeae</i>	2431	++	-	++	++	+++	++	++
	2468	+	-	+	++	+++	+	+
<i>S. caviscabies</i>	2260	+	-	++	++	++	++	++
	2391	+	-	+	++	+++	++	++
	2398	+	-	++	++	++	++	++
	2400	+	-	+	++	+++	++	++
<i>Streptomyces</i> sp.	2507	-	-	+	+	++	+	+

(-) não houve amplificação do operon *txtAB*; (+) sinal fraco de amplificação; (++) sinal médio de amplificação; (+++) sinal forte de amplificação.

**Concentração de taxtomina A calculada de acordo com Garcia (2008).

(-): Ausência de banda amarela correspondente à taxtomina A no TLC. (0): sinal fraco da banda da taxtomina A, porém leitura de absorbância igual a zero.

***Agressividade das linhagens nos testes de patogenicidade: (+) pouco agressiva; (++) medianamente agressiva; (+++) muito agressiva; (++++) altamente agressiva.

As linhagens de *S. scabiei* IBSBF 2501 e *Streptomyces* sp IBSBF 2507 foram utilizadas nesse estudo como controle positivo da produção de taxtomina A, de acordo com Garcia (2008). Entretanto, essas linhagens não apresentaram banda amarela correspondente à taxtomina nos experimentos de TLC do nosso estudo. Porém, a linhagem IBSBF 2501 apresentou sinal forte na amplificação do operon *txtAB* e foi considerada muito agressiva (+++) nos testes de patogenicidade nas cultivares Challenger e Atlantic. Já a linhagem *Streptomyces* sp. IBSBF 2507, não apresentou amplificação do operon *txtAB* e nos testes de patogenicidade foi considerada pouco agressiva (+) nas cultivares Ágata, Asterix, Challenger e Markies (Tabela 7).

As linhagens da espécie *S. scabiei* com maior produção de taxtomina A foram IBSBF 2359, 2242 e 2250 com valores de 54,7, 53,7 e 53,1 µg/mL, respectivamente. Essas três linhagens foram consideradas de média (++) a altamente agressivas (++++). Por outro lado, algumas linhagens dessa espécie bacteriana que produziram pouca taxtomina como IBSBF 2809 com 7,9 µg/mL e IBSBF 2860 que não produziu taxtomina A, mostraram-se muito (+++) ou altamente agressivas no teste de patogenicidade. Contrariamente, pode-se notar que a linhagem IBSBF 2203 apresentou alta produção de taxtomina A (42,2 µg/mL) e foi considerada como medianamente agressiva (++) no teste de patogenicidade em quatro cultivares, sendo apenas altamente agressiva (++++) na cultivar Atlantic.

Com relação às linhagens da espécie *S. europaeiscabiei*, a que apresentou maior produção de taxtomina A foi IBSBF 2498 com 60,5 µg/mL, sendo também a maior produção entre todas as linhagens testadas nesse estudo. Essa linhagem apresentou forte amplificação do operon *txtAB* e mostrou-se altamente agressiva (++++) no teste de patogenicidade em quatro cultivares e muito agressiva (+++) na cultivar Ágata. A linhagem IBSBF 2474 apresentou sinal forte de amplificação do operon *txtAB*, porém banda fraca da taxtomina A (TLC), que resultou em leitura zero de absorbância.

As linhagens de *S. ipomoeae* e *S. caviscabies* não apresentaram banda característica da taxtomina A. A ausência da produção de taxtomina nessas espécies pode ser explicada por apresentarem sinal fraco de amplificação por PCR do operon *txtAB*. Além disso, a agressividade dessas espécies nos testes

de patogenicidade em minitubérculos foi predominantemente medianamente agressiva (++) e pouco agressiva (+) com exceção da cultivar Atlantic.

Quando comparada a quantidade de taxtomina produzida com a agressividade de cada linhagem no teste de patogenicidade em diferentes cultivares de batata, pode-se notar que não houve correlação direta entre alta produção de taxtomina e alta agressividade do patógeno, uma vez que foram observados casos de linhagens com altos valores de taxtomina e pouca agressividade no teste de patogenicidade da mesma linhagem (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20).

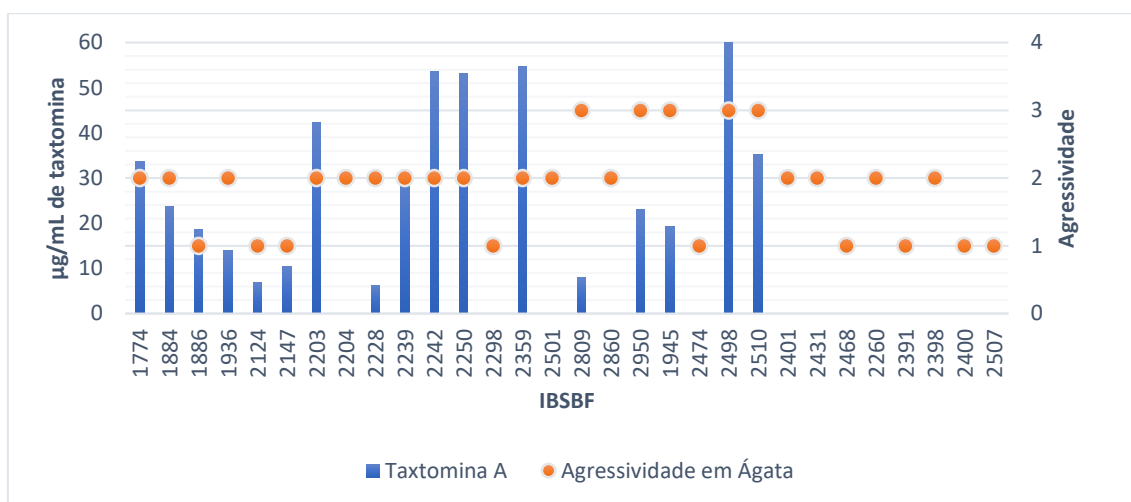


Figura 16. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Ágata de linhagens de *Streptomyces* spp. Os números da escala de agressividade 1, 2, 3 e 4 correspondem à pouco agressiva (+), medianamente agressiva (++) , muito agressiva (+++) e altamente agressiva (++++) respectivamente.

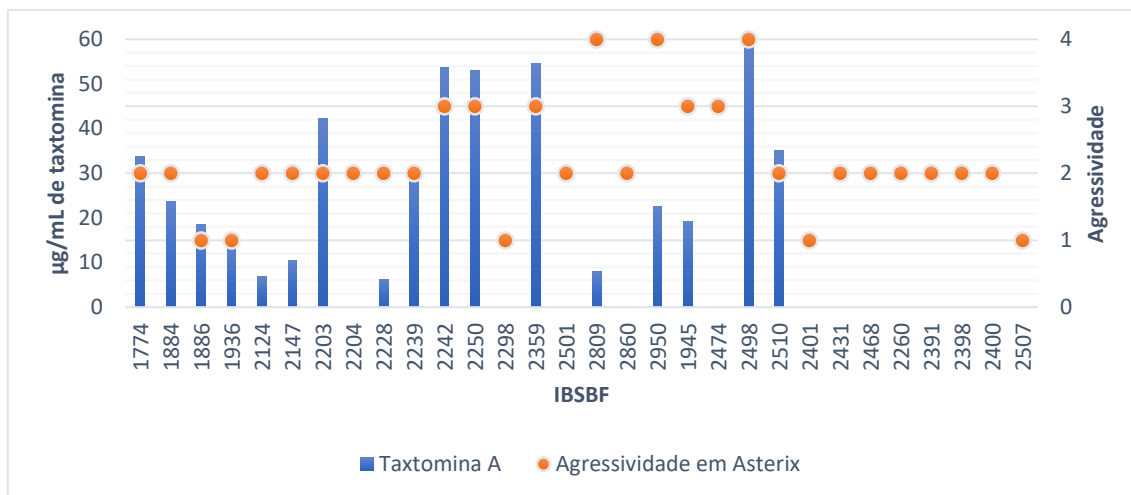


Figura 17. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Asterix de linhagens de *Streptomyces* spp. Os números da escala de agressividade 1, 2, 3 e 4 correspondem à pouco agressiva (+), medianamente agressiva (++) , muito agressiva (+++) e altamente agressiva (++++) respectivamente.

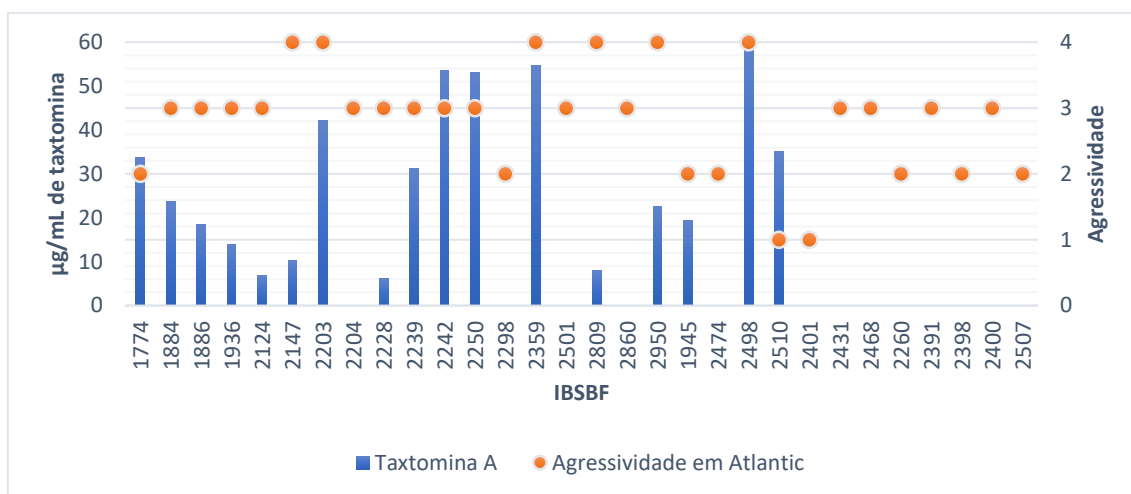


Figura 18. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Atlantic de linhagens de *Streptomyces* spp. Os números da escala de agressividade 1, 2, 3 e 4 correspondem à pouco agressiva (+), medianamente agressiva (++) , muito agressiva (+++) e altamente agressiva (++++) respectivamente.

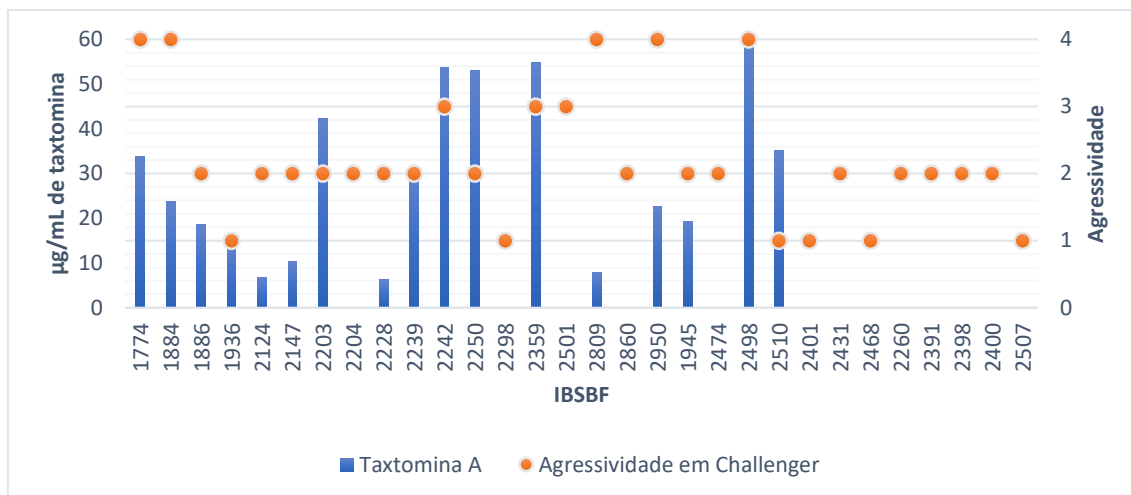


Figura 19. Comparação da produção de taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Challenger de linhagens de *Streptomyces* spp. Os números da escala de agressividade 1, 2, 3 e 4 correspondem à pouco agressiva (+), medianamente agressiva (++), muito agressiva (+++) e altamente agressiva (++++) respectivamente.

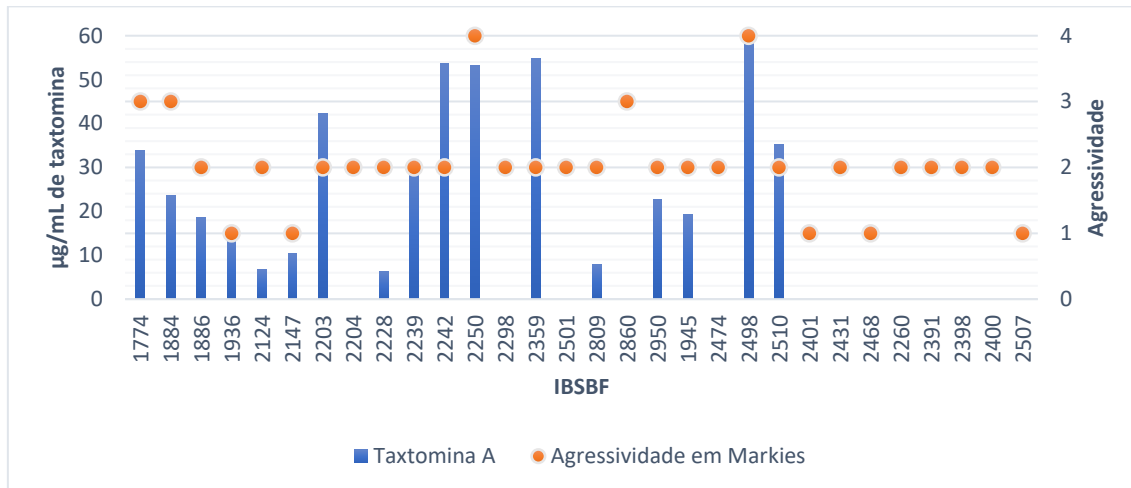


Figura 20. Comparação da produção de Taxtomina A e agressividade no teste de patogenicidade em minitubérculos da cultivar Markies de linhagens de *Streptomyces* spp. Os números da escala de agressividade 1, 2, 3 e 4 correspondem à pouco agressiva (+), medianamente agressiva (++), muito agressiva (+++) e altamente agressiva (++++) respectivamente.

Baseado nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20 podemos observar que as melhores produtoras de taxtomina A foram IBSBF 2498 (*S. europaeiscabiei*), IBSBF 2359, 2242 e 2250 (*S. scabiei*). Comparando-se os valores de taxtomina com a agressividade das linhagens, podemos verificar que a linhagem IBSBF 2498 produziu alta quantidade da toxina e foi considerada como altamente agressiva (++++) em diferentes cultivares. Por outro lado, as linhagens IBSBF 2242, 2250 e 2359 também produziram alta quantidade de taxtomina, mas se mostraram medianamente agressivas (++) nas cultivares Ágata, Challenger e Markies.

A linhagem de *S. scabiei* IBSBF 2809, mesmo com pouca produção de taxtomina, se mostrou altamente agressiva (++++) em três cultivares. A agressividade também variou nas linhagens IBSBF 2124 e 2228 também dessa espécie, com baixa produção de taxtomina, mas as notas variaram de pouco agressivas (+) a muito agressivas (+++) no teste de patogenicidade.

As linhagens que não produziram taxtomina nesse estudo se mostraram menos agressivas com predominância de notas atribuídas para pouco (+) e medianamente agressivas (++)

6. DISCUSSÃO

A sarna comum tem ocorrido com maior intensidade em cultivares de batata que antes eram consideradas relativamente resistentes. Esta mudança na incidência da doença pode estar associada a diversos fatores como potencial de inóculo do patógeno no solo, devido às mudanças no clima que podem alterar a população de *Streptomyces* patogênicos e de seus competidores; ao surgimento de novas espécies causadoras da sarna ou de linhagens melhores adaptadas às novas condições ou às novas cultivares de batata; ou às linhagens que adquiriram novas características de virulência (WANNER, 2007).

Considerando as diferentes etapas do desenvolvimento da cultura da batata e os fatores favoráveis ao desenvolvimento da doença, diferentes estratégias de controle podem ser adotadas a fim de se reduzir a incidência e severidade da sarna. Dentre elas, podemos citar o uso de cultivares resistentes à doença (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008). O uso de cultivares resistentes pode evitar ou reduzir o uso de defensivos, diminuindo com isso o impacto ambiental e os custos de produção (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2018).

A cadeia produtiva da batata no Brasil é dependente do uso de cultivares e tubérculos-semente de países de clima temperado, locais com características edafoclimáticas muito distintas. Quando as cultivares estrangeiras são plantadas no Brasil, apresentam redução no ciclo de desenvolvimento e demandam um uso intensivo de insumos (NIEDERHEITMANN, 2016). No Brasil, as poucas cultivares com determinada resistência à sarna não estão disponíveis para todas as áreas produtoras e ocupam menos de 2% da produção nacional (ANDREATA, 2007; GARCIA, 2008; FISCHER et al., 2009).

As cultivares mais plantadas e comercializadas no Brasil são Ágata, Asterix, Cupido, Mondial e Markies para mercado fresco e pré-fritas congeladas, e Atlantic destinada à indústria de batata chips (SHIMOYAMA, 2014).

Nesse estudo a cultivar Ágata foi considerada menos suscetível que as demais e Atlantic considerada a mais suscetível, diferentemente do trabalho realizado por Niederheitmann (2016) que verificou que a cultivar Atlantic recebeu menores notas de severidade que Ágata. Mesmo existindo essa diferença nessas cultivares, a cultivar Markies recebeu notas intermediárias de severidade, assim como no nosso trabalho em que as linhagens foram consideradas medianamente agressivas, corroborando a classificação da empresa Margossian Sementes (2016). Essa mesma diferença na agressividade em Ágata também foi relatada por Fischer e colaboradores (2009), que verificaram altos níveis de severidade da doença nessa cultivar quando inoculada com *S. scabiei*. Os mesmos autores verificaram, ainda, que a cultivar Asterix apresentou suscetibilidade intermediária, ficando entre Ágata e Atlantic, como observado no presente estudo.

Testes de patogenicidade realizados por Corrêa (2015) indicaram que as cultivares utilizadas para plantio no Brasil são muito suscetíveis aos diferentes grupos genéticos que representam novas espécies de *Streptomyces* no país e que a variação do grau de agressividade foi dependente da linhagem de *Streptomyces*.

A classificação de cultivares quanto à resistência à sarna pode ser uma importante ferramenta no controle integrado da doença, pois a suscetibilidade das cultivares pode variar com a espécie da bactéria envolvida (PASCO et al, 2005), e como visto nesse estudo, a agressividade de linhagens da mesma espécie variou frente às diferentes cultivares testadas.

De acordo com Loria e colaboradores (2006), a quantidade de taxtomina produzida pode estar associada às diferenças na agressividade do patógeno, porém, sabe-se que ela não é hospedeiro-específica, o que dificulta a obtenção da resistência de cultivares à doença.

A taxtomina A pode ser utilizada para seleção de cultivares resistentes em programas de melhoramento genético, como relatado por Wilson e colaboradores (2010), que empregaram a taxtomina A em cultura de tecidos como fator de seleção para células somáticas de batata resistentes à sarna, chegando a plantas com resistência estável à sarna.

Segundo King e Calhoun (2009), a relação da produção de taxtomina produzida e agressividade de diferentes espécies de *Streptomyces* dá suporte ao conceito de que essas toxinas são determinantes da patogenicidade. Por esse motivo, o presente trabalho quantificou a produção de taxtomina A de 30 linhagens de *Streptomyces* e comparou a agressividade do patógeno em diferentes cultivares de batata plantadas no Brasil.

Embora a taxtomina seja considerada o metabólito importante para a patogenicidade de linhagens de *Streptomyces*, há hipóteses de que outras vias metabólicas podem ser responsáveis pelo aparecimento dos sintomas da doença (AITTAMAA et al., 2010; DEES; WANNER, 2012; LORIA et al., 2008; LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Levando-se isso em consideração, podemos inferir que o alto nível de agressividade demonstrado por algumas linhagens com baixa produção de taxtomina pode estar relacionado com outras vias metabólicas ainda não conhecidas.

A divergência na agressividade e quantidade de fitotoxina entre algumas linhagens já foram relatadas em estudos com *Streptomyces* que não produziram taxtomina A e causaram sintomas da sarna da batata (CONN et al., 1998; PARK et al, 2003). Ainda, o estudo realizado por Conn e colaboradores (1998) também mostrou que linhagens de *S. scabiei* que produziram a taxtomina A não apresentaram lesões em tubérculos de batata em testes em casa de vegetação.

Uma hipótese para a correlação da quantidade de fitotoxina produzida e severidade da doença seria a sinergia entre diferentes toxinas produzidas por *Streptomyces* spp. Em estudo realizado por Natsume e colaboradores (2017) foram observadas maiores lesões em fatias de tubérculos de batata quando na presença de taxtomina e concanamicinas.

Cao e colaboradores (2012) associaram o composto fitotóxico borrelidina à sarna da batata, mesmo sendo seu alvo provavelmente diferente da taxtomina. Nesse estudo em que a borrelidina foi isolada, a linhagem causou necrose em tubérculos de batata, mas não houve indícios de produção de taxtomina, sugerindo a correlação entre a presença desse composto e os sintomas da doença.

Assim, a produção de taxtomina A contribui para a severidade da doença, mas não impede seu desenvolvimento em sua ausência. Alguns compostos como toxinas do tipo concanamicinas, proteína Nec1 e enzimas hidrolíticas, também podem ter impacto diferenciado na patogenicidade com a ausência da produção da taxtomina A (GARCIA, 2008).

Não foi possível identificar a razão pela qual determinadas linhagens que produziram alta quantidade de taxtomina, não causaram necrose no teste de patogenicidade em minitubérculos. Uma das possibilidades seria a baixa sobrevivência do inóculo nas fatias de batata, mas isso necessita ser confirmado por testes em vasos (casa de vegetação). Outra explicação poderia ser que a resistência das cultivares testadas tenha influenciado a habilidade da bactéria de causar necrose, acarretando maior ou menor suscetibilidade do tubérculo à taxtomina.

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que a produção de taxtomina não está diretamente relacionada com a agressividade do patógeno, embora esteja associada ao aparecimento dos sintomas.

7. CONCLUSÕES

- Nos testes de patogenicidade em minitubérculos linhagens de mesma espécie apresentaram graus variados de agressividade nas cinco cultivares testadas;
- A cultivar Atlantic foi considerada mais suscetível, enquanto que Ágata se mostrou mais resistente;
- Os maiores valores de produção de taxtomina A foram obtidos por linhagens de *S. scabiei* (3) e *S. europaeiscabiei* (1);
- As linhagens de *S. ipomoea* e *S. caviscabies* não produziram taxtomina A;
- A quantidade de taxtomina A produzida não pode ser correlacionada com agressividade do patógeno.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. J. Potato tuber lenticels: development and structure. **Annals of Applied Biology**, v.79, p.265-273, 1975.
- ADAMS, M. J.; LAPWOOD, D. H. Studies on the lenticels development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils. **Annals of Applied Biology**, v.90, p.335-343, 1978.
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2016.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 5th ed. Academic Press, San Diego. 2005.
- AITTAMAA, M.; SOMERVUO, P.; LAAKSO, I.; AUVINEN, P. VALKONEN, J. P. T. Microarray-based comparison of genetic differences between strains of *Streptomyces turgidiscabies* with focus on the pathogenicity island. **Molecular Plant Pathology**, v.11, n.6, p.733-746, 2010.
- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. **Wiley, New York**. 1961.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. 5ª Ed. 518 pp, 2018.
- ANDREATTA, A. Novas variedades da HZPC no Brasil. **Batata Show**, ano 7, n.18, p. 27-28, ago. 2007.
- BABCOCK, M. J; ECKWALL, E. C.; SCHOTTEL, J. L. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.1579-1586, 1993.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 2009.
- BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; NORMAND, P.; JOUAN, B. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v.50, p.91-99, 2000.

BRADY, N. C. The nature and properties of soils, 8th ed. **MacMillan, New York**. 1974.

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.

BUKHALID, R. A.; TAKEUCHI, T.; LABEDA, D.; LORIA, R. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the diastatochromogenes cluster. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.738-744, 2002.

CAO, Z.; KHODAKARAMIAN, G.; ARAKAWA, K.; KINASHI, H. Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.76, n.2, p.353-357, 2012.

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, 65p, 2015.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CONN, K. L.; LECI, E.; KRITZMAN, G.; LAZARVITS, G. A quantitative method for determining soil populations of *Streptomyces* and differentiating potential potato scab inducing strains. **Plant Disease**, v. 82, p. 631-638, 1998.

CORRÊA, D. B. A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.

CORRÊA, D. B. A. Caracterização de novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata no Brasil. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.

CUNHA, I. G. B.; SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, R. E. A.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, J. M. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, p. 120-123. 2009.

DAUB, M.E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.159-186, 1986.

DEES, M. W.; WANNER, L. A. In search of better management of potato common scab. **Potato Research**, v. 55, p. 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 Dept. of Agr. Sci. Bull.** No. 136. 1933.

DRISCOLL, J. Greenhouse and Field Nursery Evaluation for Potato Common Scab Tolerance in a Tetraploid Population. **American Journal of Potato Research**, v. 86, n. 2, p. 96-101, 2009.

DURBIN, R. (Ed.). Toxins in plant disease. New York: Academic Press, 1981.

DUVAL, I.; BROCHU, V.; SIMARD, M.; BEAULIEU, C.; BEAUDOIN, N. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. **Planta**, v. 222, n. 5, p. 820-831, 2005.

DWORKIN, M. Prokaryotic life cycles. **The Prokaryotes**. p.140-166, 2006.

ERRAKHI, R. DAUPHIN, A.; MEIMOUN, P.; LEHNER, A.; REBOUTIER, D.; VATSA, P.; BRIAND, J.; MADIONA, K.; RONA, J. P.; BARAKATE, M.; WENDEHENNE, D.; BEAULIEU, C.; BOUTEAU, F. An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 15, p. 4259-4270, 2008.

EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Z.; MORENO-ENRÍQUEZ, A. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. **Revista BioTecnología**, v.11, p.37-50, 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Statistic Division, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em 15 de junho de 2018.

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Strengthening potato value chains: technical and policy options for developing countries. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1710e/i1710e.pdf>. Acesso: 08 de maio de 2018.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Why potato?, 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/potato-2008/en/aboutiyp/index.html>. Acesso em: 15 de junho de 2018.

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 streptomycetes causing deep-pitted Scab of potato in Québec, Canada. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.45, p.222-225. 1995.

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

FISCHER, I. H. et al. Efeito de fertilizantes e fungicidas na incidência da sarna da batata. **Batata Show**, ano 5, n. 11, p. 9-10, abr. 2005.

FISCHER, I.H.; TEIXEIRA, A.P.M.; TOFFANO, L.; GARCIA, E.O. Reação de cultivares de batata a *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum profunda. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.219-222, 2009.

FRY, B. A.; LORIA, R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.60, p.1-8, 2002.

GARCIA, E. O. Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtamina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). **Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz**, Piracicaba. 2008.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K.R. The biochemistry and physiology of plant disease. **University of Missouri Press**, 1986.

GOTO, K. Relationship between soil pH, available calcium and prevalence of potato scab. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.31, p.411-418, 1985.

GOUWS, R.; WEHNER, F. C. Biofumigation as alternative control measure for common scab on seed potatoes in South Africa. **Agroindustria**, v.3, p.5-8. 2004.

GOUWS, R. Etiology and integrated control of common scab on seed potatoes in South Africa. Tese de Mestrado. **University of Pretoria**, 2006.

GOYER, C.; FAUCHER, E.; BEAULIEU, C. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.46, p.635-639, 1996.

GOYER, C.; VACHON, J.; BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. **Phytopathology**, Lancaster, v.88, p.442-445, 1998.

GRANITI, A. Phytotoxins and their involvement in plant diseases. Introduction. **Experientia**, v. 47, p. 751-755, 1991.

HAYNES, K. et al. Common Scab Trials of Potato Varieties and Advanced Selections at Three U.S. Locations. **American Journal of Potato Research**, v. 87, n. 3, p. 261-276, 2010.

HEALY, F.G.; KRASNOFF, S.B.; WACH, M.; GIBSON, D.M.; LORIA, R. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.2019-2029, 2002.

HENSEL, M.; HOLDEN D.W. Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. **Microbiology**, v.142, p.1049–1058, 1996.

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

HOPWOOD, D.A. *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. **Oxford University Press**, 2007.

HUANG J.S. **Plant pathogenesis and resistance**: biochemistry and physiology of plant–microbe interactions. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras no ano civil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201503.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201503.pdf). Acesso em: 08 de maio de 2018.

IMARK, M. Produção de Batata na Região de São Mateus do Sul. **Batata Show**, ano 7, n. 17, p. 10, abr. 2007.

Johnson, E. G.; JOSHI, M. V.; GIBSON, D. M.; LORIA, R. Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 1-3, p. 18-25, 2007.

JOSHI, M.; RONG, X.; MOLL S.; KERS, J.; FRANCO, C.; LORIA, R. *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 599-608, 2007.

KERS, J. A.; CAMERON, K. D.; JOSHI, M. V.; BUKHALID, R. A.; MORELLO, J. E.; WACH, A. J.; GIBSON, D. M.; LORIA, R. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. **Molecular Microbiology**, v.55, p.1025- 1033, 2005.

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**, v.14, p.551-554, 1998.

KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; CLARK, M. C.; CALHOUN, L. A. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, v.13, p.849-850, 1989.

KING, R. R.; CALHOUN, L. A. The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. **Phytochemistry**, v. 70, n. 7, p. 833-841, 2009.

KINKEL, L. L.; BOWERS, J. H.; SHIMIZU, K.; NEENO-ECKWALL, E. C.; SCHOTTEL, J. L. Quantitative relationship among thaxtomin A production, potato scab severity, and fatty acid composition in *Streptomyces*. **Can. J. Microbiol.**, v.44, p.768–776, 1998.

LABEDA, D.P.; LYONS, A.J. DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.532-535. 1992.

LABRUYÈRE, R. E. Common scab and its control in seed-potato crops. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. **Agricultural Research Report**, v.767, p.1-72, 1971.

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

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

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.

LIN, Y.-S.; KIESER, H. M.; HOPWOOD, D. A.; CHEN, C. W. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Mol. Microbiol.**, v.10, p.923-933, 1993.

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.

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.; CREATH, R. A.; LEINER, R. H.; OLIVIER, M.; STEFFENS, J. C. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. **American Phytopathological Society**, v. 85, n. 5, p. 537-541, 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, 1997.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.44, p.469-487, 2006.

LORIA, R.; BIGNELL, D. R. D.; MOLL, S.; HUGUET-TAPIA, J. C.; JOSHI, M. V.; JOHNSON, E. G.; SEIPKE, R. F.; GIBSON, D. M. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 3-10, 2008.

MARGOSSIAN SEMENTES. Batata-Markies. Disponível em: <<http://www.margossian.com.br/batata-markies>> Acesso em 11 junho 2018.

McGREGOR, A. J.; WILSON, G. C. S. The effect of applications of manganese sulphate to a neutral soil upon the yield of tubers and the incidence of common scab in potatoes. **Plant and Soil**, v.1, p.59-64. 1964.

MILLARD, W. A. Common scab of potato. Part II. **Annals of Applied Biology**, v.10, p.70-88, 1923.

MILLARD, W. A.; BURR, S. A study of twenty-four strains of *Actinomyces* and their relation to types of common scab of potato. **Ass Appl Biol.**, v.13, p.580-644, 1926.

MIYAJIMA, K.; TANAKA, F., TAKEUCHI, T.; KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.48, p.495-502, 1998.

NAVARRO, F. M. Varietal Resistance to Common Scab. 2012. Disponível em: <<http://horticulture.wisc.edu/wp-content/uploads/2014/03/14-2012-WPVGA-Article-Varietal-Resistance-to-Common-Scab-final.pdf>>. Acesso em 10 maio. 2018.

NATSUME, M.; TASHIRO, N.; DOI, A.; NISHI, Y.; KAWAIDE, H. Effects of concanamycins produced by *Streptomyces scabies* on lesion type of common scab of potato. **Journal of General Plant Pathology**, v. 83, n. 2, p. 78-82, 2017.

NIEDERHEITMANN, M. Reação de clones de batata à sarna comum (*Streptomyces scabies*). Dissertação (Mestrado acadêmico). **Universidade Federal de Lavras**. p. 85, 2016.

OSWALD, J. W.; LORENZ, O. A. Soybeans as a green manure crop for the prevention of potato scab. **Phytopathology**, v.46, p.22, 1956.

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. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 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.

PASCO, C.; JOUAN, B.; ANDRIVON, D. Resistance of potato genotypes to common and netted scab-causing species of *Streptomyces*. **Plant Pathology**, Oxford, v.54, p.383-392, 2005.

PEMBERTON, B. The influence of green manure and crop rotation on common scab. **Integrated control of common scab**. p.35-47. 1994.

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.

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

SCHEIBLE, W.; FRY, B.; KOCHVENKO, A.; SHINDELASCH, D.; ZIMMERLI, L.; SOMERVILLE, S.; LORIA, R.; SOMERVILLE, C. R. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. **The Plant Cell**, v. 15, n. 8, p. 1781-1794, 2003.

SEIPKE, R. F.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* 87-22 Possesses a Functional Tomatinase. **Journal of Bacteriology**, v.190, p.7684–7692, 2008.

SHIMOYAMA, N. Y. A cadeia brasileira da batata – situação atual, 2014. Disponível em: <http://consumoymercadodepapa.wordpress.com/2014/11/28/a-cadeia-brasileira-da-batata-situacao-atual>. Acesso em: 10 de maio de 2018.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.16, p.313-340, 1966.

SLACK, S. A. A look at potato leafroll virus and potato virus Y: Past, present and future. **Badger Common Tater**, v.43, p.16-21, 1991.

STEWART, P.; GLOBIG, S. (Eds.). *Phytopathology in Plants*. **CRC Press**, 2011.

TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. Phylogenetic analysis of *Streptomyces spp.* causing potato scab based on 16S RNA sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.46, p.476-479, 1996.

TEGG, R. S.; MELIAN, L.; WILSON, C. R.; SHABALA, S. Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 4, p. 638-648, 2005.

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, Budapest**, v.48, p.575-585, 2001.

WACH, M. J.; KRASNOFF, S.B., LORIA, R., GIBSON, D. M. Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by *Streptomyces acidiscabies*. **Archives of microbiology**, v. 188, n. 1, p. 81-88, 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. A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. **Plant Disease**, v. 91, p. 352-359, 2007.

WANNER, L.A.; KIRK, W.W. *Streptomyces* – from Basic Microbiology to Role as a Plant Pathogen. **Am. J. Potato Res.**, v.92, p.236-242, 2015.

WALTON, J.D. Host-selective toxins: agents of compatibility. **Plant Cell**, v.8, p.1723–1733, 1996.

WATERER, D. Impact of high soil pH on potato yields and grade losses to common scab. **Canadian Journal of Plant Science**, v.82, p.583-586, 2002.

WENZEL, G. Strategies in unconventional breeding for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.149-172, 1985.

WILSON, C. R., RANSUM, L. M. & PEMBERTON, B. M. The relative importance of seedborne inoculum to common scab disease of potato and the efficiency of seed tuber and soil treatments 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.; CONNER, A. J. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection. **Phytopathology**, St. Paul, v.100, p.460-467, 2010.

ZAMBOLIM, L.; CÁSSIA, R. M.; PIKANÇO, 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, p. 261-328, 2009.

ANEXO 1 – ABSORBÂNCIA DOS EXTRATOS DE TAXTOMINA A

IBSBF	Absorbância*						
1774	1,145	1,013	1,009	1,043	0,986	0,92	0,841
1884	1,045	1,016	0,939	0,89	0,841	0,739	0,729
1886	1,692	1,462	1,461	1,438	1,057	0,787	0,536
1936	1,628	1,562	1,101	1,08	0,975	0,938	0,82
2124	1,005	0,976	0,973	0,827	0,7	0,582	0,565
2147	1,45	1,432	1,364	1,334	1,136	0,779	0,504
2203	2,663	2,593	2,59	2,574	2,438	2,347	2,252
2204	0,519	0,45	0,439	0,423	0,396	0,336	0,27
2228	1,42	1,357	1,333	1,023	0,971	0,937	0,516
2239	2,35	2,282	2,25	1,92	1,728	1,725	1,405
2242	2,725	2,712	2,69	2,66	2,463	2,4	2,245
2250	2,758	2,6	2,46	2,42	2,281	2,137	2,02
2298	2,06	0,341	0,225	0,207	0,15	0,098	0,084
2359	2,65	2,6	2,6	2,49	2,48	2,261	2,192
2809	1,193	1,147	0,883	0,841	0,719	0,56	0,891
2860	0,756	0,726	0,666	0,585	0,575	0,53	0,5
2950	2,275	2,256	2,167	2,059	2,023	1,745	1,669
2501	1,11	0,766	0,74	0,655	0,647	0,588	0,426
1945	1,793	1,439	1,243	1,202	1,157	1,084	1,026
2474	0,777	0,715	0,66	0,658	0,557	0,482	0,642
2498	3	2,667	2,538	0,796	0,682	0,582	0,531
2510	2,914	2,9	2,861	2,853	2,82	2,728	1,604
2401	0,99	0,845	0,794	0,698	0,666	0,625	0,623
2431	2,46	1,88	1,56	1,49	1,455	1,448	1,285
2468	1,885	1,873	1,87	1,646	1,31	1,187	1,012
2260	0,787	0,768	0,744	0,74	0,734	0,716	0,687
2391	0,87	0,807	0,783	0,741	0,737	0,734	0,713
2398	0,921	0,872	0,868	0,857	0,848	0,814	0,777
2400	0,694	0,633	0,61	0,57	0,55	0,487	0,481
2507	0,78	0,75	0,654	0,635	0,63	0,62	0,506

*Absorbância dos extratos de taxtomina com leitura a 400 nm