

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

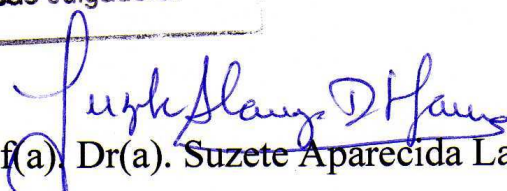


DANIELE BUSSIOLI ALVES CORRÊA

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA E
MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Streptomyces* ASSOCIADAS
À SARNA DA BATATA DE DIFERENTES REGIÕES
PRODUTORAS DO BRASIL”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Danielle B. Alves Correa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microorganismos.


Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C817c

Corrêa, Daniele Bussioli Alves

Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil / Daniele Bussioli Alves Corrêa. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Suzete Aparecida Lanza Destéfano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sarna da batata. 2. Batata. 3. Taxtamina. 4. Análise de sequências gênicas por Multilocus. 5. Gene *nec1*. 6. Gene *atpD*. 7. Reação em cadeia da polimerase. 8. Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição. I. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Streptomyces* strains associated to potato scab from different producing areas of Brazil.

Palavras-chave em inglês: Potato scab; Potatoes; Thaxtomin; Multi Locus Sequence Analysis; *nec1* gene; *atpD* gene; Restriction Fragment Length Polymorphism; Polymerase chain reaction.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Fabiana Fantinatti-Garboggini, Ivan Paulo Bedendo.

Data da defesa: 28/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

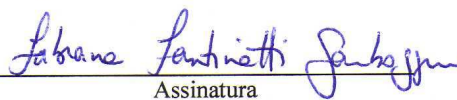
Campinas, 28 de Fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

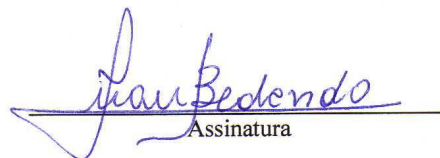
Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano
(Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini


Assinatura

Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo


Assinatura

Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Wellington Luiz Araújo

Assinatura

*“Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria acesso ao sentimento de amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:
Além do pão, o trabalho.
Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para encontrar a saída.”*

Mahatma Gandhi

*Aos meus pais, Angélica e Jorge,
por serem pessoas maravilhosas, exemplos
de vida e por todo esforço e investimento
na educação de seus filhos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Susi, pelos ensinamentos e por todo aprendizado proporcionado ao longo desses anos. Agradeço também pela confiança no meu trabalho, pelo respeito às minhas idéias e principalmente pela amizade e carinho. Acredito que me proporcionou um crescimento não só profissional nesse tempo, me ajudou a superar as dificuldades, a definir novas metas e comemorou as vitórias em diversos momentos que foram além do desenvolvimento desse projeto. Agradeço pelas cobranças, pelos elogios e por ter me inspirado e ajudado no meu crescimento.

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, curador da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), pelo fornecimento das linhagens utilizadas nesse estudo. Agradeço também pelos ensinamentos e auxílio ao longo desses anos, pela confiança depositada em mim no desenvolvimento desse projeto, pela amizade e acolhimento no laboratório.

À Associação Brasileira da Batata (ABBA) pelo financiamento inicial do projeto e fornecimento das amostras de batata utilizadas no estudo e em especial ao engenheiro agrônomo Natalino Yassushi Shimoyama.

À agencia financiadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro do projeto e concessão da bolsa de Mestrado.

À Éder Mariotto da Cooperativa Agrícola de Capão Bonito pelo fornecimento dos minitubérculos utilizados nos testes de patogenicidade.

Ao Dr. Márcio José da Silva (CBMEG-Unicamp) e ao Dr. Ricardo Harakava (Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico) pelo sequenciamento das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, por todos os momentos vividos dia a dia e amizade inexplicável. Cada um, com seu jeito de ser, torna nosso ambiente de trabalho um pouco mais especial. Agradeço aos antigos companheiros de trabalho Dê, Rafa, Alessandra, Denise, Bruna e Vivian e às pessoas que convivem comigo diariamente,

de forma quase sempre muito paciente e que tornam meus dias mais felizes Mari Mari, Jaque, Rê, Talithis, Victor, Lucas, Anne, Alex, Cel, Soninha, Irene, Beriam, Júlio, Susi e Dani. Obrigada por todo companheirismo, pelos bons momentos, pela ajuda nas dificuldades e por tornar o laboratório um local tão agradável.

À minha querida amiga e companheira de laboratório e de vida Mariana Ferreira Tonin, Mari Mari. Com você aprendi muito, inicialmente como sombra, mas enfim muito da minha experiência, idéias, amor ao meu trabalho vieram com seus ensinamentos. Agradeço muito por todo aprendizado, pelos assuntos laboratoriais, de ordem prática e teórica, por me ajudar a superar muitas dificuldades e pela amizade que não há como descrever aqui. Você com certeza é uma pessoa que admiro muito e que me inspirou como profissional e como pessoa, obrigada por tudo.

À Denise Salomão, Dê, que em sua dissertação de mestrado realizou a base desse projeto, bem como a padronização de grande parte das metodologias utilizadas. Agradeço pelo trabalho conjunto na minha iniciação científica onde aprendi muito para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado. Agradeço também pela amizade, companheirismo, pelo crescimento e por todos momentos que compartilhamos, você é uma amiga muito especial, obrigada!

Aos amigos e amigas que não participaram diretamente do desenvolvimento desse trabalho mas que foram essenciais na minha vida em todos os momentos, sempre pacientes, carinhosos e me dando os puxões de orelha quando necessário. Todos de uma forma muito especial contribuíram um pouco para a pessoa que sou hoje e eu sou muito grata. Na verdade cada um de vocês merecia um agradecimento especial.

Para vocês minhas queridas não tem como não pensar em agradecer. Má e Li, foram anos da faculdade juntas, aprendizado acadêmico e troca de idéias nas disciplinas, nos trabalhos, nos estudos, sempre unidas, por todos esses anos e ainda agora após dois anos. Os rumos foram diferentes mas ainda assim a amizade permaneceu, de uma forma muito bonita, verdadeira e intensa. Vocês são como irmãs, fazem parte da minha vida, do que sou, do que tenho saudades, dos meus bons momentos, acontecimentos e dos momentos difíceis. Amo muito vocês!

À minha família pela compreensão e pelos bons momentos juntos. Aos tios, tias e principalmente aos primos Didy e Juninho e às minhas eternas priminhas Dessa e Jé.

Aos professores Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini (CPQBA/DRM – Unicamp), Dr. Ivan Paulo Bedendo (Departamento de Fitopatologia - Esalq) e Laura Maria Mariscal Ottoboni (CBMEG-Unicamp) participantes da qualificação, pré-banca e banca, pela grande contribuição e valiosas sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos professores do curso de Biologia e do Mestrado, agradeço pelos ensinamentos e por ter me tornado uma pessoa ainda mais apaixonada e fascinada por essa área do conhecimento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Jorge e Angélica...

Tudo que sou hoje, toda minha dedicação, determinação, valores, tudo, eu devo a vocês. Agradeço por serem meus pais, por sermos uma família tão bonita e unida e por toda a ajuda em cada momento da minha vida, até mesmo nas coisas mais simples. Obrigada por serem exemplos de vida, pessoas boas e que tento seguir como modelo. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão e paciência. Por tornarem minha vida mais feliz e por todos os mimos. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos...

Agradeço pelos ensinamentos na vida em família, pelas divergências, pelas alegrias e por todos os momentos vividos que com certeza ajudaram no meu crescimento como pessoa. Agradeço por serem minha inspiração, modelo e por toda ajuda e companheirismo. Me orgulho muito de vocês e os amo muito!

Aos meus queridos avôs e avós...

Agradeço por terem participado da minha educação e por me ensinarem a dar valor às pequenas coisas da vida. Daqueles que não estão mais entre nós eu recordo com muita alegria e orgulho e para as vovós, sempre presentes, devo muito agradecimento por todo amor, carinho, atenção, paciência e agradinhos, sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XXI
RESUMO.....	XXV
ABSTRACT	XXVII
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Importância da cultura da batata e dados de produção.....	5
2. Problemas fitossanitários.....	6
3. Espécies de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata	7
3.1 <i>S. scabiei</i>	9
3.2 <i>S. acidiscabies</i>	9
3.3 <i>S. caviscabies</i> e <i>S. setonii</i>	9
3.4 <i>S. turgidiscabies</i>	10
3.5 <i>S. reticuliscabiei</i>	10
3.6 <i>S. europaeiscabiei</i> e <i>S. stelliscabiei</i>	10
3.7 <i>S. luridiscabiei</i> , <i>S. puniscabiei</i> e <i>S. niveiscabiei</i>	11
3.8 <i>S. ipomoeae</i>	12
4. Diferentes tipos de sarna da batata	12
4.1 Sarna comum, sarna ácida e sarna erupente	13
4.2 Sarna profunda	14
4.3 Sarna reticulada e avermelhada	14
5. Ciclo da doença.....	15
6. Patogenicidade em <i>Streptomyces</i>	17
6.1 Taxtomina e os diferentes tipos de lesões de sarna	20
7. Controle da sarna da batata	21
7.1 Uso de cultivares resistentes.....	22
7.2 Uso de batata semente certificada	23
7.3 Tratamento dos tubérculos	23
7.4 Manutenção da umidade do solo	23

7.5 Acidificação do solo	24
7.6 Rotação de culturas	24
7.7 Controle químico.....	24
8. Legislação	25
9. Taxonomia e Caracterização.....	26
10. Sarna da batata no Brasil	28
OBJETIVOS	29
1. Objetivos gerais	30
2. Objetivos específicos	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
1. Linhagens	32
2. Isolamento	37
3. Preservação	38
3.1 Liofilização	39
3.2 Ultracongelamento	39
4. Caracterização morfológica	40
5. Caracterização patogênica	40
5.1 Amplificação de genes da ilha de patogenicidade de <i>Streptomyces</i> por PCR ...	40
5.2 Teste de patogenicidade em minitubérculos de batata	41
6. Caracterização molecular	42
6.1 Extração de DNA cromossômico	42
6.2 Amplificação por PCR dos diferentes genes.....	43
6.3 Análises de PCR-RFLP (<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) do gene <i>atpD</i>	46
6.4 Sequenciamento	46
6.5 Análise de Multilocus.....	47
RESULTADOS	48
1. Isolamento e Preservação	49
2. Caracterização morfológica	49
3. Caracterização patogênica	57

3.1 Linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata	57
3.1.1 Amplificação dos genes <i>nec1</i> , <i>tomA</i> e operon <i>txtAB</i>	57
3.1.2 Teste de patogenicidade em minitubérculos de batata	62
3.2 Caracterização patogênica de linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.	64
3.2.1 Amplificação dos genes <i>nec1</i> , <i>tomA</i> e operon <i>txtAB</i>	64
3.2.2 Teste de patogenicidade em minitubérculos de batata	65
3.2.3 Patogenicidade das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.	71
4. Caracterização molecular	74
4.1 <i>Primers</i> espécie-específicos	74
4.2 Análises de PCR-RFLP do gene <i>atpD</i>	75
4.3 Análise de Multilocus das linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata	78
4.4 Análise de multilocus das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.	79
5. Identificação das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.	91
5.1 <i>Streptomyces scabiei</i> (Ssc)	91
5.2 <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> (Seu)	91
5.3 <i>Streptomyces caviscabies</i> / <i>Streptomyces setonii</i> (Sca/Sse)	92
5.4 <i>Streptomyces sampsonii</i> (Ssa)	93
5.5 <i>Streptomyces ipomoeae</i> (Sip)	94
5.6 Grupos (G) e linhagens com Perfis Genéticos Diferentes (PD)	95
5.6.1 Linhagens identificadas como espécies já descritas	97
5.6.1.1 Grupo 1 (<i>S. europaeiscabiei</i>)	97
5.6.1.2 Grupo 4 (<i>S. scabiei</i>)	98
5.6.2 Linhagens filogeneticamente próximas de <i>S. scabiei</i> , <i>S. stelliscabiei</i> e <i>S. europaeiscabiei</i> (genomoespécies de <i>S. scabiei</i>)	98
5.6.2.1 Linhagem IBSBF 2229	98
5.6.2.2 Linhagem IBSBF 2258	99
5.6.2.3 Grupo 9 (G9)	99
5.6.2.4 Grupo 10 (G10)	100

5.6.3 Linhagens filogeneticamente próximas de <i>S. scabiei</i>, <i>S. stelliscabiei</i>, <i>S. europaeiscabiei</i> e <i>S. acidiscabies</i>	102
5.6.3.1 Grupo 2 (G2) e linhagens relacionadas	102
5.6.3.2 Grupo 3 (G3) e linhagens relacionadas	103
5.6.3.3 Grupo 5 (G5)	105
5.6.3.4 Grupo 7 (G7)	106
5.6.3.5 Grupo 8 (G8)	108
5.6.4 Linhagens filogeneticamente próximas de <i>S. scabiei</i>, <i>S. stelliscabiei</i>, <i>S. europaeiscabiei</i>, <i>S. acidiscabies</i>, <i>S. turgidiscabies</i> e <i>S. reticuliscabiei</i>	108
5.6.4.1 Grupo 6 (G6)	108
5.6.4.2 Linhagem IBSBF 2804	109
5.6.5 Linhagem filogeneticamente próxima de <i>S. ipomoeae</i>	110
5.6.6 Linhagens filogeneticamente distantes das linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>	111
5.6.7 Outras linhagens com perfis genéticos diferentes	113
5.6.8 Linhagens com perfis genéticos diferentes não patogênicas em minitubérculos	113
6. Levantamento e distribuição das linhagens de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata no Brasil	114
DISCUSSÃO	118
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. utilizadas nesse estudo.....	32
Tabela 2. Linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna batata	37
Tabela 3. Pares de <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR para detecção de genes da ilha de patogenicidade de <i>Streptomyces</i>	41
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> que foram utilizados nas amplificações por PCR.....	44
Tabela 5. Pares de <i>primers</i> , regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos de PCR.	45
Tabela 6. Características morfológicas das linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata.	51
Tabela 7. Características morfológicas das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. analisadas nesse estudo.....	52
Tabela 8. Amplificação dos genes de patogenicidade <i>necI</i> , <i>tomA</i> e operon <i>txtAB</i> de linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> associadas à sarna da batata.....	60
Tabela 9. Resultado do teste de patogenicidade em minitubérculos de batata da variedade Ágata para as linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>	63
Tabela 10. Caracterização da patogenicidade das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. pela amplificação dos genes <i>necI</i> , <i>tomA</i> e operon <i>txtAB</i> e por teste de patogenicidade em minitubérculos de batata.....	66
Tabela 11. Balanço do número de linhagens de <i>Streptomyces</i> analisadas com relação ao conjunto dos três genes de patogenicidade avaliados e teste de patogenicidade em minitubérculos de batata.....	72
Tabela 12. Resultados das análises moleculares das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.	83
Tabela 13. Valores de similaridade de sequências de diferentes genes das linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. filogeneticamente próximas de <i>S. scabiei</i> , <i>S. stelliscabiei</i> e <i>S. europaeiscabiei</i>	102

Tabela 14. Valores de similaridade de sequências de diferentes genes das linhagens de *Streptomyces* sp. filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. acidiscabies*. 107

Tabela 15. Valores de similaridade de sequências de diferentes genes das linhagens de *Streptomyces* sp. filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei* 110

Tabela 16. Distribuição das espécies de *Streptomyces* e dos grupos genéticos por estado produtor de batata do Brasil..... 116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões nos tubérculos de batata causadas por <i>Streptomyces</i> sp.....	7
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	8
Figura 3. Diferentes tipos de sintomas de sarna da batata.....	15
Figura 4. Ciclo da sarna da batata	17
Figura 5. Organização genética da ilha de patogenicidade em <i>S. turgidiscabies</i>	18
Figura 6. Lesões nos tubérculos de batata provenientes de campos comerciais dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.	38
Figura 7. Esquema da avaliação do teste de patogenicidade de linhagens de <i>Streptomyces</i>	42
Figura 8. Micromorfologia das hifas de <i>Streptomyces</i> sp. isoladas em meio AA.....	50
Figura 9. Coloração dos esporos de linhagens de <i>Streptomyces</i> sp. em meio de cultivo YME.	51
Figura 10. Amplificação por PCR do gene <i>necI</i> das diferentes linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>	58
Figura 11. Amplificação por PCR do operon <i>txtAB</i> das diferentes linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>	59
Figura 12. Amplificação por PCR do gene <i>tomA</i> das diferentes linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>	60
Figura 13. Necrose em fatias de minitubérculos de batata da variedade Ágata após teste de patogenicidade.	66
Figura 14. Amplificação das linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> com o par de primers TurgI/TurgII.....	74
Figura 15. Produtos de amplificação correspondentes à parte do gene <i>atpD</i> das linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> digeridos com a enzima <i>Hae</i> III.....	77

Figura 16. Produtos de amplificação correspondentes à parte do gene <i>atpD</i> das linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i> digeridos com a enzima <i>Cfo</i> I.	77
Figura 17. Árvore filogenética construída a partir das sequências dos genes <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> e <i>trpB</i> das 12 linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>	79
Figura 18. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes <i>rpoB</i> , <i>atpD</i> , <i>recA</i> e <i>trpB</i> das linhagens de <i>Streptomyces</i> spp..	82
Figura 19. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes <i>rpoB</i> , <i>atpD</i> , <i>recA</i> , <i>trpB</i> e <i>gyrB</i> das linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.....	96
Figura 20. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes <i>rpoB</i> , <i>recA</i> e <i>trpB</i> das linhagens de <i>Streptomyces</i> spp.	112
Figura 21. Distribuição da sarna da batata em regiões produtoras de diferentes estados de acordo com a procedência das amostras recebidas no Laboratório de Bacteriologia Vegetal.	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

16S	RNA ribossomal em procariotos
16S-23S	região espaçadora entre os RNAs ribossomais 16S e 23S
AA	ágar-água
ABBA	Associação Brasileira da Batata
<i>atpD</i>	gene codificante da cadeia β da ATP sintase
BSA	albumina sérica bovina
°C	graus Celsius
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CFBP	<i>Collection Française de Bactéries Phytopathogène</i>
cm	centímetro
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAr	ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
g	gramas
G	grupo
<i>gyrB</i>	gene estrutural da subunidade B da DNA girase
h	hora
ha	hectare
HCl	ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBSBF	Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
Kb	Kilobases
Kg	Kilograma
LiCl	cloreto de lítio
LMG	<i>Laboratorium voor Microbiologie</i>

M	molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mL	Mililitro
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mM	milimolar
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
NaCl	cloreto de sódio
NaOCl	hipoclorito de sódio
n/a	não avaliada
<i>nec1</i>	gene que codifica proteína necrogênica Nec1
ng	nanograma
OMB	<i>Oatmeal Broth</i>
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Perfil Genético Diferente
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
qsp	quantidade suficiente para
<i>recA</i>	gene codificante da recombinase A
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RNAr	ácido ribonucleico ribossomal

rpm	rotações por minuto
<i>rpoB</i>	gene codificante da subunidade β da RNA polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SGM	<i>Streptomyces Growth Medium</i>
T	linhagem Tipo
t	tonelada
TAE	Tris - Acetato - EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
TE	Tris - EDTA
<i>tomA</i>	gene que codifica a tomatinase
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris- HCl	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico
<i>trpB</i>	gene codificante da subunidade B da triptofano sintase
<i>txtAB</i>	operon com os genes <i>txtA</i> e <i>txtB</i> que codificam sintetases da taxtomina A
<i>txtC</i>	gene <i>txtC</i> que codifica sintetase da taxtomina A
U	Unidade
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
YME	<i>Yeast Malt Extract</i>

RESUMO

.....

A batata ocupa o quarto lugar em volume de produção mundial de alimentos após o arroz, trigo e milho. O Brasil é o maior produtor dentre os países da América Latina, porém ainda apresenta baixa produtividade devida às doenças que afetam a cultura. Dentre as doenças bacterianas, a sarna da batata é uma das mais importantes economicamente e sua ocorrência é generalizada no mundo. Diferentes espécies do gênero *Streptomyces* estão associadas à essa doença e os principais sintomas se caracterizam por lesões irregulares que podem tomar toda a superfície do tubérculo, acarretando diminuição do seu valor comercial ou, até mesmo, impedindo a sua comercialização.

Atualmente, a incidência da sarna está aumentando consideravelmente, tornando-se um fator limitante do cultivo de batata no Brasil. O presente trabalho teve por objetivo a identificação de linhagens de *Streptomyces* sp. associadas à sarna da batata, provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, por meio de taxonomia polifásica. Cento e noventa linhagens de *Streptomyces* foram analisadas, sendo 165 nacionais obtidas dos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina; 13 de material vegetal importado do Chile, França e Holanda; e 12 linhagens Tipo de *Streptomyces* representantes de espécies associadas à sarna.

Na caracterização morfológica as linhagens apresentaram heterogeneidade com relação à micromorfologia de hifas e coloração dos esporos. A patogenicidade das linhagens foi avaliada pela presença dos genes *nec1*, *tomA* (tomatinase) e *txtAB* (taxtomina A) e os resultados indicaram que 94 linhagens (52,8%) apresentaram amplificação dos três genes de patogenicidade avaliados, 14 (7,9%) não apresentaram nenhum dos genes e 70 (39,3%) mostraram sinal positivo de amplificação para um ou mais genes. Para algumas linhagens a confirmação da patogenicidade foi efetuada por meio de testes em minitubérculos de batata. Nos testes moleculares, incluindo amplificação com *primers* específicos para *S. scabiei* e *S. turgidiscabies*, PCR-RFLP do gene *atpD* e análises das seqüências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*, foi possível a separação das linhagens analisadas em diferentes perfis genéticos.

As análises das características morfológicas, patogênicas e moleculares permitiram a identificação de 57 linhagens pertencentes à *S. scabiei*, 28 à espécie *S. ipomoeae*, 13 à *S. caviscabies*/*S. setonii*, 12 à *S. europaeiscabiei* e duas à *S. sampsonii*. As 66 linhagens restantes apresentaram características distintas das espécies Tipo testadas, podendo representar possíveis novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna no Brasil.

ABSTRACT

Potato is the world's fourth most important food crop after rice, wheat and maize. Brazil is the biggest producer among the countries of Latin America, but it still has low productivity due to diseases that affect the crop. Among the bacterial diseases, the potato scab is one of the most economically important, and its occurrence is widespread in the world. Different species of the genus *Streptomyces* are associated with this disease and the main symptoms are characterized by irregular lesions that can affect all the tuber surface causing decrease of its commercial value or preventing its commercialization.

Currently, the incidence of potato scab is increasing considerably, becoming a limiting factor in potato production in Brazil. This study aimed to identify *Streptomyces* strains associated with potato scab, from different potato growing areas in Brazil, through polyphasic taxonomy. One hundred and ninety strains of *Streptomyces* were analyzed, including 165 Brazilian strains obtained from potatoes coming from the states of Bahia, Goias, Minas Gerais, Parana, Sao Paulo, Rio Grande do Sul and Santa Catarina; 13 of plant material from Chile, France and Netherlands; and 12 type strains of *Streptomyces* species associated with potato scab.

In the morphological characterization, the strains showed heterogeneity in the hyphal micromorphology and color of spores. The pathogenicity of strains was investigated by presence of the *nec1* and *tomA* genes, and *txtAB* operon (thaxtomin A). The results indicated that 94 strains (52.8%) showed amplification of the three pathogenicity genes, 14 (7.9%) showed no amplification of the genes and 70 (39.3%) showed positive signal for only one or more genes. The pathogenicity of some strains was confirmed with artificial inoculation onto potato minitubers. In the molecular tests, including PCR amplification with specific primers for *S.scabiei* and *S. turgidiscabies*, analysis of PCR-RFLP of *atpD* gene and sequences analysis of the *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *trpB* genes, the strains could be separated into different genetic profiles.

The morphological, pathogenic and molecular data allowed identifying of 57 strains belonging to *S. scabiei*, 28 to *S. ipomoeae*, 13 to *S. caviscabies*/*S. setonii*, 12 to *S. europaeiscabiei* and two to *S. sampsonii*. The 66 remaining strains showed different genetic profiles in comparison with the type strains of *Streptomyces*, and may represent new species of *Streptomyces* associated with potato scab in Brazil.

INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma cultura de grande importância alimentícia e um dos alimentos mais completos em termos nutricionais, sendo o quarto alimento mais produzido no mundo, após o arroz, trigo e milho (BLASZCZAK et al., 2005). Essa cultura está presente na dieta de muitos países e sua produção e consumo estão em crescente aumento, principalmente nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina (FAO, 2008).

Segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), o Brasil é o maior produtor de batata da América Latina. Em 2010, a produção, destinada principalmente para o consumo interno, foi de 3,64 milhões de toneladas (t) em uma área de cerca de 143 mil hectares (ha), com uma produtividade de 25,48 t/ha (IBGE, 2010). Na última década houve aumento da produção e do rendimento por área, apesar da redução da área plantada.

Apesar do aumento crescente na produção, a produtividade ainda é considerada baixa devido principalmente às pragas e doenças que afetam a cultura. A batata é alvo de inúmeras doenças que podem ser causadas por fungos, bactérias e vírus e de pragas, como nematóides e insetos.

Dentre as doenças bacterianas, a sarna da batata é uma das mais importantes economicamente e de ocorrência generalizada nas regiões produtoras do Brasil. Atualmente, a incidência da sarna está aumentando consideravelmente, tornando-se um fator limitante do cultivo de batata no país. Os sintomas dessa doença se caracterizam por lesões que podem tomar toda a superfície do tubérculo acarretando diminuição do seu valor comercial ou até mesmo impedindo a sua comercialização.

Diferentes espécies do gênero *Streptomyces* são causadoras da sarna, sendo que os sintomas podem estar associados a mais de dez espécies distintas. Segundo Loria, Kers e Joshi (2006), o primeiro passo no desenvolvimento de uma estratégia de controle da sarna deve ser o levantamento das espécies patogênicas presentes por área produtora. Assim, estudos de caracterização e identificação de isolados nacionais são de extrema importância para o conhecimento das espécies patogênicas presentes nas diferentes regiões produtoras do Brasil e podem contribuir, ainda, para o desenvolvimento de metodologias de manejo da doença no país.

O presente trabalho teve por objetivo a identificação de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil por meio de taxonomia polifásica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Importância da cultura da batata e dados de produção

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é originária da região dos Andes e foi difundida para diversos países tornando-se uma cultura de grande importância alimentícia. Atualmente ocupa o quarto lugar em volume de produção mundial de alimentos após o arroz, trigo e milho (BLASZCZAK et al., 2005). Devido às suas características nutricionais a batata é um dos vegetais mais importantes na dieta alimentar de vários países e é considerada a segunda maior fonte de nutrientes para a humanidade, sendo superada somente pelo ovo. Além disso, é de fácil cultivo, com alto rendimento por área quando comparada a outras culturas e com demanda crescente de produção (FAO, 2010).

Segundo dados da FAO, em 2007, a produção mundial de batata foi cerca de 320 milhões de toneladas. Nos últimos dez anos, a produção mundial aumentou numa taxa de 4,5% ao ano. Inicialmente a maior produção ocorria em países desenvolvidos da Europa e América do Norte, mas atualmente os países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina assumiram a liderança na produção mundial, bem como no consumo desse alimento. Em 2008, os cinco maiores produtores de batata foram a China, Índia, Rússia, Estados Unidos e Alemanha. O Brasil assumiu o 15º lugar na produção mundial, sendo o maior produtor da América Latina (FAO, 2008).

A cultura da batata é de fundamental importância para o Brasil. Um levantamento, realizado no mês de setembro de 2010, indicou a produção de 3,64 milhões t de batata no ano, em uma área de cerca de 143 mil ha, com rendimento de 25,48 t/ha. Em relação à safra de 2009 houve um aumento de 6,1% na produção e de 4,6% no rendimento (IBGE, 2010).

Analisando dados da FAO, verificou-se que de 2000 a 2010 houve aumento da produção e rendimento da batata apesar da redução da área plantada (Anexo 1). Esses avanços ocorreram devido à profissionalização dos produtores e ao aumento das pesquisas que possibilitaram a indicação de melhores condições de cultivo e também melhoria na qualidade sanitária, fisiológica e genética da batata-semente (JADOSKI et al., 2009).

Ainda, segundo as projeções do agronegócio para o período de 2010 a 2020, realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de batata deverá crescer a uma taxa anual de 1,51%, atingindo 4,2 milhões t e a produtividade por hectare deverá aumentar 2,62%. Além disso, a melhoria tecnológica

introduzida deverá levar à redução de cerca de 1,08% da área destinada para o plantio dessa cultura (MAPA, 2010).

No Brasil, os principais estados produtores são Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul (IBGE, 2010). As cultivares mais plantadas no país são importadas sendo elas Ágata, Monalisa, Asterix, Atlantic, Cupido e Mondial. A cultivar mais plantada, Ágata, é muito produtiva, mas suscetível às doenças. A produção de batata atende ao mercado interno e o consumo anual é de cerca de 14 Kg por pessoa. Muito pouco do produto é destinado à exportação, principalmente sob a forma de batata processada (FAO, 2008).

2. Problemas fitossanitários

A baixa produtividade em nosso país, comparada a de países da América do Norte e Europa, deve-se, em parte, à falta de cultivares adaptadas às nossas condições climáticas e que tenham resistência às doenças encontradas em países de clima tropical e subtropical.

Como outras culturas destinadas à alimentação mundial, a batata é um produto suscetível a grandes perdas. Os problemas fitossanitários são responsáveis por perdas significativas diretas e pela elevação do custo de produção. Em termos de perdas diretas, atribuem-se perdas da ordem de 30% devido à incidência de doenças (SALLES, 2001).

A batata é suscetível a diversas doenças causadas por bactérias, fungos, nematóides, vírus e viróides. Dentre as moléstias de origem bacteriana de grande importância podemos citar a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, as podridões moles, ocasionadas por bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* e a sarna da batata, causada por bactérias do gênero *Streptomyces*, presentes no solo e que afetam as partes subterrâneas da planta, principalmente os tubérculos.

A ocorrência da sarna é generalizada nas regiões produtoras do Brasil (ABBA, comunicação pessoal). Esta é uma das doenças mais importantes economicamente, que reduz consideravelmente a comercialização do produto devido aos sintomas externos causados nos tubérculos (HOOKER, 1981). As lesões afetam a qualidade dos tubérculos, causando grandes perdas no valor comercial e rejeição do produto tanto para o consumo *in natura*, quanto para o processamento e produção de tubérculos-semente (Figura 1). Essa 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).

As diferentes espécies de *Streptomyces* causadoras da sarna não são hospedeiro-específicas e podem causar doenças em outras culturas como beterraba, rabanete, cenoura, nabo, repolho, salsa, batata-doce, berinjela e cebola, resultando também em perdas econômicas consideráveis (LAMBERT, 1991; GOYER; BEAULIEU, 1997; LORIA; KERS; JOSHI, 2006).



Figura 1. Lesões nos tubérculos de batata causadas por *Streptomyces* sp.

3. Espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata

As bactérias do gênero *Streptomyces* são Gram positivas, possuem estrutura filamentosa e esporos, uma alta proporção de citosina e guanina no DNA (66 a 78%) e, em sua maioria, um único cromossomo linear (LIN et al., 1993).

O ciclo de vida de *Streptomyces* é complexo, com produção de hifas aéreas que se diferenciam formando cadeias de esporos. Os esporos são uninucleados, resistentes à dessecação e podem ser carregados pela água ou por nematóides e artrópodes presentes no solo. Os esporos germinam independentemente de nutrientes e formam micélios ramificados multinucleados. A rede de filamentos secreta enzimas catabólicas que degradam o substrato orgânico quebrando-o em nutrientes assimiláveis que promovem, assim, o crescimento da colônia (LORIA; KERS; JOSHI, 2006) (Figura 2).

O crescimento do micélio vegetativo não ocorre indefinidamente. A privação de nutrientes e outros fatores ambientais ativam o desenvolvimento de hifas aéreas, que se fragmentam formando as cadeias de esporos (Figura 2). A cadeia de esporos de *Streptomyces* pode apresentar diferentes formatos e os esporos, diferentes colorações, sendo essas, características taxonômicas importantes (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

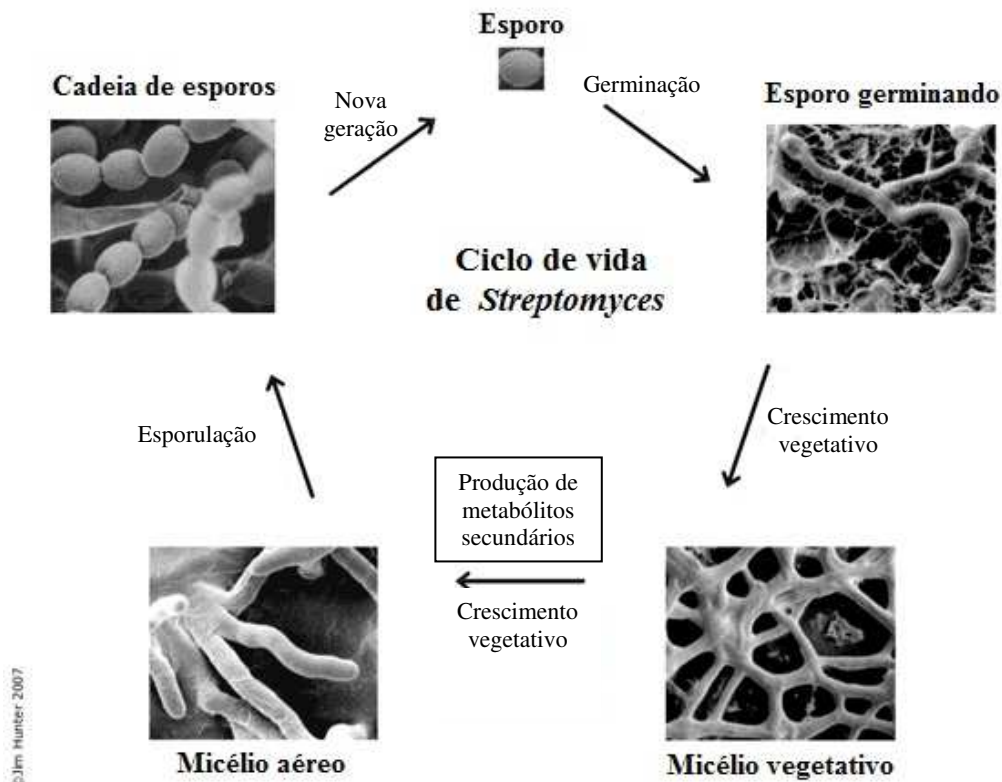


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Modificado do site <http://streptomyces.openwetware.org>

A senescência do micélio vegetativo é a fase na qual há grande produção e secreção de metabólitos secundários incluindo compostos antimicrobianos (HORINOCHI, 2002) (Figura 2).

O gênero *Streptomyces* é composto por 579 espécies (EUZÉBY, 2010) e a maior parte delas é saprófita que vive no solo, participando do processo de ciclagem de nutrientes, produzindo enzimas hidrolíticas para degradação de polímeros derivados de plantas e/ou animais, como celulose, lignina e quitina (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Esse gênero é conhecido também por sua habilidade em produzir metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos. Poucas espécies são fitopatógenas de órgãos subterrâneos de diferentes culturas economicamente importantes como a batata.

A sarna da batata pode ser causada por um grupo polifilético de 14 espécies do gênero *Streptomyces* que apresentam diferenças na morfologia, fisiologia, características moleculares e patogenicidade. Essas espécies foram bem caracterizadas e vêm sendo encontradas em diferentes países. São elas:

3.1 *S. scabiei*

A primeira espécie descrita como causadora da sarna foi *S. scabiei* (sin. *S. scabies*) (LAMBERT; LORIA, 1989a). Essa espécie, considerada a espécie patogênica dominante, está presente em todas as regiões produtoras do mundo, principalmente em solos secos, de pH neutro a alcalino. *S. scabiei* causa sintomas de sarna comum e apresenta filamentos miceliais muito finos, aéreos que se ramificam a partir de um eixo central e formam cadeias espirais de esporos de coloração cinza. Linhagens dessa espécie produzem pigmentos melanóides em meio de cultura contendo tirosina e utilizam todos os carboidratos estabelecidos pelo ISP (*International Streptomyces Project*) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

3.2 *S. acidiscabies*

Descrita por Lambert e Loria (1989b), esta espécie bacteriana tem como característica principal o crescimento em substratos com pH abaixo de 5,2, causando a sarna em tubérculos cultivados em solos ácidos. Foi detectada em 1953 ocorrendo em solos com valores de pH 4,5 na região de Maine (Canadá) (BONDE; McINTYRE, 1968; MANZER; McINTYRE; MERRIAM, 1977). Estudos recentes demonstraram predominância de *S. acidiscabies* sobre *S. scabiei* em isolamentos realizados em tubérculos de campos de produção na Coreia (MUN et al., 2007). Essa espécie também foi descrita em outras regiões, como o Japão, e atualmente está amplamente distribuída no mundo (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). *S. acidiscabies* possui micélios aéreos ramificados de cadeias flexuosas com esporos de coloração branca, rósea, laranja-palha, amarelo-palha ou laranja-cinza-palha. Não produz pigmentos melanóides, mas produz pigmento solúvel vermelho em pH acima de 8,3 e amarelo-dourado em pH abaixo desse valor. Dos carboidratos do ISP, essa espécie utiliza todos, exceto a rafinose (LAMBERT; LORIA 1989b).

3.3 *S. caviscabies* e *S. setonii*

S. caviscabies foi observada inicialmente por Faucher, Savard e Beaulieu (1992) e por Faucher e colaboradores (1995) causando sintomas da sarna profunda na região de Quebec, Canadá. Essa espécie foi caracterizada e descrita posteriormente por Goyer, Faucher e Beaulieu (1996). *S. caviscabies* apresenta micélios aéreos de cadeias do tipo flexuosas com esporos de coloração branca a amarelada, não é produtora de melanina, não

cresce em pH 4,5 e utiliza apenas rafinose como fonte de carbono, segundo o ISP. Geneticamente, difere das demais espécies de *Streptomyces* conhecidas (GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996).

Em estudo realizado por Liu e colaboradores (2005), com base em sequências do gene 16S RNAr, foi proposto que *S. caviscabies*, *S. setonii* (MILLARD; BURR, 1926) e *S. griseus* (KRAINSKY, 1914) pertençam a mesma espécie genômica com características morfológicas e quimiotaxonômicas em comum. Assim, *S. caviscabies* e *S. setonii* foram propostas como sinônimos de *S. griseus*.

3.4 *S. turgidiscabies*

Essa espécie foi observada ocorrendo na Ilha de Hokkaido (Japão) em 1995 (TANAKA et al., 1995) e foi descrita posteriormente por Miyajima e colaboradores (1998). É causadora de lesões do tipo erupente e causa sintomas que diferem daqueles usuais de sarna superficial ou profunda. Além disso, apresenta baixa similaridade em nível de DNA comparado com outras espécies causadoras da sarna comum (MIYAJIMA et al., 1998; KIM et al., 1998). Linhagens de *Streptomyces* isoladas na Finlândia e Coréia (SONG et al., 2004) apresentaram alta similaridade do gene 16S e região espaçadora 16S-23S rDNA com isolados do Japão, indicando a ocorrência desta espécie nesses países (KREUZE et al., 1999). *S. turgidiscabies* apresenta micélios aéreos com ramificações formando cadeias de esporos flexuosas de coloração cinza. Não produz pigmentos melanóides ou outros pigmentos difusíveis e utiliza todos os carboidratos (ISP) como fonte de carbono. Assim como *S. acidiscabies*, essa espécie é tolerante às condições de pH ácido (MIYAJIMA et al., 1998).

3.5 *S. reticuliscabiei*

Espécie causadora da sarna reticulada, isolada na França e descrita por Bouček-Mechiche e colaboradores (2000). *S. reticuliscabiei* possui cadeias flexuosas com esporos de coloração cinza e não é produtora de melanina em meio de tirosina. Utiliza todos os açúcares ISP como fonte de carbono (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

3.6 *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*

Bouček-Mechiche e colaboradores (2000) analisando linhagens com características morfológicas e fisiológicas de *S. scabiei* demonstraram que essas eram fenotipicamente

heterogêneas e podiam ser divididas em três genomoespécies, *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*. Ou seja, essas linhagens apresentavam características morfológicas semelhantes, mas podiam ser diferenciadas por algumas características bioquímicas.

A espécie *S. europaeiscabiei* foi descrita na França (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000) e relatada em diferentes países da Europa. Um levantamento realizado em diferentes campos de produção de países como Alemanha, Espanha, França, Holanda e Reino Unido indicou que *S. europaeiscabiei* foi a principal espécie associada à sarna da batata, constituindo-se, portanto, em patógeno emergente naquela região da Europa (FLORES-GONZALES; VELASCO; MONTES, 2008). Esta espécie bacteriana também já foi relatada no Canadá, Coréia e Estados Unidos (SONG et al., 2004; WANNER, 2006).

S. europaeiscabiei produz esporos de coloração cinza em cadeias espiraladas, é produtora de melanina em meio com tirosina e utiliza todos os carboidratos ISP. É sensível a 20 µg de estreptomicina e não cresce em meio contendo 0,5 µg/mL de cristal violeta. Além de tubérculos de batata, esta espécie também foi detectada em beterraba, cenoura e rabanete (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

A espécie *S. stelliscabiei*, possui características muito semelhantes à *S. europaeiscabiei*, no entanto foi isolada de lesões de sarna comum em forma de estrela em tubérculos de batata na França (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

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

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

S. luridiscabiei apresenta esporos de coloração amarelo claro em cadeias flexuosas simples e retas; *S. puniscabiei* produz esporos alaranjados, em cadeias retas e *S. niveiscabiei* produz esporos brancos e cadeias de esporos simples, flexuosas e retas. Essas espécies utilizam todos os carboidratos do ISP. Somente a espécie *S. niveiscabiei* não produz melanina.

3.8 *S. ipomoeae*

Essa espécie é causadora da sarna da batata-doce e foi descrita no início da década de quarenta por Person e Martin (1940) e Waksman e Henrici (1941). Os esporos apresentam-se em cadeias curtas, espiraladas abertas, envolvidas por uma bainha e são de coloração azul em meio de cultivo SGM (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). *S. ipomoeae* é morfológica e fisiologicamente distinta de outras espécies causadoras da sarna. Enquanto *S. scabiei* e *S. acidiscabies* são patógenos de batata e de outras culturas, *S. ipomoeae* é específica de batata doce e outros membros da família Convolvulaceae (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

Além das espécies descritas anteriormente, ainda são citadas as espécies *S. aureofaciens*, considerada um organismo de solo que eventualmente pode incitar doenças em batata, causando lesões superficiais (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001) e *S. sampsonii*, considerada saprófita, mas que já foi isolada de lesões de sarna (LAMBERT; LORIA, 1989a).

4. Diferentes tipos de sarna da batata

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 da virulência do patógeno (LORANG et al., 1995; TOTH et al., 2001).

O ambiente determina as condições favoráveis ou desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno. A cultivar tem influência no desenvolvimento da doença de acordo com sua resistência/suscetibilidade à infecção pelo patógeno. No caso da ocorrência da infecção as principais variações nos sintomas e na severidade da doença são determinadas pelo patógeno causador e seu grau de virulência. Assim, podem ocorrer diferentes tipos de lesões (superficial, profunda ou erupente), com diferentes aspectos (lisa, áspera, reticulada ou em forma de estrela) e colorações (pardo-clara, pardo-escura e avermelhada) (Figura 3).

Essa variação nos sintomas permite a classificação em diferentes tipos de sarna, como sarna comum, ácida, profunda, erupente, reticulada ou avermelhada.

4.1 Sarna comum, sarna ácida e sarna erupente

A sarna comum, sarna ácida e sarna erupente são diferentes nomes para a mesma doença e são denominadas com base nas características das lesões e do(s) patógeno(s) a ela associado(s). Todos os três tipos são caracterizados por sintomas típicos de sarna, relacionados com a produção de taxtomina pelo patógeno (LORIA et al., 1997). Uma vez que o mecanismo de patogenicidade envolvido é o mesmo, a doença pode ser referida apenas como sarna comum. No entanto, a associação de diferentes patógenos a alguns tipos de sintomas e as características ambientais para o desenvolvimento da doença permitem a denominação de sarna comum àquela associada à *Streptomyces scabiei*, que ocorre em solos com pH acima de 5,2; sarna ácida à doença provocada por *S. acidiscabies*, que ocorre em solos ácidos com pH em torno de 4,5; e sarna erupente àquela causada pela espécie *S. turgidiscabies*.

A sarna comum é predominante no mundo e os patógenos causadores produzem a taxtomina, uma toxina que atua necrosando o tecido, levando aos sintomas característicos da doença (LAWRENCE; CLARK; KING, 1990). As lesões são tipicamente arredondadas, mas podem coalescer cobrindo porções significantes do tubérculo. Apresentam uma textura áspera e corticosa e variam em profundidade e coloração, de pardo-clara a pardo-escura (LORIA et al., 1997).

A lesão levemente elevada e com aspecto áspero é o que nomeia essa doença. No entanto, as lesões podem ser mais elevadas, ter pontos aprofundados no centro ou serem superficiais (CULLEN; LEES, 2007). A profundidade da lesão está associada à virulência do patógeno, sendo que quanto mais superficiais, menos virulento o patógeno. Lesões elevadas e profundas caracterizam maior virulência do patógeno (LORIA et al., 1997).

As espécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. niveiscabiei* são produtoras da taxtomina e causadoras da sarna comum da batata. Já as espécies *S. luridiscabiei* e *S. puniscabiei* produzem lesões características dessa doença, mas a produção de taxtomina não foi confirmada nesses patógenos (PARK et al., 2003b).

A espécie *S. ipomoeae* que causa a sarna em batata-doce também produz a taxtomina. Essa bactéria ataca as raízes causando manchas necróticas deprimidas. Causa a necrose em raízes fibrosas e lesões de sarna nas raízes tuberosas em qualquer estágio do

desenvolvimento. *S. ipomoeae* pode sobreviver no solo por vários anos, mesmo na ausência de batata-doce, e sua gama de plantas hospedeiras é, provavelmente, limitada à família Convolvulaceae (COELHO; RIBEIRO; MARIANO, *In*: KIMATI et al., 1997).

4.2 Sarna profunda

A espécie *S. caviscabies* e *S. setonii* são causadoras da sarna profunda, causando lesões aprofundadas e sem a associação da taxtomina no desenvolvimento dos sintomas (GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996). O sintoma de sarna profunda assemelha-se àquele da sarna comum, quando as lesões são mais aprofundadas, no entanto por não apresentarem a produção de taxtomina essas espécies não podem ser incluídas no grupo das causadoras de sarna comum.

4.3 Sarna reticulada e avermelhada

As sarnas reticulada e avermelhada não estão associadas com a produção de taxtomina e são causadas por espécies diferentes daquelas que causam a sarna comum. Nessas doenças a infecção da raiz parece ser um evento importante no seu desenvolvimento. Os patógenos afetam todas as partes enterradas da planta e poucas cultivares de batata (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Esses dois tipos de sarna apresentam sintomas semelhantes e são caracterizadas por lesões superficiais de coloração marrom e com aspecto de rede nos tubérculos de batata. Na sarna avermelhada, adicionalmente ao aspecto reticulado, as lesões apresentam coloração avermelhada (HARRISON, 1962; BANG, 1979; SCHOLTE; LABRUYÈRE, 1985). As lesões são necróticas e ásperas, mas nunca elevadas ou profundas como na sarna comum.

Mesmo com a similaridade de sintomas esses dois tipos de sarna podem ser diferenciados pelas espécies de *Streptomyces* envolvidas, suscetibilidade das cultivares, bem como temperatura ótima para o desenvolvimento da doença (SCHOLTE; LABRUYÈRE, 1985). A sarna reticulada é causada por *S. reticuliscabiei* e a sarna avermelhada por linhagens relacionadas à *S. aureofaciens* e *S. griseus* (FAUCHER et al., 1993). Além disso, a sarna reticulada foi descrita em países europeus (SCHOLTE; LABRUYÈRE, 1985), enquanto que a sarna avermelhada foi relatada na América do Norte (HARRISON, 1962; FAUCHER et al., 1993) e Japão (ONIKI et al., 1986).

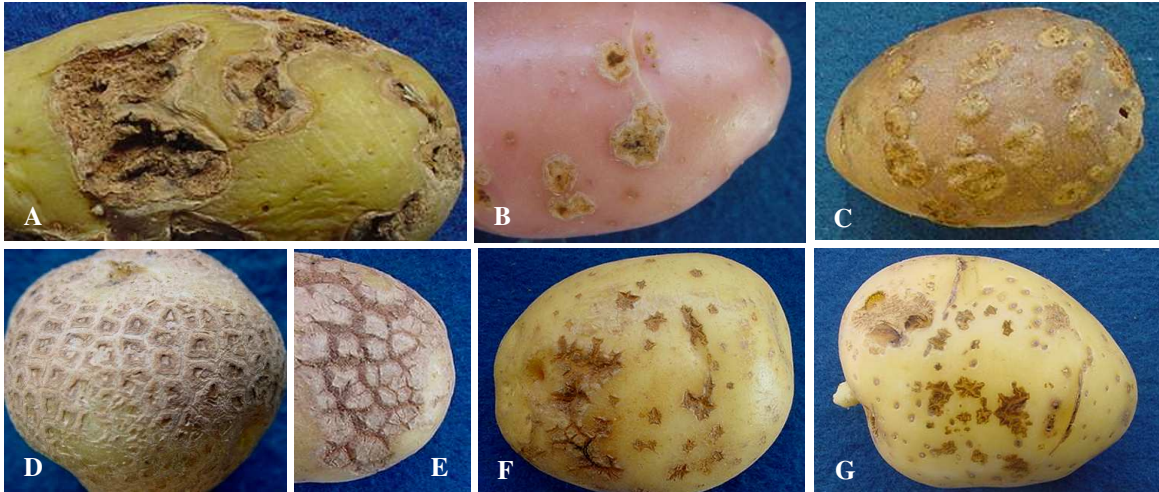


Figura 3. Diferentes tipos de sintomas de sarna da batata. (A) Lesão de sarna profunda; (B) superficial; (C) erupvente; (D e E) Aspecto de sarna reticulada; (F) em forma de estrela e (G) sarna avermelhada.

5. Ciclo da doença

As espécies de *Streptomyces* sobrevivem saprofiticamente no solo ou em tecidos de planta infectados, sob a forma vegetativa micelial ou de esporos. Os esporos podem sobreviver em solos secos por longos períodos, porém as hifas não são tolerantes à alta umidade do solo. Segundo Mayfield e colaboradores (1972), os esporos contêm um envoltório externo e parede mais espessa, os quais conferem maior resistência ao calor e à seca. Estas estruturas permanecem no solo em aglomerados próximos a restos de cultura e produzem hifas que se desenvolvem radialmente, o que facilita sua dispersão.

O esporo germina e pode ser disseminado por chuva, vento, vetores ou até mesmo por tubérculos infectados. Com relação à influência de vetores na epidemiologia da sarna da batata, alguns insetos podem proporcionar a disseminação da bactéria no solo, bem como promover a entrada da doença no tubérculo (MANZER; STORCH; SEWELL, 1984). Ainda, o inóculo contido nos tubérculos de batata contribui para a dispersão da doença e introdução do patógeno em novas áreas (WILSON; RANSON, PEMBERTON, 1999). Experimentos conduzidos em casa de vegetação por Lehtonen, Rantala e Kreuze (2004) indicaram que *S. scabiei* e *S. turgidiscabies* podem estar presentes na mesma lesão e serem transmitidos via tubérculos após seis meses de armazenamento. Esses autores verificaram ainda que *S. turgidiscabies* foi mais tolerante ao manuseio e armazenamento que *S. scabiei*.

Ao encontrar um tubérculo no início de seu desenvolvimento, esporos de *Streptomyces* penetram através de estruturas como as lenticelas, estômatos ou ferimentos (AGRIOS, 1997) (Figura 4). Se os tubérculos estão secos durante o período de penetração, as bactérias antagônicas aos patógenos, normalmente presentes nas lenticelas, desaparecem facilitando a infecção. Além disso, em solos secos, durante o crescimento dos tubérculos são produzidos ferimentos pelos quais os patógenos penetram (LEWIS, 1971).

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

O patógeno invade primeiramente as lenticelas na superfície do tubérculo ou qualquer outra abertura provocada por ferimento. Após a penetração, o patógeno coloniza inicialmente os espaços intercelulares e, logo após, os intracelulares (ADAMS; LAPWOOD, 1978). A bactéria cresce entre as camadas da periderme, nutrindo-se do tecido morto (AGRIOS, 1997) e produz fitotoxinas, como taxtominas, que induzem a produção de suberina nas células adjacentes e levam à formação de uma camada corticosa ao redor do tecido infectado, que ao se intensificar empurra a periderme infectada para o exterior tornando a superfícies áspera e suberificada (sintoma de sarna) (BABCOCK; ECKWALL; SCHOTTEL, 1993). Este ciclo ocorre muitas vezes durante o crescimento do tubérculo, aumentando o tamanho da lesão. Assim quanto mais cedo o tubérculo for infectado, maior será a extensão da lesão (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008) (Figura 4).

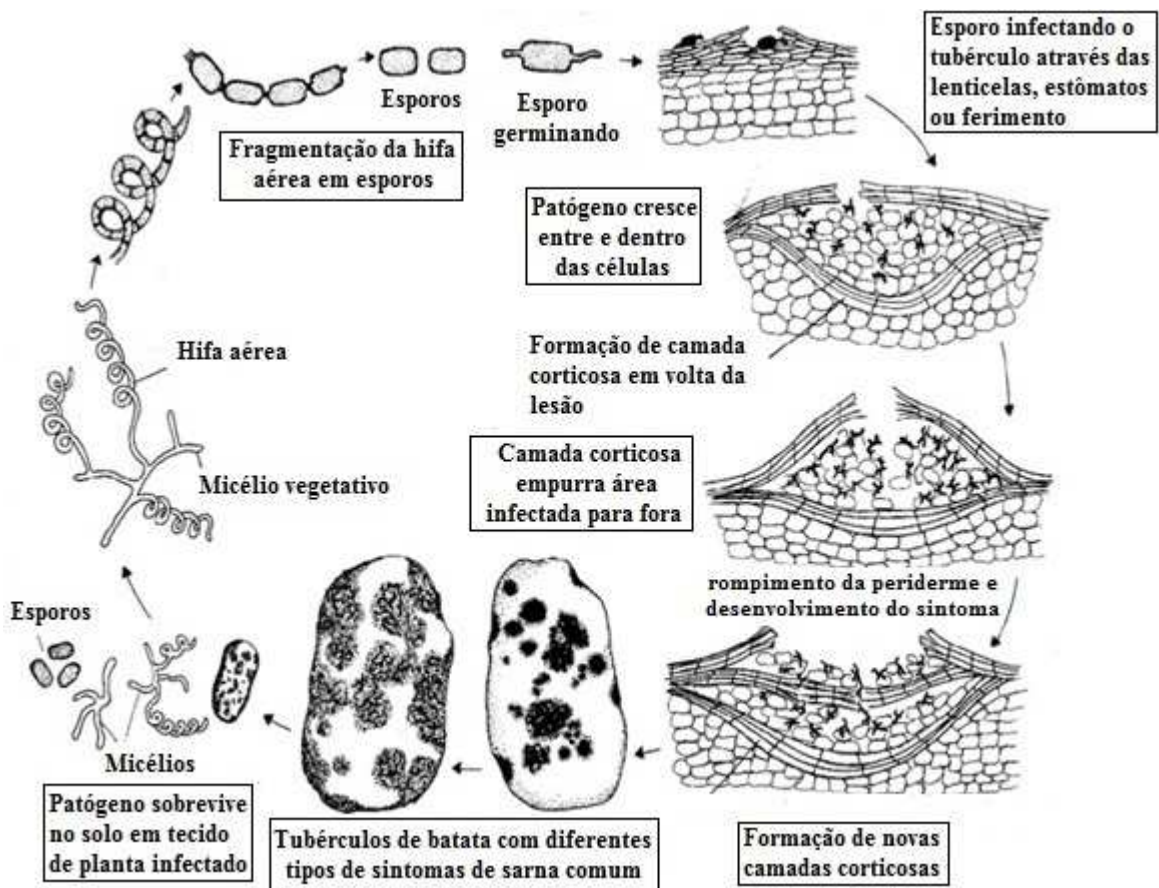


Figura 4. Ciclo da sarna da batata, modificado de Agrios (1997).

6. Patogenicidade em *Streptomyces*

Apesar da diversidade genética das linhagens de *Streptomyces* fitopatogênicas, os mecanismos e os genes responsáveis pela patogenicidade são compartilhados entre as espécies causadoras da sarna comum (WANNER, 2006).

A maioria das espécies possui uma região do genoma denominada ilha de patogenicidade, uma classe distinta de ilhas genômicas adquiridas por transferência horizontal que possui diferentes genes que contribuem para a virulência. A ilha de patogenicidade pode ser transmitida para outras linhagens durante o processo de conjugação e inserir-se em sítios específicos no cromossomo linear de espécies receptoras levando ao surgimento de novas linhagens ou espécies patogênicas em sistemas agrícolas. Essa transmissão de genes de patogenicidade explica a natureza polifilética de espécies causadoras da sarna, conferindo a característica de patogenicidade em espécies até então não patogênicas (KERS et al., 2005; LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Essa ilha de patogenicidade foi descrita inicialmente para a espécie *S. turgidiscabies* e agrupa os genes *txtAB*, *txtC* e *nos* de síntese da fitotoxina taxtomina A, da proteína indutora de necrose (gene *nec1*) e de fatores de patogenicidade como a tomatinase (gene *tomA*), entre outros (Figura 5). Estudos recentes sugerem que essa ilha de patogenicidade foi transferida horizontalmente, em eventos independentes, de linhagens de *S. scabiei* para espécies saprófitas criando as espécies *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies* (WANNER, 2006).

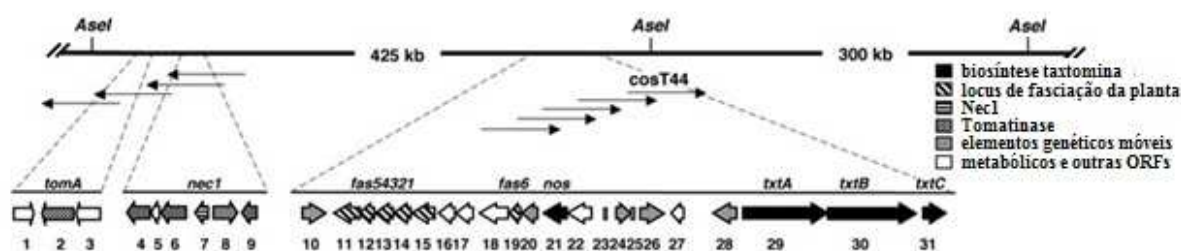


Figura 5. Organização genética da ilha de patogenicidade em *S. turgidiscabies*, modificado de Kers e colaboradores (2005).

A patogenicidade de *Streptomyces* é considerada altamente evoluída envolvendo a ligação ao hospedeiro, penetração, colonização e evasão do sistema de defesa da planta (LORIA et al., 2008). Diferentes fatores de patogenicidade estão envolvidos em cada um desses eventos: a fitotoxina taxtomina atua principalmente na ligação, penetração e colonização; já a proteína Nec1 e a tomatinase auxiliam na evasão da defesa do hospedeiro. Assim, a patogenicidade de linhagens de *Streptomyces* requer a produção coordenada de uma variedade de produtos, incluindo múltiplos metabólitos secundários e proteínas secretadas (LORIA et al., 2008).

A produção de taxtomina por espécies 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 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). Essa toxina atua inibindo a biossíntese de celulose, o que compromete a integridade da parede celular, levando à hipertrofia e morte celular programada. A taxtomina é responsável, portanto, pelos sintomas característicos de sarna (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

O gene *nec1* é conservado entre a maioria de *Streptomyces* spp. causadoras da sarna e codifica a proteína necrogênica Nec1, que é secretada e representa um fator de virulência independente (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998). Esse gene é também estrutural e funcionalmente conservado entre espécies patogênicas e está ausente em formas não patogênicas. Estudo recente realizado por Joshi e colaboradores (2007) propõe que a proteína Nec1 atue suprimindo a resposta de defesa da planta.

As tomatinases codificadas pelo gene *tomA* hidrolizam a alfa-tomatinase e o produto dessa hidrólise reprime a resposta de defesa induzida da planta, interferindo em processos de transdução de sinal que são essenciais para a resistência à doença (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Algumas espécies de *Streptomyces* não produzem taxtomina, nem a proteína Nec1, causando sintomas de sarna diferentes daqueles observados na sarna comum, como lesões de aspecto reticulado ou de coloração avermelhada. Nessas espécies não estão presentes os genes da ilha de patogenicidade descrita, sendo que estas provavelmente utilizam outras vias ainda não estudadas. Sabe-se que a infecção da raiz parece ser um evento importante no desenvolvimento da doença causada por essas espécies (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

A avaliação da presença dos genes da ilha de patogenicidade, principalmente do operon *txtAB*, dos genes *nec1* e *tomA* tem sido utilizada para a caracterização patogênica de *Streptomyces*, diferenciando linhagens patogênicas de saprófitas presentes nas lesões de sarna. Diferentes estudos demonstraram a correlação entre a patogenicidade de *Streptomyces* spp. e a detecção dos genes de patogenicidade, principalmente daqueles relacionados à biossíntese de taxtomina e da proteína necrogênica Nec1, sendo que espécies não patogênicas, não apresentam esses genes (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998; WANNER, 2006). Assim, a amplificação por PCR dos genes de patogenicidade pode ser utilizada como uma ferramenta complementar para caracterização e detecção de linhagens de *Streptomyces* patogênicas causadoras da sarna, substituindo, em alguns casos, os testes de patogenicidade (CULLEN; LEES, 2007). Para as outras espécies de *Streptomyces* causadoras da sarna, que não possuem os genes descritos, é fundamental a avaliação da patogenicidade utilizando tubérculos de batata.

6.1 Taxtomina e os diferentes tipos de lesões de sarna

A análise molecular de genes ligados à patogenicidade de *Streptomyces* esclareceu a base genética das doenças classificadas como sarna comum. Nessas doenças a maior parte das espécies causadoras e indutoras dos sintomas de sarna é capaz de sintetizar taxtominas. Já as espécies causadoras de sintomas de sarna reticulada ou avermelhada são excluídas desta generalização e a produção de taxtominas não está envolvida na patogenicidade (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

A taxtomina, produzida por algumas espécies, está presente em tecidos do hospedeiro que foram infectados e é responsável pelos sintomas característicos da sarna. Essa toxina afeta a biossíntese da celulose que ocorre somente em tecidos meristemáticos da planta onde as células estão se dividindo e expandindo, como nos tubérculos de batata. Essa é a razão pela qual plantas e tubérculos adultos adquirem resistência à taxtomina A (LORIA et al., 1997).

Durante a expansão da parede celular vegetal ocorre a liberação de celobiose e outras subunidades da celulose que ativam os fatores de transcrição responsáveis pela síntese de taxtomina pelo patógeno. A taxtomina age na membrana plasmática de células vegetais, provocando alterações na permeabilidade seletiva e interferindo na deposição de celulose, o que compromete a integridade da parede celular (GARCIA, 2008; LORIA et al., 2008). A estrutura da parede celular comprometida combinada com a natureza filamentosa dos estreptomicetos permite a penetração do patógeno nos tecidos em expansão, ocupando os espaços intra e intercelulares. Além disso, a taxtomina pode também estimular a liberação de outras subunidades da celulose gerando um *feedback* positivo, que estimula sua produção (LORIA et al., 2008).

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 substância 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, 1997).

Estruturas especializadas de infecção e crescimento do patógeno nos espaços inter e intracelulares já foram previamente documentados em *S. ipomoeae*, espécie que também é produtora de taxtomina e causa a sarna da batata-doce (LORIA et al., 2008).

As diferenças na agressividade das espécies e os tipos de lesões produzidas podem estar relacionados com a produção e a concentração da taxtomina no local da infecção. Assim, nas lesões elevadas, as mais comuns, a taxtomina A inibe o desenvolvimento da parede celular nas áreas de crescimento rápido do tubérculo e causam a hipertrofia celular (FRY; LORIA, 2002). Já as lesões deprimidas, estão relacionadas com a morte celular também induzida pela taxtomina.

A espécie *S. turgidiscabies*, que causa sintomas de sarna erupente, possui em sua ilha de patogenicidade o gene *fas*. Esse gene atua na produção de citocininas (hormônios) que causam a divisão celular vegetal e hipertrofia dos tecidos (KERS et al., 2005).

A espécie *S. ipomoeae*, que causa sintomas de sarna em batata-doce, produz principalmente as taxtominas A e C, sendo essa última a mais abundante. Estudos revelaram diferenças na regulação da produção dessas toxinas e gama de hospedeiros acometidos por essa espécie (HEALY et al., 2000).

7. Controle da sarna da batata

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

Considerando os fatores favoráveis ao desenvolvimento da doença, diferentes estratégias de controle podem ser adotadas a fim de se reduzir a incidência e severidade da sarna da batata. Dentre elas, pode-se citar:

7.1 Uso de cultivares resistentes

O uso de cultivares resistentes representa uma das principais formas de controle de doenças de plantas, pois evita ou reduz o uso de defensivos, diminuindo o impacto ambiental e os custos de produção (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995).

As cultivares de batata mais utilizadas para plantio em regiões produtoras do Brasil são suscetíveis ou apresentam somente resistência parcial à sarna. Em estudo realizado por Garcia (2008), as cultivares de batata Monalisa, Cupido, Ágata e Asterix foram consideradas suscetíveis, sendo que Atlantic e Mondial foram indicadas como mais apropriadas para plantio em regiões com histórico de sarna, uma vez que mostraram maior resistência às linhagens de *Streptomyces* avaliadas no estudo.

A resistência de cultivares é muito difícil de ser alcançada, visto que a taxotomina não é hospedeiro específica (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Além disso, variedades de batata com níveis razoáveis de resistência ou tolerância à sarna não estão disponíveis para todas as áreas e mercados, e, ainda, podem se tornar infectadas em solos com alta densidade de inóculo e condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

O mecanismo de tolerância à sarna em batata é complexo e é determinado, em parte, pela morfologia das lenticelas no tubérculo, que nas variedades tolerantes são menores e com maior acúmulo de parênquima. Aparentemente esse mecanismo também tem relação com a quantidade de ácido clorogênico e tirosinase presentes na periderme do tubérculo, uma vez que, por ocasião de injúrias no tecido, ocorre oxidação desses compostos com formação de substâncias tóxicas aos microrganismos, como as quinonas (LUTMAN, 1914).

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 carga 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 a novas cultivares de batata; ou linhagens que adquiriram novas características de virulência (WANNER, 2007).

7.2 Uso de batata semente certificada

Linhagens fitopatogênicas de *Streptomyces* podem sobreviver em tecidos de plantas infectados (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008). Assim, a certificação dos tubérculos é uma medida importante que pode garantir a sanidade do material vegetal, evitando com isso a disseminação do patógeno para novas regiões.

7.3 Tratamento dos tubérculos

A introdução de *Streptomyces* em campos indenes deve ser evitada utilizando-se tubérculos certificados. Por outro lado, a ausência de sintomas de sarna nos tubérculos não significa necessariamente que a bactéria não esteja presente na superfície do mesmo. Assim, o tratamento dos tubérculos pode ser realizado para a prevenção da disseminação da bactéria (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

Resultados diversos têm sido verificados na literatura com relação à eficácia do tratamento químico de tubérculos semente. Fungicidas como Fluazinam, Flusulfamida, Fenpiclonil e Mancozeb proporcionaram controle razoável da sarna em experimentos desenvolvidos na Austrália (WILSON; RANSON; PEMBERTON, 1999). Por outro lado, somente o fungicida Flusulfamida mostrou-se promissor em experimentos realizados na África do Sul (GOUWS, 2006).

7.4 Manutenção da umidade do solo

A umidade elevada do solo desfavorece a doença, pois o patógeno se desenvolve melhor em solos porosos e aerados do que em solos encharcados. Além disso, solos úmidos, principalmente no período inicial de formação do tubérculo (4 a 6 semanas), propiciam elevada taxa de crescimento de antagonistas, maior disponibilização de manganês e concentrações reduzidas de oxigênio. Essas condições desfavorecem o crescimento de *Streptomyces* patogênicos, pelo controle biológico dos mesmos, já que os microrganismos antagonistas, em condições favoráveis, movem-se mais rapidamente, colonizando e protegendo as lenticelas da infecção (LEWIS, 1971).

A eficácia dessa prática é influenciada por alguns fatores como a cultivar de batata utilizada, o tipo de solo e as condições climáticas como a temperatura (LAPWOOD, 1972). Ainda, apesar da umidade do solo ser uma estratégia de manejo, há relatos de surtos da

doença em solos úmidos e irrigados, como no Canadá, Europa e Israel (DOERING-SAAD et al., 1992; GOYER; FAUCHER; BEAULIEU, 1996; LINDHOLM et al., 1997).

7.5 Acidificação do solo

O uso de adubações nitrogenadas na forma de sulfato de amônio diminui o pH do solo e desfavorece a ocorrência de *Streptomyces scabiei* e demais espécies, entretanto, essa medida não se aplica para *S. acidiscabies* que tolera pH inferiores a 5. Ainda, essa prática pode levar à redução da produção da batata, uma vez que os nutrientes do solo são melhores disponibilizados em pH maiores, próximos de 6,5 e também limita as espécies vegetais que podem ser empregadas na rotação de culturas (LAMBERT; LORIA, 1989b).

7.6 Rotação de culturas

A rotação de culturas é um fator importante a ser considerado no planejamento de lavouras de produção de batata. Este fator de manejo não está relacionado somente com as características fitossanitárias, mas também com a fertilidade e estruturação do solo. O uso da rotação com cereais e gramíneas não hospedeiros de *Streptomyces*, como arroz e trigo, por exemplo, possibilitaram a redução da população dos patógenos e aumentaram a difusão de oxigênio, muito consumido pelo sistema radicular da batata (JADOSKI et al., 2009).

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

7.7 Controle químico

Diversos trabalhos descrevem o uso do controle químico de *Streptomyces*, no entanto os compostos químicos utilizados atualmente têm mostrado variação no grau de eficácia, na relação custo/benefício, além de diversos fatores que influem no desenvolvimento da sarna (RODRIGUES NETO; DESTÉFANO; SHIMOYAMA, 2008).

O método mais utilizado mundialmente no controle químico de *Streptomyces* é o tratamento do solo com quitosano antes do plantio. Há diversas desvantagens no uso dessa

técnica, visto que, essa substância é carcinogênica e pode prejudicar a produção (GOUWS, 2006).

Outra substância também utilizada é o sulfato de amônio (fertilizante), responsável pela diminuição do pH do solo e pelo aumento da concentração de alumínio solúvel que estimula o crescimento de comunidades de organismos antagônicos aos *Streptomyces* patogênicos à batata. Entretanto, a eficácia desse composto depende do tipo de solo, bem como da temperatura e umidade (MIZUNO; YOSHIDA; TADANO, 2000; STURZ et al., 2004).

Ainda, o composto lignosulfato de amônio foi capaz de reduzir a severidade da doença e a incidência da sarna em plantios seguintes de batata quando utilizado em experimentos realizados em campos comerciais na região de Ontário, Canadá (SOLTANI et al., 2002).

8. Legislação

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

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

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

9. Taxonomia e Caracterização

A caracterização de isolados de *Streptomyces* pode ser realizada com base em testes fenotípicos e bioquímicos (WILLIAMS et al., 1983; FAUCHER et al., 1995; PARADIS et al., 1994). No entanto, esses testes demandam longo tempo e técnicas elaboradas, sendo que, nem sempre é possível a determinação precisa da espécie.

Os métodos moleculares baseados nas análises de seqüências de DNA são realizados em menor tempo e oferecem maior precisão e sensibilidade na identificação de microrganismos quando comparados aos métodos convencionais de análise de caracteres fenotípicos. Diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas para a taxonomia e caracterização de espécies de *Streptomyces* causadoras da sarna da batata tais como: hibridização DNA-DNA (HEALY; LAMBERT, 1991; BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000), análises da seqüência do gene ribossomal 16S (TAKEUCHI et al., 1996; KREUZE et al., 1999), da região espaçadora 16S-23S (SONG et al., 2004), do gene *rpoB* (MUN et al., 2007); e presença de genes de patogenicidade, como os genes *nec1*, *tomA* e operon *txtAB* (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998; PARK et al., 2003b; WANNER, 2006).

A maioria dos métodos moleculares utilizados em estudos de taxonomia de *Streptomyces* são baseados em seqüências do gene 16S RNAr. Entretanto, em alguns estudos realizados, análises desse gene não foram elucidativas para a diferenciação de espécies de *Streptomyces* muito relacionadas, devido à baixa variabilidade encontrada na seqüência do gene (ANDERSON; WELLINGTON, 2001; KIESER et al., 2004; SONG et al., 2004; GUO et al., 2008).

A região espaçadora 16S-23S DNAr foi avaliada como marcador molecular para a análise filogenética de linhagens de *Streptomyces* isoladas na Coréia (SONG et al., 2004) e não apresentou capacidade de discriminação das principais espécies. Contrariamente, em outro estudo, essa região foi utilizada na caracterização da diversidade de *Streptomyces* pela técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) e foram observadas regiões variáveis, que poderiam servir como alvo para o desenho de *primers* espécie-específicos (PARK; KILBANE II, 2006).

Como estratégia para resolver a filogenia de linhagens proximamente relacionadas e com pouca resolução nas árvores filogenéticas de seqüências do gene 16S RNAr e da

região espaçadora 16S-23S DNAr, pode-se utilizar a técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

A técnica de MLST, envolvendo a análise combinada das sequências de diferentes genes, tem sido aplicada com sucesso para caracterização de patógenos bacterianos e para análises filogenéticas de grupos altamente diversos de bactérias pela sua alta eficiência de resolução inter e intra-específica (GUO et al., 2008). Esta técnica foi proposta em 1998 como uma ferramenta molecular alternativa em estudos de sistemática microbiana e consiste no sequenciamento e análise de fragmentos de 5 a 7 genes conservados (geralmente *housekeeping*), espaçados ao longo do genoma bacteriano com pelo menos 100 kilobases (Kb) de distância (MAIDEN et al., 1998). Dados de MLST são empregados na identificação e classificação de microrganismos, em investigações epidemiológicas em várias escalas e em estudos de biologia populacional, patogenicidade e evolução de bactérias, principalmente patógenos humanos (MAIDEN, 2006; SPRATT, 1999). A vantagem no uso desta estratégia refere-se ao fato das diferenças entre as linhagens estarem indexadas diretamente nas seqüências de DNA, as quais podem ser disponibilizadas em bancos de dados de domínio público e comparadas com facilidade.

A partir da técnica de MLST surgiram variações do método como MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), empregado para a identificação de espécies de microrganismos. Nessa técnica, as seqüências são comparadas e as análises filogenéticas são realizadas com base em matrizes de similaridade, sendo adequada para a separação de espécies (CHRISTENSEN et al., 2007).

A técnica de MLSA foi utilizada em estudo de filogenia de *Streptomyces griseus* com base em seqüências dos genes *atpD* (cadeia β da ATP sintase), *gyrB* (gene estrutural da subunidade B da DNA girase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase), *trpB* (subunidade B da triptofano sintase) e 16S RNAr (GUO et al., 2008). Esses genes, apesar de conservados evolutivamente, apresentaram alto número de sítios polimórficos, que possibilitou a identificação de diferentes espécies bacterianas. Alguns destes genes também foram utilizados individualmente para análises filogenéticas no gênero *Streptomyces* como *trpB* (EGAN et al., 2001), *gyrB* (HATANO; NISHII; KASAI, 2003) e *rpoB* (KIM et al., 2004). O gene *rpoB* foi utilizado por Mun e colaboradores (2007) e possibilitou a diferenciação de espécies de *Streptomyces* associados à sarna da batata.

10. Sarna da batata no Brasil

Atualmente, a sarna da batata vem se tornando problema de suma importância para a bataticultura nacional, principalmente pelo aumento da contaminação da batata-semente importada (FISCHER et al., 2005). Além disso, tem sido relatada a ocorrência de sarna provocada por patógenos com características distintas de *Streptomyces scabiei*, como aqueles que ocorrem em solos com pH inferiores a 3,9 (MIRANDA FILHO, 2001).

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

Atualmente pouco se conhece sobre a ocorrência da sarna da batata no país, inclusive sobre a epidemiologia desta doença nas diferentes regiões produtoras. Nesse sentido, a caracterização e/ou identificação das linhagens de *Streptomyces* patogênicas à batata que ocorrem no Brasil poderá contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos de manejo da doença, a fim de garantir maior produção, e, principalmente, permitir o plantio continuado da batata em regiões favoráveis à cultura, mas com restrita disponibilidade de área. Além disso, poderá fornecer subsídios para os programas de melhoramento genético das variedades de batata, para estudos do grau de resistência/suscetibilidade das cultivares, bem como para estudos epidemiológicos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Identificação de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata, provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, por meio de taxonomia polifásica.

2. Objetivos específicos

- Isolamento de linhagens de *Streptomyces* oriundas de diferentes regiões produtoras dos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), complementando o acervo de linhagens nacionais de *Streptomyces* patogênicas à batata da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF);
- Caracterização morfológica das linhagens baseada no tipo de hifa e coloração dos esporos;
- Avaliação da patogenicidade das linhagens com base na presença dos genes *nec1*, *tomA* e operon *txtAB* e/ou em testes de inoculação em minitubérculos de batata;
- Caracterização molecular das linhagens pela utilização de *primers* espécie-específicos, análise de PCR-RFLP do gene *atpD* e análise de sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*;
- Estudos das relações filogenéticas entre as linhagens utilizando sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* de forma individual e multilocus;
- Avaliação da incidência e distribuição de *Streptomyces* spp. nas diferentes regiões produtoras de batata do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens

As linhagens foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas, SP. No presente estudo foram analisadas 190 linhagens, sendo 165 nacionais, 13 de material vegetal importado do Chile, França e Holanda (Tabela 1) e 12 linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata (Tabela 2).

Tabela 1. Linhagens de *Streptomyces* sp. utilizadas nesse estudo.

IBSBF	Código	Procedência	Variedade
1773	-	Desconhecida	Desconhecida
1774	-	Desconhecida	Desconhecida
1884	-	Capão Bonito (SP)	Ágata
1886	-	Ibicoara (BA)	Monalisa
1936	-	Itapeva (SP)	Monalisa
1943	-	Holanda	Vivaldi
1944	-	Holanda	Baraka
1945	-	Holanda	Vivaldi
2005	-	Cristalina (GO)	Ágata
2006	-	Chile	Atlantic
2019	-	Cristalina (GO)	Ágata
2020	-	Campinas (SP)	<i>Beta vulgaris</i>
2021	-	Campinas (SP)	<i>Beta vulgaris</i>
2124	-	Bueno Brandão (MG)	Monalisa
2147	-	Ibicoara (BA)	Ágata
2162	-	Holanda	Asterix
2203	-	Tambaú (SP)	Ágata
2204	-	Tambaú (SP)	Monalisa
2228	-	Ibicoara (BA)	Ágata
2229	-	Araxá (MG)	Asterix
2235	-	UFV (MG)	Desconhecida
2236	-	UFV (MG)	Desconhecida
2239	-	Ibicoara (BA)	Ágata
2242	-	Ipuina (MG)	Cupido
2243	-	Ipuina (MG)	Cupido
2247	-	Itapetininga (SP)	Cupido
2248	-	Itapetininga (SP)	Ágata
2250	-	Ibicoara (BA)	Mondial
2251	-	Ibicoara (BA)	Mondial
2257	-	Nova Rezende (MG)	Desconhecida
2258	-	Itapetininga (SP)	Cupido

Tabela 1. Continuação.

IBSBF	Código	Procedência	Variedade
2260	-	Mucugê (BA)	Ágata
2282	-	Quitandinha (PR)	Ágata
2283	-	Quitandinha (PR)	Ágata
2292	-	São Mateus (PR)	Cupido
2293	-	São Mateus (PR)	Cupido
2294	-	São Mateus (PR)	Cupido
2298	-	São Gotardo (MG)	Ágata
2306	-	Mucugê (BA)	Ágata
2308	-	Mucugê (BA)	Ágata
2315	-	Pinhão (PR)	Ágata
2316	-	Perdizes (MG)	Cupido
2317	-	Mucugê (BA)	Cupido
2318	-	Mucugê (BA)	Cupido
2343	-	S. Miguel Arcanjo (SP)	Cupido
2344	-	S. Miguel Arcanjo (SP)	Cupido
2351	-	Itapetininga (SP)	Cupido
2352	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2359	-	Cristalina (GO)	<i>Beta vulgaris</i>
2360	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Monalisa
2368	-	Itapetininga (SP)	Atlantic
2388	-	Itapetininga (SP)	Asterix
2389	-	Itapetininga (SP)	Atlantic
2390	-	Casa Branca (SP)	Cupido
2391	-	Cristalina (GO)	Cupido
2392	-	Cristalina (GO)	Cupido
2393	-	Cristalina (GO)	Cupido
2394	-	Cristalina (GO)	Ágata
2395	-	Itapetininga (SP)	Mondial
2396	-	Itapetininga (SP)	Ágata
2397	-	Santa Juliana (MG)	Asterix
2398	-	Cristalina (GO)	Ágata
2399	-	Cristalina (GO)	Ágata
2400	-	Itapetininga (SP)	Mondial
2401	-	Santa Juliana (MG)	Ágata
2402	-	Santa Juliana (MG)	Ágata
2403	-	Uberaba (MG)	Ágata
2404	-	Uberaba (MG)	Ágata
2405	-	Uberaba (MG)	Ágata
2406	-	Poços de Caldas (MG)	Ágata

Tabela 1. Continuação.

IBSBF	Código	Procedência	Variedade
2407	-	Poços de Caldas (MG)	Ágata
2408	-	Poços de Caldas (MG)	Ágata
2409	-	Cristalina (GO)	Ágata
2410	-	Cristalina (GO)	Ágata
2411	-	Cristalina (GO)	Ágata
2426	-	Itapetininga (SP)	Mondial
2427	-	Itapetininga (SP)	Ágata
2428	-	Itapetininga (SP)	Ágata
2429	-	Castro (PR)	Atlantic
2430	-	Castro (PR)	Atlantic
2431	-	Tapira (PR)	Atlantic
2432	-	Tapira (PR)	Atlantic
2435	-	Poços de Caldas (MG)	Ágata
2437	-	Tapira (PR)	Atlantic
2438	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Ágata
2439	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Ágata
2449	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2450	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2455	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2466	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2467	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2468	-	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido
2472	-	Holanda	Caesar
2473	-	Holanda	Ágata
2474	-	Holanda	Cupido
2475	-	Ibicoara (BA)	Ágata
2476	-	Mucugê (BA)	Ágata
2482	-	Guarapuava (PR)	Ágata
2483	-	Guarapuava (PR)	Ágata
2484	-	Guarapuava (PR)	Ágata
2485	-	Guarapuava (PR)	Ágata
2486	-	Guarapuava (PR)	Ágata
2498	-	Holanda	Ágata
2499	-	Holanda	Baraka
2500	-	Casa Branca (SP)	Monalisa
2501	-	Piedade (SP)	Monalisa
2502	-	Bueno Brandão (MG)	Ágata
2503	-	Ibicoara (BA)	Monalisa

Tabela 1. Continuação.

IBSBF	Código	Procedência	Variedade
2507	-	Ibicoara (BA)	Ágata
2508	-	Holanda	Ágata
2509	-	França	Éden
2510	-	Holanda	Carreira
2520	-	Paranapanema (SP)	Cupido
2521	-	Paranapanema (SP)	Cupido
2522	-	Ibiraiaras (RS)	Cupido
2523	-	Ibiraiaras (RS)	Cupido
2524	-	Ibiraiaras (RS)	Cupido
2527	-	Indaiatuba (SP)	Ágata
2528	-	Indaiatuba (SP)	Ágata
2529	-	Indaiatuba (SP)	Ágata
*2804	RS 11	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2805	RS 20	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2806	RS 12	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2807	RS 16	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2808	RS 15	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2809	RS 6	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
*2811	RS 3	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
*2812	SC 5	Irineópolis (SC)	Ágata
*2814	SC 1A	Irineópolis (SC)	Ágata
*2815	RS 22	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2823	SC 8	Irineópolis (SC)	Ágata
*2860	SC 4A	Irineópolis (SC)	Ágata
*2861	RS 13	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2862	SC 10C	Itaiópolis (SC)	Markies
*2863	SC 2A	Irineópolis (SC)	Ágata
*2864	SC 1C	Irineópolis (SC)	Ágata
*2865	SC 10B	Itaiópolis (SC)	Markies
*2866	RS 14	Ibiraiaras (RS)	Asterix
*2867	SC 24	Canoinhas (SC)	Ágata
*2931	SC 1B	Irineópolis (SC)	Ágata
*2932	SC 3A	Água Doce (SC)	Ágata
*2941	SC 11	Itaiópolis (SC)	Markies
*2942	SC 22	Canoinhas (SC)	Ágata
*2949	SC 21	Itaiópolis (SC)	Cupido
*2950	SC 25A	Canoinhas (SC)	Asterix
*2951	SC 19	Itaiópolis (SC)	Cupido
*2952	SC 20B	Itaiópolis (SC)	Cupido

Tabela 1. Continuação.

IBSBF	Código	Procedência	Variedade
*2953	SC 25B	Canoinhas (SC)	Asterix
*2954	SC 27	Canoinhas (SC)	Asterix
*2955	SC 10A	Itaiópolis (SC)	Markies
*2956	SC 20A	Itaiópolis (SC)	Cupido
*2957	SC 13	Itaiópolis (SC)	Markies
*2958	SC 23B	Canoinhas (SC)	Ágata
*2959	SC 23A	Canoinhas (SC)	Ágata
*2960	SC 4B	Irineópolis (SC)	Ágata
*2964	SC 16	Papanduva (SC)	Ágata
*2965	SC 26	Canoinhas (SC)	Asterix
*2967	RS 7	São Francisco de Paula (RS)	Ágata
*2968	RS 9	São Francisco de Paula (RS)	Ágata
*2969	RS 10	São Francisco de Paula (RS)	Ágata
2970	-	Ibiraíaras (RS)	Cupido
*-	RS 1	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
*-	RS 2	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
*-	RS 4	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
*-	RS 5	São Francisco de Paula (RS)	Asterix
*-	RS 8	São Francisco de Paula (RS)	Ágata
*-	RS 17	Ibiraíaras (RS)	Asterix
*-	RS 18	Ibiraíaras (RS)	Asterix
*-	RS 19	Ibiraíaras (RS)	Asterix
*-	RS 21	Ibiraíaras (RS)	Asterix
*-	RS 23	Ibiraíaras (RS)	Asterix
*-	SC 2B	Irineópolis (SC)	Ágata
*-	SC 3B	Água Doce (SC)	Ágata
*-	SC 10	Água Doce (SC)	Ágata
*-	SC 12	Itaiópolis (SC)	Markies
*-	SC 15	Papanduva (SC)	Ágata
*-	SC 18	Papanduva (SC)	Ágata
*-	SC 23C	Canoinhas (SC)	Ágata

IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil); UFV (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil); * Linhagens de *Streptomyces* que foram isoladas nesse estudo.

Tabela 2. Linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna batata

Espécie	IBSBF	Número em outras coleções	Procedência
<i>S. scabiei</i>	2049 ^T	CFBP – 4517	Estados Unidos
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023 ^T	CFBP – 4497	França
<i>S. stelliscabiei</i>	2085 ^T	CFBP – 4521	França
<i>S. acidiscabies</i>	2110 ^T	DSMZ – 41668	Canadá
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086 ^T	CFBP – 4531	França
<i>S. turgidiscabies</i>	2114 ^T	DSMZ – 41838	Japão
<i>S. caviscabies</i>	2051 ^T	CFBP – 4545	Canadá
<i>S. setonii</i>	2106 ^T	DSMZ – 40395	Desconhecida
<i>S. luridiscabiei</i>	2011 ^T	LMG – 21390	Coréia
<i>S. puniscabiei</i>	2012 ^T	LMG – 21391	Coréia
<i>S. sampsonii</i>	2111 ^T	DSMZ – 40394	Desconhecida
<i>S. ipomoeae</i>	2117 ^T	DSMZ – 40383	Desconhecida

^T linhagem Tipo; CFBP (*Collection Française de Bactéries Phytopathogène*, França); DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Alemanha); IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil); LMG (*Laboratorium voor Microbiologie*, Bélgica).

2. Isolamento

A Coleção de Culturas IBSBF possuía em seu acervo 108 linhagens nacionais de *Streptomyces* provenientes de alguns estados produtores como Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Entretanto, o número de linhagens de *Streptomyces* da região Sul, considerada uma das principais regiões produtoras de batata do país, era pouco representativo. Para complementar o acervo das linhagens provenientes das regiões produtoras do país, foram obtidos tubérculos de batata com sintomas de sarna provenientes de campos comerciais dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, pertencentes a agricultores filiados à Associação Brasileira da Batata (ABBA).

O isolamento de linhagens de *Streptomyces* foi efetuado a partir de lesões características aprofundadas, superficiais, erumpentes ou de aspecto rendilhado (Figura 6).

As lesões de tubérculos infectados foram recortadas com um bisturi, colocadas em microtubos contendo 1 mL de água destilada autoclavada e incubadas a 55 °C por 30 minutos. Em seguida, foram colocadas em placa de Petri e após a adição de 0,5 mL de água destilada esterilizada foram maceradas com o auxílio de um bisturi. Com uma alça de

platina, a suspensão resultante foi semeada, por meio de esgotamento, em placa de Petri contendo meio Ágar-Água (AA) (ágar 18 g, água destilada q.s.p. 1000 mL, cicloheximida 100 ppm, pH 9). As placas foram incubadas a 28 °C, em estufa bacteriológica, por aproximadamente sete dias para observação da micromorfologia de hifas.

As placas foram observadas em microscópio óptico e colônias típicas de *Streptomyces* foram selecionadas, semeadas em meio de cultura YME (extrato de levedo 4 g, extrato de malte 10 g, glucose 4 g, ágar 18 g, água destilada q.s.p. 1000 mL, pH 7,2) e incubadas por aproximadamente sete dias a 28 °C para observação da coloração dos esporos.

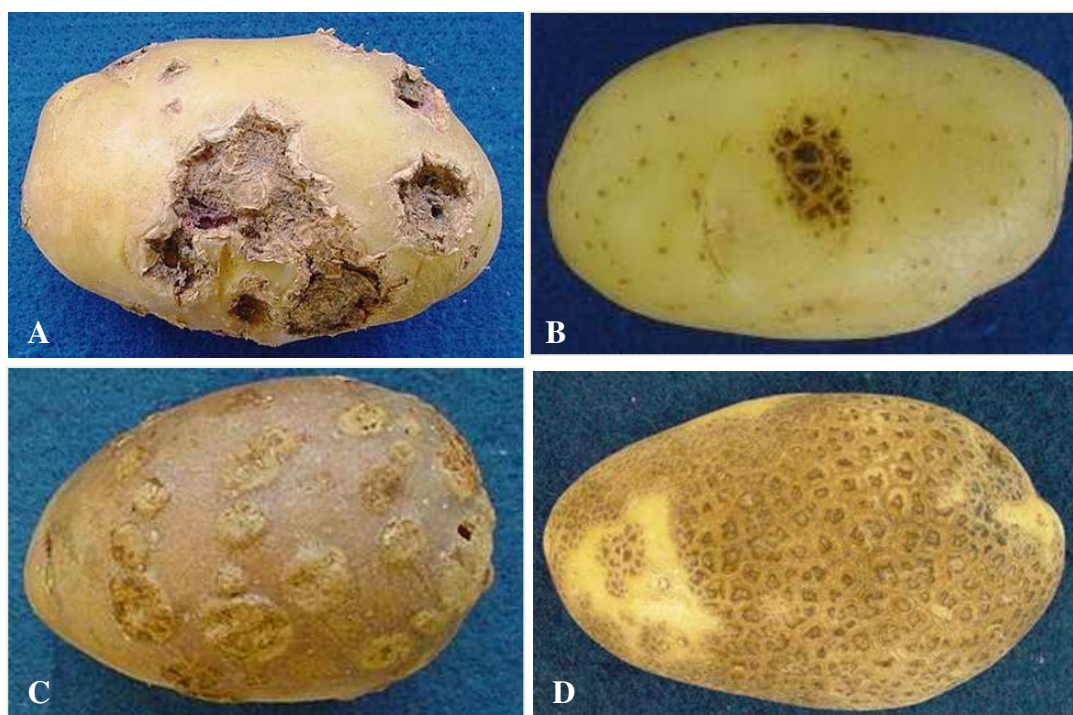


Figura 6. Lesões nos tubérculos de batata provenientes de campos comerciais dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. (A) Lesão aprofundada; (B) Lesão superficial; (C) Lesão erupente; (D) Lesão com aspecto rendilhado.

3. Preservação

As linhagens de *Streptomyces* isoladas foram incorporadas ao acervo da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), sendo preservadas por meio de liofilização e ultracongelamento (-80 °C).

3.1 Liofilização

As amostras foram dessecadas sob alto vácuo, de acordo com os seguintes procedimentos:

- seleção de ampolas: foram utilizadas ampolas com dimensões de 0,7 x 12 cm (diâmetro externo e comprimento, respectivamente), e capacidade para 0,5 mL de solução;
- preparo de ampolas: as ampolas foram esterilizadas inicialmente com calor seco (160 °C/2 h). Após esterilização, tiras de papel contendo o número de identificação das culturas foram inseridas nos tubos. Depois deste procedimento, as ampolas foram tamponadas e esterilizadas em autoclave (120 °C/30 min) duas vezes, por dois dias consecutivos;
- solução crioprotetora: composta por trealose 5 g, gelatina 2,5 g, peptona 1 g e água destilada 100 mL. Alíquotas de 5 mL da solução foram transferidas para tubos que receberam as culturas;
- preparo da cultura bacteriana: as células bacterianas, obtidas nos isolamentos e cultivadas em meio YME, foram coletadas com o auxílio de uma alça de platina e depositadas na solução crioprotetora, de modo a formar uma suspensão densa, em quantidade suficiente para distribuição nos tubos (500 µL/tubo).
- processo de liofilização: a suspensão de células contidas nos tubos de vidro foram pré-congeladas (-80 °C) e posteriormente levadas ao aparelho liofilizador onde foram processados num tempo nunca inferior a 6 horas. Para a liofilização, a pressão final foi mantida em torno de 10^{-2} a 10^{-3} Torr. Ao final da operação, os tubos foram selados sob vácuo, com chama de maçarico. Para facilitar o fechamento, foi efetuada uma constrição no tubo, a 6 cm da base. Foram processadas 10 ampolas para cada linhagem de *Streptomyces* isolada.
- armazenamento: após o processo de liofilização, as ampolas foram armazenadas ao abrigo de luz, à temperatura de 4 °C.

3.2 Ultracongelamento

Além da técnica de preservação por liofilização, todas as linhagens de *Streptomyces* sp. foram armazenadas por ultracongelamento. Após cultivo em meio de cultura YME, a

bactéria foi raspada da placa e suspensa em 1,5 mL de solução crioprotetora (item 3.1). Posteriormente, adicionou-se glicerol 30% esterilizado e os tubos criogênicos foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

4. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada através de microscopia óptica, avaliando-se o formato da cadeia de esporos em meio de cultura AA e visualmente pela observação da coloração dos esporos em meio de cultura YME.

5. Caracterização patogênica

5.1 Amplificação de genes da ilha de patogenicidade de *Streptomyces* por PCR

A análise da presença de genes característicos da ilha de patogenicidade de *S. turgidiscabies* foi realizada por PCR utilizando *primers* específicos para o operon *txtAB* (WANNER, 2006), relacionado à síntese da fitotoxina taxtomina, genes *tomA* (WANNER, 2006), que codifica a enzima tomatinase e *nec1* (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998), que codifica a proteína necrogênica Nec1.

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*.

Os experimentos foram realizados em termociclador MyCycler, Bio-Rad. O programa de amplificação, comum para os três genes analisados, 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. e 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.

As regiões amplificadas, os tamanhos dos fragmentos obtidos e os pares de *primers* utilizados estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Pares de *primers* utilizados na amplificação por PCR para detecção de genes da ilha de patogenicidade de *Streptomyces*.

Especificidade	Primers	Seqüência (5' - 3')	Fragmento (pb)
Gene <i>nec1</i>	Nf	ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGA	720
	Nr	GCAGGTCGTCACGAAGGATCG	
Operon <i>txtAB</i>	TxtAB1	CCACCAGGACCTGCTCTTC	385
	TxtAB2	TCGAGTGGACCTCACAGATG	
Gene <i>tomA</i>	Tom3	GAGGCGTTGGTGGAGTTCTA	392
	Tom4	TTGGGGTTGTACTCCTCGTC	

pb: pares de bases.

5.2 Teste de patogenicidade em minitubérculos de batata

Para as linhagens de *Streptomyces* sp. que não apresentaram amplificação do gene *nec1* foram efetuados testes em minitubérculos de batata para a confirmação da patogenicidade e avaliação da habilidade necrótica. Algumas linhagens que apresentaram amplificação para esse gene foram utilizadas como controle positivo nesses experimentos.

Tubérculos de batatas-semente das cultivares Ágata e Cupido, suscetíveis à sarna e comumente plantadas no Brasil, foram gentilmente cedidos pela Cooperativa Agrícola de Capão Bonito (SP) e utilizados nos testes de patogenicidade.

Os minitubérculos de batata, com cerca de um a dois centímetros de diâmetro, receberam o seguinte tratamento: desinfestação superficial com NaOCl 0,5%, por 15 minutos, sob agitação; lavagem em água destilada esterilizada, por 15 minutos sob agitação, para a retirada da solução de hipoclorito da superfície do tubérculo. Após esse processo, os minitubérculos foram secos a temperatura ambiente e assepticamente cortados, com o uso de bisturi, em fatias com cerca de 0,25 cm de espessura.

As linhagens de *Streptomyces* foram cultivadas em meio de aveia *Oatmeal Broth* (OMB) (LORIA et al., 1995), durante sete dias, a 28 °C. No preparo do meio de aveia, 40 g de aveia em flocos foi dissolvida em 600 mL de água destilada. A mistura foi fervida por 20 minutos e filtrada com a utilização de gaze de algodão. O volume foi completado, com água destilada, para um litro e o pH ajustado para 7,2. Adicionou-se ágar para concentração final de 1,5%.

Após o crescimento e esporulação, discos do meio de cultura com a bactéria (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) foram recortados e invertidos sobre fatias de

minitubérculos. Foram utilizados quatro discos por tratamento, colocados em placa de Petri revestida com papel de filtro esterilizado, umedecido com água destilada autoclavada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C e os sintomas de necrose avaliados após dois, sete e dez dias. Foi utilizado como controle negativo o meio de cultura sem inóculo, invertido sobre os minitubérculos (LORIA et al., 1995, com adaptações).

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 7). As linhagens patogênicas foram classificadas em diferentes graus de virulência, sendo consideradas como pouco virulenta (+), causando necrose pouco aprofundada abaixo e ao redor do disco de meio de cultura, com largura da faixa de necrose inferior a 0,1 cm; moderadamente virulenta (++), causando necrose mais aprofundada abaixo e ao redor do disco de meio de cultura, com largura da faixa de necrose inferior a 0,1 cm; e muito virulenta (+++), com necrose mais aprofundada abaixo e ao redor do disco de meio de cultura, com faixa de necrose com largura maior que 0,1 cm.

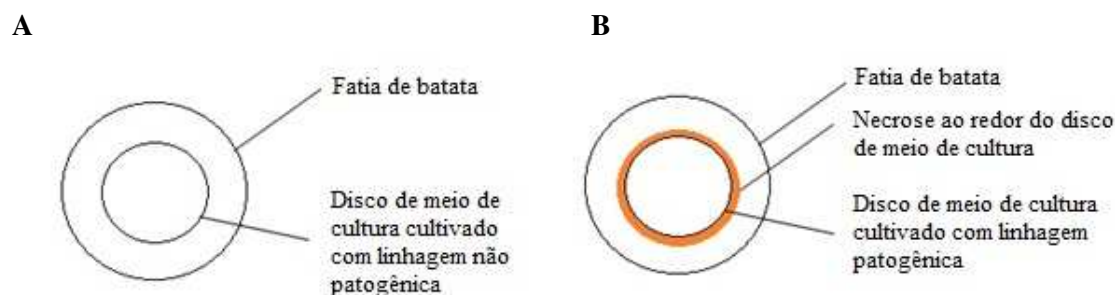


Figura 7. Esquema da avaliação do teste de patogenicidade de linhagens de *Streptomyces*. (A) Exemplo de linhagem não patogênica (-); (B) Necrose causada por linhagem patogênica. A largura da faixa de necrose foi utilizada na classificação em diferentes graus de virulência.

6. Caracterização molecular

6.1 Extração de DNA cromossômico

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

Cerca de 100 mg de biomassa de bactéria, contida na placa com meio YME, foi utilizada na extração. As células foram lavadas com 3 mL de tampão NaCl (NaCl 0,1 M e

EDTA 0,1 M). O micélio foi desagregado mecanicamente, com auxílio de um pistilo, em 1,8 mL de tampão de lise (EDTA 40 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; sacarose 0,75 M). Posteriormente, foi adicionado 180 µL SDS 10% e 90 µL de lisozima (20 mg/mL), misturados com a utilização de vortex e a mistura foi incubada a 37 °C por uma hora. Após foi adicionado 100 µL de proteinase K (10 mg/mL), incubando-se a 55 °C durante duas horas. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e após agitação manual vigorosa, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Esse procedimento foi realizado duas vezes. O DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaCl 5 M, cerca de 200 µL, e 2 volumes de etanol absoluto, cerca de 4 mL, com incubação durante à noite a -20 °C. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos e o sedimento foi lavado de duas a três vezes com etanol 70%, aplicando-se pulsos curtos de centrifugação. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois suspenso em 400 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA). Adicionou-se 8 µL de RNase (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C por duas horas. Posteriormente, adicionou-se 80 µL de LiCl (4 M) e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), cerca de 500 µL. Após centrifugação de 10 min a 10000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um microtubo, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, cerca de 1 mL, e os sedimentos lavados duas vezes com etanol 70%. Após secar em temperatura ambiente o DNA foi suspenso em 40 µL de TE pH 8,0 e estocado a 4 °C.

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

6.2 Amplificação por PCR dos diferentes genes

Nesse estudo foram analisados diversos genes e utilizados diferentes pares de *primers* obtidos a partir de dados de literatura e suas sequências estão listadas na Tabela 4. Os experimentos de amplificação foram realizados preparando-se reações de 25 µL, com 200 ng de DNA cromossômico, 1X tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e 1X BSA (Bovine Serum Albumine) (10 mg/mL). As concentrações dos reagentes e os programas de amplificação foram padronizados para as linhagens de *Streptomyces* através

de experimentos de gradiente de temperaturas e testes com variações nas quantidades dos reagentes utilizados nas reações (Tabela 5). As regiões amplificadas e os tamanhos dos fragmentos obtidos variaram de acordo com os pares de *primers* utilizados (Tabela 5).

Para a análise de multilocus foram amplificadas partes dos genes *atpD* (cadeia β da ATP sintase), *gyrB* (gene estrutural da subunidade β da DNA girase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase) e *trpB* (subunidade β da triptofano sintase) com os *primers* anteriormente descritos por (GUO et al., 2008).

Os pares de *primers* específicos para as espécies *S. scabiei* e *S. turgidiscabies* (LEHTONEN; RANTALA; KREUZE, 2004) foram utilizados para confirmação da identidade das linhagens.

Os experimentos foram realizados em termociclador MyCycler, Bio-Rad. Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

Tabela 4. Sequência dos *primers* que foram utilizados nas amplificações por PCR.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)
atpDPF	GTCCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC	998
atpDPR	GTGAACTGCTTGCGGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA	
gyrBPF	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCGGCAAGTTCGGC	1305
gyrBPR	GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCCGGCGTCCGCCAT	
recAPF	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC*	913
recAPR	GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG*	
rpoBPF	GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC	994
rpoBPR	CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA	
trpBPF	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA	822
trpBPR	TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC	
ScabI	CAACACTCTCGGGCATCCGA	1278
ScabII	TTGACAGCTCCCTCCTTAC	
TurgI	CCTCGCATGGGGGTGGGTTA	1273
TurgII	CGACAGCTCCCTCCCCGTAA	

(*) bases ambíguas, onde R = A/G, S = C/G; pb: pares de bases

Tabela 5. Pares de *primers*, regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos de PCR.

Pares de <i>primers</i>	Região amplificada/ Especificidade	Fragmento (pb)	<i>primers</i> (μM)	dNTPs (mM)	Enzima (U/reação)	Programas de Amplificação
<i>atpDPF/atpDPR</i>	parte do gene <i>atpD</i>	998	0,4	0,2	2,5	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 61 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
<i>gyrBPF/gyrBPR</i>	parte do gene <i>gyrB</i>	1305	0,4	0,2	2,5	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 67 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
<i>recAPF/recAPR</i>	parte do gene <i>recA</i>	913	0,4	0,2	2,5	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
<i>rpoBPF/rpoBPR</i>	parte do gene <i>rpoB</i>	994	0,4	0,2	2,5	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
<i>trpBPF/trpBPR</i>	parte do gene <i>trpB</i>	822	0,4	0,3	2,5	95 °C/5 min; 35X (95 °C/30 seg, 67 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
ScabI/ScabII	<i>S. scabiei</i>	1278	0,4	0,2	2,0	95 °C/5 min; 35X (95 °C/30 seg, 61 °C/30 seg, 72 °C/80 seg); 72 °C/6 min
TurgI/TurgII	<i>S. turgidiscabies</i>	1273	0,4	0,3	2,0	95 °C/5 min; 35X (95 °C/30 seg, 61 °C/30 seg, 72 °C/80 seg); 72 °C/6 min

pb: pares de bases; U: unidade

6.3 Análises de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *atpD*

O gene *atpD* foi avaliado como marcador molecular para a diferenciação das principais espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata (Tabela 2) e posteriormente para a caracterização de linhagens de *Streptomyces* sp. (Tabela 1). Os produtos de amplificação desse gene foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Alu* I, *Cfo* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hsp* 92 II, *Mbo* I, *Rsa* I e *Taq* I (Fermentas). Nas reações foram utilizados de 5 a 7 µL do produto gerado pela amplificação, em reações de 15 µL contendo 5 U da enzima por reação. As condições de temperatura foram empregadas de acordo com as instruções do fabricante (Fermentas). A observação do perfil de restrição foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 3%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

Os perfis apresentados pelas linhagens analisadas foram comparados com os perfis obtidos para as diferentes linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata, visando a identificação das espécies que ocorrem no Brasil.

6.4 Sequenciamento

Os produtos de amplificação correspondentes às partes dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* das linhagens de *Streptomyces* foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento. Após as purificações, os DNAs foram quantificados em gel de agarose 1%.

As reações para sequenciamento foram efetuadas utilizando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems), empregando-se os mesmos *primers* da amplificação por PCR (Tabela 4). As purificações das reações foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante do kit. As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no sequenciador automático, marca Applied Biosystems-Hitachi, modelo ABI Prism 3700 DNA Analyzer. Uma parte do sequenciamento foi efetuada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP e a outra no Laboratório

de Sequenciamento e Genotipagem do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP.

6.5 Análise de Multilocus

Nas análises de multilocus foram utilizadas seqüências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* das linhagens de *Streptomyces* associadas a sarna da batata, assim como a seqüência dos mesmos genes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, utilizada como grupo externo, disponível na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). As seqüências foram editadas e alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). Posteriormente foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para prover suporte aos ramos das árvores filogenéticas obtidas, estimando a sua consistência interna. A partir dos dados de alinhamento também foram construídas matrizes de similaridade das seqüências para cada gene, utilizando o parâmetro Kimura 2 de correção (KIMURA, 1980), por meio do programa MEGA 4.0.

As seqüências dos diferentes genes foram concatenadas em combinações de 2 a 5 genes dependendo da linhagem de *Streptomyces* analisada. O mesmo foi efetuado para as linhagens Tipo de *Streptomyces* e para o grupo externo. As seqüências concatenadas foram alinhadas e foram construídas árvores filogenéticas e matrizes de similaridades para comparação entre as linhagens.

RESULTADOS

1. Isolamento e Preservação

A Coleção de Culturas de *Streptomyces* IBSBF possuía em seu acervo 133 linhagens de *Streptomyces* causadoras da sarna comum da batata, sendo 108 nacionais, 13 de material vegetal importado e 12 linhagens de outras coleções internacionais. As linhagens nacionais foram obtidas a partir de amostras de tubérculos com sintomas provenientes das regiões produtoras de batata dos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná e São Paulo. A região Sul é considerada uma das principais regiões produtoras de batata do país, apesar disso, o acervo da Coleção IBSBF contava com poucos isolados de *Streptomyces* oriundos dessa região. Assim, novos isolamentos foram realizados a fim de se aumentar a representatividade de linhagens de *Streptomyces* oriundas da região Sul.

Foram isoladas 57 novas linhagens de *Streptomyces* sp. a partir de tubérculos de batatas com sintomas de sarna comum provenientes de regiões produtoras dos estados do Rio Grande do Sul (cidades de São Francisco de Paula e Ibiraiaras, 23 linhagens) e de Santa Catarina (cidades de Água Doce, Canoinhas, Irineópolis, Itaiópolis e Papanduva, 34 linhagens) (Tabela 1). Essas linhagens também foram preservadas por meio da técnica de ultracongelamento e liofilização, e incorporadas ao acervo da Coleção de Culturas IBSBF. Com essas novas linhagens, a Coleção de *Streptomyces* sp. está atualmente composta por um total de 190 linhagens sendo 165 nacionais (Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), 13 de material vegetal importado (Chile, França e Holanda) e 12 linhagens Tipo de *Streptomyces* obtidas de outras coleções de internacionais.

2. Caracterização morfológica

As linhagens de *Streptomyces* foram cultivadas em meios de cultura apropriados para a caracterização morfológica. As colônias crescidas em meio AA apresentaram pouco desenvolvimento e baixa esporulação, possibilitando a observação de estruturas características de bactérias do gênero *Streptomyces* como cadeias de esporos, esporóforos e estruturas de micélio (Figura 8). Posteriormente, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura YME, rico em nutrientes, que possibilitou o crescimento das colônias e a observação da coloração dos esporos (Figura 9).

Inicialmente foram caracterizadas as linhagens Tipo de *Streptomyces* uma vez que dados de literatura indicam que as características morfológicas podem auxiliar na diferenciação dessas espécies. Para as linhagens Tipo de *Streptomyces* foram observadas diferenças no formato da cadeia de esporos e variação de sua coloração. Foi verificada morfologia de hifas do tipo espiral para as espécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*; espiral aberto para *S. ipomoeae*; e flexuosa para *S. acidiscabies*, *S. reticuliscabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. caviscabies*, *S. setonii*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei* e *S. sampsonii* (Tabela 6).

A coloração dos esporos variou podendo ser branca (*S. acidiscabies*), creme (*S. caviscabies*, *S. setonii*, *S. luridiscabies*, *S. puniscabiei* e *S. sampsonii*), cinza (*S. ipomoeae*) e de branca a cinza, como observado nas linhagens de *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. reticuliscabiei* e *S. turgidiscabies* (Tabela 6).

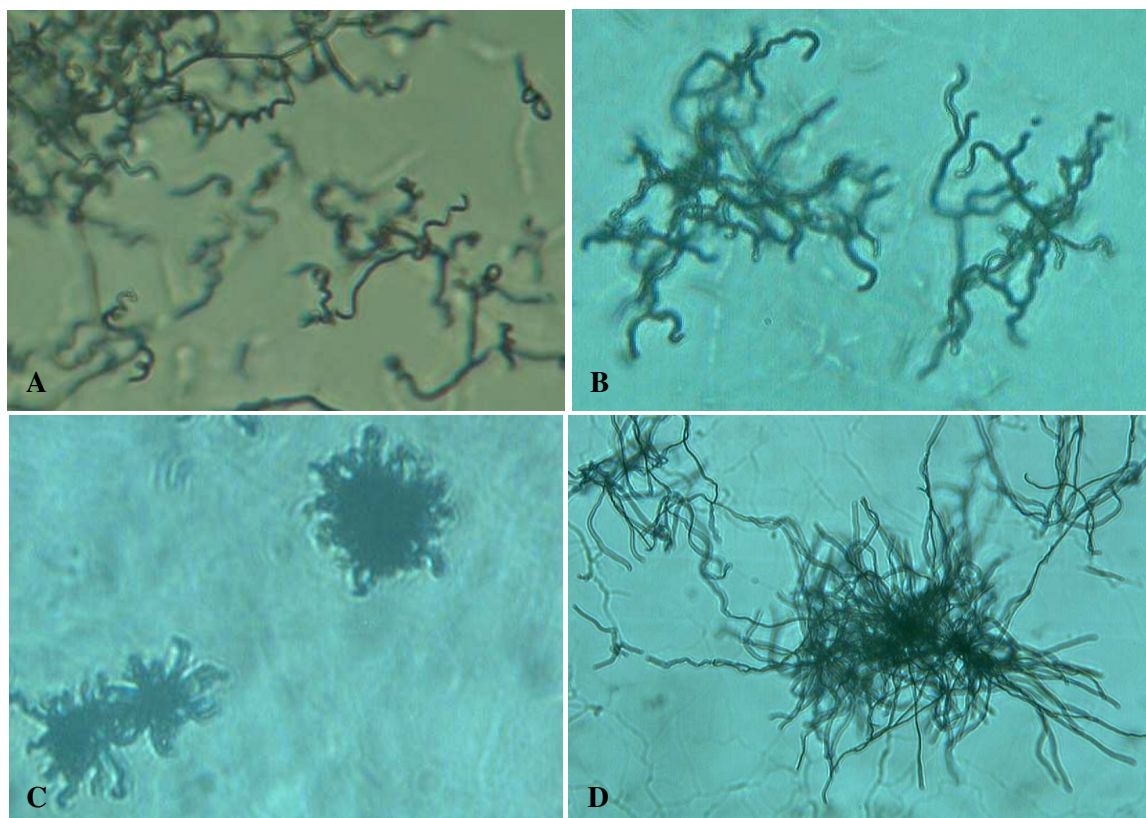


Figura 8. Micromorfologia das hifas de *Streptomyces* sp. isoladas em meio AA. (A) cadeia de esporos espiral; (B) espiral aberto; (C) espiral tufo; e (D) flexuosa.

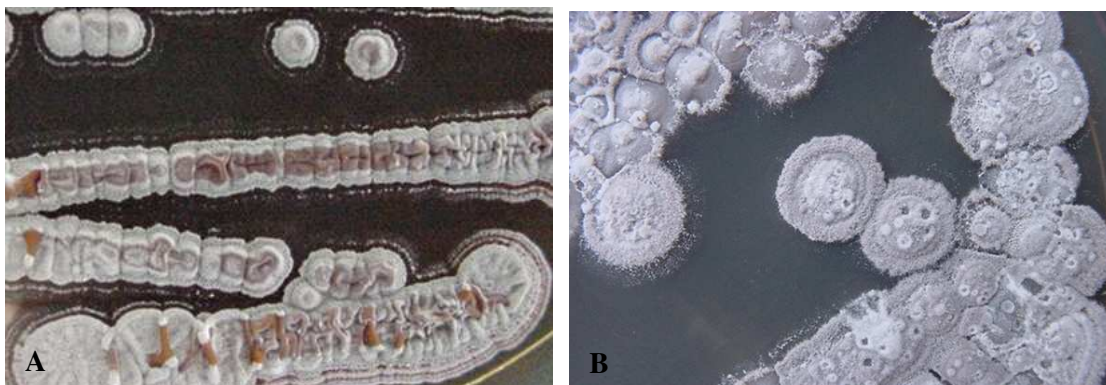


Figura 9. Coloração dos esporos de linhagens de *Streptomyces* sp. em meio de cultivo YME: (A) colônia laranja com esporos brancos; (B) esporos branco a cinza.

Tabela 6. Características morfológicas das linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata.

Espécie	IBSBF	Procedência	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
<i>S. scabiei</i>	2049 ^T	Estados Unidos	espiral	cinza/branca
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023 ^T	França	espiral	cinza/branca
<i>S. stelliscabiei</i>	2085 ^T	França	espiral	cinza/branca
<i>S. acidiscabies</i>	2110 ^T	Canadá	flexuosa	branca
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086 ^T	França	flexuosa	cinza/branca
<i>S. turgidiscabies</i>	2114 ^T	Japão	flexuosa	cinza/branca
<i>S. caviscabies</i>	2051 ^T	Canadá	flexuosa	creme/branca
<i>S. setonii</i>	2106 ^T	Desconhecida	flexuosa	creme/branca
<i>S. luridiscabiei</i>	2011 ^T	Coreia	flexuosa	creme/bege claro
<i>S. puniscabiei</i>	2012 ^T	Coreia	flexuosa	creme/bege claro
<i>S. sampsonii</i>	2111 ^T	Desconhecida	flexuosa	creme/branca
<i>S. ipomoeae</i>	2117 ^T	Desconhecida	espiral aberto	cinza escuro

^T linhagem Tipo; CFBP (*Collection Française de Bactéries Phytopathogène*, França); DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Alemanha); IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil); LMG (*Laboratorium voor Microbiologie*, Bélgica).

As características morfológicas das 178 linhagens avaliadas mostraram heterogeneidade com relação à micromorfologia de hifas sendo elas espiral (113 linhagens), flexuosa (47) espiral aberto (13) e espiral tufo (5). As linhagens também apresentaram-se heterogêneas com relação à coloração dos esporos podendo ser cinza (132 linhagens),

creme (16), branco (16), amarela (6), marrom (5), verde (2) e laranja (1) com variações na tonalidade das cores (Tabela 7).

Tabela 7. Características morfológicas das linhagens de *Streptomyces* sp. analisadas nesse estudo.

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	Cultivar/ Hospedeiro	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
<i>S. scabiei</i>	1774	Desconhecida	Desconhecida	espiral	cinza
	1884	Capão Bonito (SP)	Ágata	espiral	cinza
	1886	Ibicoara (BA)	Monalisa	espiral	cinza
	1936	Itapeva (SP)	Monalisa	espiral	cinza
	2005	Cristalina (GO)	Ágata	espiral	cinza
	2124	Bueno Brandão (MG)	Monalisa	espiral	cinza
	2147	Ibicoara (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2203	Tambaú (SP)	Ágata	espiral	cinza
	2204	Tambaú (SP)	Monalisa	espiral	cinza
	2228	Ibicoara (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2239	Ibicoara (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2242	Ipuiuna (MG)	Cupido	espiral	cinza
	2243	Ipuiuna (MG)	Cupido	espiral	cinza
	2248	Itapetininga (SP)	Ágata	espiral	cinza
	2250	Ibicoara (BA)	Mondial	espiral	cinza
	2251	Ibicoara (BA)	Mondial	espiral	cinza
	2257	Nova Rezende (MG)	Desconhecida	espiral	cinza
	2282	Quitandinha (PR)	Ágata	espiral	cinza
	2283	Quitandinha (PR)	Ágata	espiral	cinza
	2292	São Mateus (PR)	Cupido	espiral	cinza
	2293	São Mateus (PR)	Cupido	espiral	cinza
	2294	São Mateus (PR)	Cupido	espiral	cinza
	2298	São Gotardo (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2306	Mucugê (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2308	Mucugê (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2315	Pinhão (PR)	Ágata	espiral	cinza
	2316	Perdizes (MG)	Cupido	espiral	cinza
	2317	Mucugê (BA)	Cupido	espiral	cinza
	2318	Mucugê (BA)	Cupido	espiral	cinza
	2359	Cristalina (GO)	<i>Beta vulgaris</i>	espiral	cinza/branca
	2388	Itapetininga (SP)	Asterix	espiral	cinza
	2396	Itapetininga (SP)	Ágata	espiral	cinza

Tabela 7. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	Cultivar/ Hospedeiro	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
<i>S. scabiei</i>	2406	Poços de Caldas (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2407	Poços de Caldas (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2408	Poços de Caldas (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2409	Cristalina (GO)	Ágata	espiral	cinza
	2410	Cristalina (GO)	Ágata	espiral	cinza
	2411	Cristalina (GO)	Ágata	espiral	cinza
	2429	Castro (PR)	Atlantic	espiral aberto	cinza
	2475	Ibicoara (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2476	Mucugê (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2482	Guarapuava (PR)	Ágata	espiral aberto	cinza
	2500	Casa Branca (SP)	Monalisa	espiral	cinza
	2501	Piedade (SP)	Monalisa	espiral	cinza
	2502	Bueno Brandão (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2523	Ibiraíaras (RS)	Cupido	espiral	cinza
	2527	Indaiatuba (SP)	Ágata	espiral	cinza
	2809	São Francisco de Paula (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2811	São Francisco de Paula (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2814	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	cinza/branca
	2860	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	cinza/branca
	2950	Canoinhas (SC)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2954	Canoinhas (SC)	Asterix	espiral	cinza
	RS 1	São Francisco de Paula (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	RS 2	São Francisco de Paula (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	RS 4	São Francisco de Paula (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	RS 5	São Francisco de Paula (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
<i>S. europaeiscabiei</i>	1945	Holanda	Vivaldi	espiral	cinza/branca
	2474	Holanda	Cupido	espiral	cinza
	2498	Holanda	Ágata	espiral	cinza
	2510	Holanda	Carreira	espiral	cinza

Tabela 7. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	Cultivar/ Hospedeiro	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
<i>S. ipomoeae</i>	1773	Desconhecida	Desconhecida	espiral aberto	cinza
	2397	Santa Juliana (MG)	Asterix	flexuosa	cinza
	2401	Santa Juliana (MG)	Ágata	flexuosa	cinza
	2402	Santa Juliana (MG)	Ágata	flexuosa	cinza
	2426	Itapetininga (SP)	Mondial	flexuosa	cinza
	2427	Itapetininga (SP)	Ágata	flexuosa	cinza
	2428	Itapetininga (SP)	Ágata	flexuosa	cinza
	2430	Castro (PR)	Atlantic	flexuosa	cinza
	2431	Tapira (PR)	Atlantic	flexuosa	cinza
	2432	Tapira (PR)	Atlantic	espiral aberto	cinza
	2437	Tapira (PR)	Atlantic	flexuosa	cinza
	2438	Vargem Grande do Sul (SP)	Ágata	flexuosa	cinza
	2439	Vargem Grande do Sul (SP)	Ágata	espiral aberto	cinza
	2449	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	espiral aberto	cinza
	2450	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	flexuosa	cinza/verde
	2455	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	espiral aberto	cinza
	2466	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	espiral aberto	cinza
	2468	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	espiral aberto	cinza
	2483	Guarapuava (PR)	Ágata	espiral aberto	cinza
	2484	Guarapuava (PR)	Ágata	flexuosa	cinza
	2485	Guarapuava (PR)	Ágata	espiral aberto	cinza
	2486	Guarapuava (PR)	Ágata	flexuosa	cinza
	2528	Indaiatuba (SP)	Ágata	espiral	cinza
	2529	Indaiatuba (SP)	Ágata	flexuosa	cinza
	2960	Irineópolis (SC)	Ágata	flexuosa	cinza/branca
	2964	Papanduva (SC)	Ágata	flexuosa	cinza
	2967	São Francisco de Paula (RS)	Ágata	espiral aberto	cinza
	2969	São Francisco de Paula (RS)	Ágata	espiral aberto	cinza
Linhagem agrupada com <i>S. ipomoeae</i>	2019	Cristalina (GO)	Ágata	flexuosa	cinza/creme
<i>S. caviscabies/ S. setonii</i>	2021	Campinas (SP)	<i>Beta vulgaris</i>	flexuosa	creme/branca
	2235	UFV (MG)	Desconhecida	flexuosa	laranja/branca
	2236	UFV (MG)	Desconhecida	flexuosa	creme
	2260	Mucugê (BA)	Ágata	flexuosa	creme

Tabela 7. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	Cultivar/ Hospedeiro	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
<i>S. caviscabies/ S. setonii</i>	2368	Itapetininga (SP)	Atlantic	flexuosa	creme
	2389	Itapetininga (SP)	Atlantic	flexuosa	amarela/branca
	2391	Cristalina (GO)	Cupido	flexuosa	creme
	2392	Cristalina (GO)	Cupido	flexuosa	amarela/branca
	2393	Cristalina (GO)	Cupido	flexuosa	amarela/branca
	2398	Cristalina (GO)	Ágata	flexuosa	amarela/branca
	2399	Cristalina (GO)	Ágata	flexuosa	amarela/branca
	2400	Itapetininga (SP)	Mondial	flexuosa	creme
	2861	Ibiraíaras (RS)	Asterix	flexuosa	creme
<i>S. sampsonii</i>	2020	Campinas (SP)	<i>Beta vulgaris</i>	flexuosa	creme
	2360	Vargem Grande do Sul (SP)	Monalisa	flexuosa	creme claro/branca
Grupo 1 (G1)	1943	Holanda	Vivaldi	espiral	branca
	1944	Holanda	Baraka	espiral	cinza/branca
	2162	Holanda	Asterix	espiral	branca
	2351	Itapetininga (SP)	Cupido	espiral	cinza/branca
	2472	Holanda	Caesar	espiral	cinza
	2473	Holanda	Ágata	espiral	cinza
	2499	Holanda	Baraka	espiral	cinza/branca
	2508	Holanda	Ágata	espiral	branca
Grupo 2 (G2)	2247	Itapetininga (SP)	Cupido	espiral	branca
	2352	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	espiral	cinza/branca
	2390	Casa Branca (SP)	Cupido	espiral	branca
Linhas agrupadas com as do G2	2864	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	verde/creme
	2970	Ibiraíaras (RS)	Cupido	espiral	cinza esverdeada
Grupo3 (G3)	2395	Itapetininga (SP)	Mondial	flexuosa	cinza
Linhas agrupadas com as do G3	2808	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral tufo	marrom/branca
	2866	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2931	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	cinza/branca
	2952	Itaiópolis (SC)	Cupido	espiral	branca
	2958	Canoinhas (SC)	Ágata	espiral	branca
	2965	Canoinhas (SC)	Asterix	flexuosa	cinza/branca
	RS 19	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	RS23	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
Grupo 4 (G4)	2403	Uberaba (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2404	Uberaba (MG)	Ágata	espiral	cinza
	2405	Uberaba (MG)	Ágata	espiral	cinza
Grupo 5 (G5)	2509	França	Éden	espiral	cinza/branca

Tabela 7. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	Cultivar/ Hospedeiro	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
Grupo 5 (G5)	2805	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	branca
	2806	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2807	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	branca
	2812	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	cinza/branca
	2815	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2865	Itaiópolis (SC)	Markies	espiral	cinza/branca
	2949	Itaiópolis (SC)	Cupido	espiral	cinza/branca
	2953	Canoinhas (SC)	Asterix	espiral	cinza/branca
	2955	Itaiópolis (SC)	Markies	espiral	cinza/branca
Grupo 6 (G6)	2520	Paranapanema (SP)	Cupido	espiral	cinza/branca
	2521	Paranapanema (SP)	Cupido	espiral	cinza
	2522	Ibiraíaras (RS)	Cupido	espiral	cinza
	2524	Ibiraíaras (RS)	Cupido	espiral	cinza
Linhagens agrupadas com as do G6	2932	Água Doce (SC)	Ágata	flexuosa	marrom
	SC 3B	Água Doce (SC)	Ágata	flexuosa	marrom
Grupo 7 (G7)	2394	Cristalina (GO)	Ágata	espiral	cinza
	2503	Ibicoara (BA)	Monalisa	espiral	cinza
	2507	Ibicoara (BA)	Ágata	espiral	cinza
	2968	São Francisco de Paula (RS)	Ágata	espiral tufo	cinza
	RS 8	São Francisco de Paula (RS)	Ágata	espiral tufo	cinza
Grupo 8 (G8)	RS 17	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	branca
	RS 18	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	branca
	RS 21	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	branca
Grupo 9 (G9)	2823	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	creme claro/cinza
	2863	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	creme/cinza
	2867	Canoinhas (SC)	Ágata	espiral	creme/cinza
	2942	Canoinhas (SC)	Ágata	espiral	creme/cinza
	2959	Canoinhas (SC)	Ágata	espiral	creme/cinza
Grupo 10 (G10)	2862	Itaiópolis (SC)	Markies	flexuosa	creme/cinza
	2951	Itaiópolis (SC)	Cupido	flexuosa	branca
	2956	Itaiópolis (SC)	Cupido	flexuosa	cinza/gelo
	2957	Itaiópolis (SC)	Markies	flexuosa	cinza/gelo
Linhagens agrupadas com as do G10	2941	Itaiópolis (SC)	Markies	flexuosa	creme/cinza
Linhagens com perfis genéticos diferentes	2006	Chile	Atlantic	flexuosa	amarela/branca
	2229	Araxá (MG)	Asterix	flexuosa	cinza
	2258	Itapetininga (SP)	Cupido	espiral	branca

Tabela 7. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	Cultivar/ Hospedeiro	Micromorfologia de hifas	Cor do esporo
Linhagens com perfis genéticos diferentes	2804	Ibiraíaras (RS)	Asterix	espiral	cinza
	SC 10	Água Doce (SC)	Ágata	espiral tufo	marrom/cinza
Linhagens muito diferentes na análise filogenética	2343	S. Miguel Arcanjo (SP)	Cupido	flexuosa	cinza
	2344	S. Miguel Arcanjo (SP)	Cupido	flexuosa	cinza
	2435	Poços de Caldas (MG)	Ágata	espiral	branca
	SC 18	Papanduva (SC)	Ágata	espiral tufo	branca
	SC 23C	Canoinhas (SC)	Ágata	flexuosa	creme
Linhagens com perfis genéticos diferentes não patogênicas em minitubérculos	2467	Vargem Grande do Sul (SP)	Cupido	espiral	cinza
	SC 2B	Irineópolis (SC)	Ágata	espiral	marrom
	SC 12	Itaiópolis (SC)	Markies	espiral	verde/branca
	SC 15	Papanduva (SC)	Ágata	flexuosa	cinza

IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil); UFV (Universidade Federal de Viçosa, Brasil).

3. Caracterização patogênica

3.1 Linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata

3.1.1 Amplificação dos genes *necI*, *tomA* e operon *txtAB*

As linhagens Tipo das diferentes espécies de *Streptomyces* causadoras da sarna da batata foram avaliadas quanto à presença de marcadores moleculares de patogenicidade por meio da amplificação por PCR dos genes *necI*, com fragmento de aproximadamente 720 pares de bases (pb) (Figura 10), operon *txtAB*, com fragmento de 385 pb (Figura 11) e gene *tomA*, com fragmento de 392 pb (Figura 12).

As espécies *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T), *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T), *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T) e *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T) apresentaram a amplificação do fragmento de aproximadamente 720 pb, correspondente ao gene *necI* associado à virulência de *Streptomyces* spp.

A linhagem Tipo de *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) apresentou amplificação pouco intensa do fragmento esperado, porém com outros fragmentos inespecíficos (Figura 10, canaleta 6). As linhagens de *S. caviscabies*, *S. setonii*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S.*

sampsonii também apresentaram amplificações inespecíficas, com fragmentos de tamanhos diferentes daquele correspondente ao gene *necI*, considerado ausente nessas linhagens. A linhagem Tipo de *S. ipomoeae* também não apresentou a amplificação desse gene (Figura 10, canaleta 12).

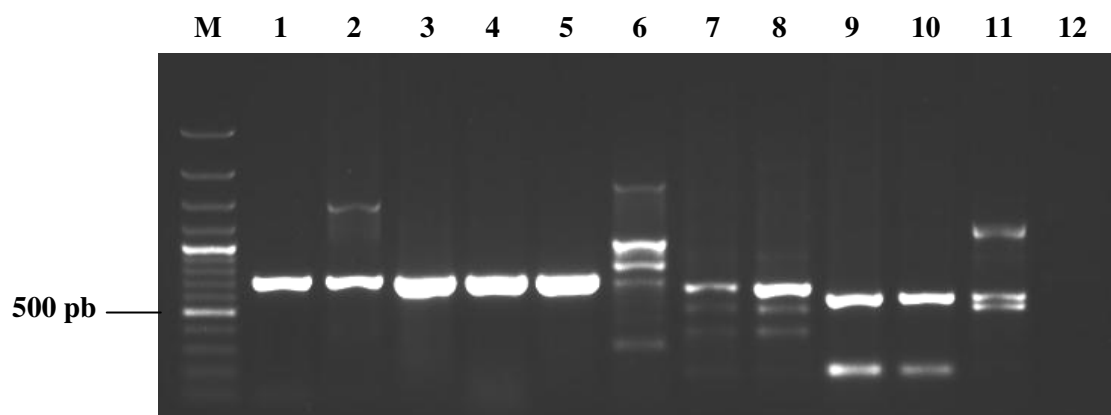


Figura 10. Amplificação por PCR do gene *necI* das diferentes linhagens Tipo de *Streptomyces*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2049^T); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T); (3) *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); (4) *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T); (5) *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T); (6) *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T); (7) *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T); (8) *S. setonii* (IBSBF 2106^T); (9) *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T); (10) *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T); (11) *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T); (12) *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T).

Com relação aos genes de biossíntese da taxtomina, as espécies *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T), *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T), *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T), *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T), *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T) e *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T) apresentaram amplificação do fragmento específico de aproximadamente 385 pb, correspondente ao operon *txtAB*. No entanto, para as linhagens *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T) e *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T) a amplificação desse fragmento foi pouco intensa (Figura 11, canaletas 9 e 10, respectivamente). Nas outras espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata, não ocorreu amplificação dos genes relacionados à síntese da taxtomina.

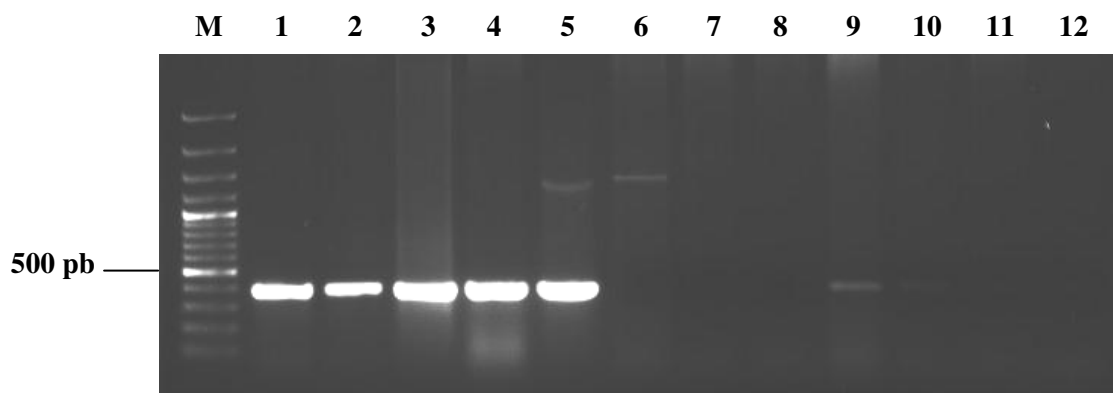


Figura 11. Amplificação por PCR do operon *txtAB* das diferentes linhagens Tipo de *Streptomyces*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2049^T); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T); (3) *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); (4) *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T); (5) *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T); (6) *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T); (7) *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T); (8) *S. setonii* (IBSBF 2106^T); (9) *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T); (10) *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T); (11) *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T); (12) *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T).

A amplificação do gene codificante da tomatinase foi detectada na maior parte das espécies de *Streptomyces* associadas à sarna. As linhagens *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T), *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T), *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T), *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T) e *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) apresentaram amplificação intensa do fragmento específico esperado de 392 pb, correspondente ao gene *tomA*. As espécies *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T) e *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T) (Figura 12, canaletas 9 e 10, respectivamente) apresentaram a amplificação pouco intensa desse fragmento. A espécie *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T), apresentou a amplificação de um fragmento de intensidade fraca um pouco maior que o esperado, com aproximadamente 420 pb (Figura 12, canaleta 11). As outras espécies, *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T), *S. setonii* (IBSBF 2106^T) e *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T) não apresentaram amplificação desse gene.

Os resultados da caracterização patogênica das linhagens Tipo estão apresentados na Tabela 8.

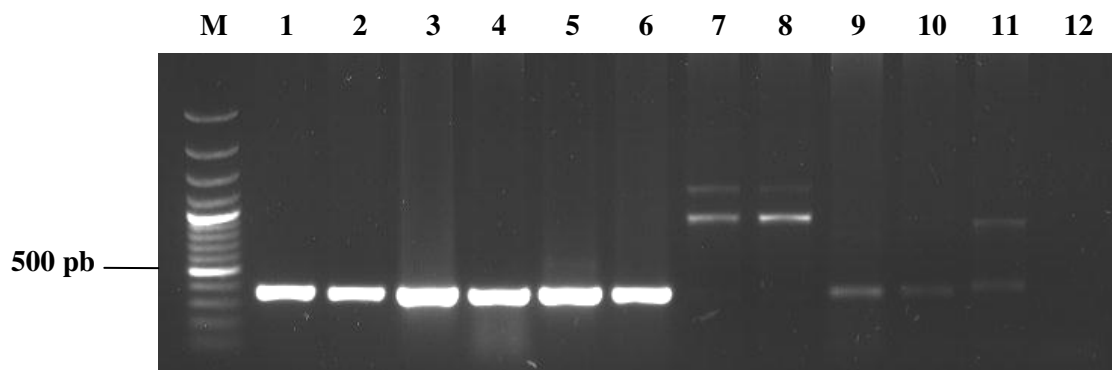


Figura 12. Amplificação por PCR do gene *tomA* das diferentes linhagens Tipo de *Streptomyces*. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2049^T); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T); (3) *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); (4) *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T); (5) *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T); (6) *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T); (7) *S. caviscaies* (IBSBF 2051^T); (8) *S. setonii* (IBSBF 2106^T); (9) *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T); (10) *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T); (11) *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T); (12) *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T).

Tabela 8. Amplificação dos genes de patogenicidade *nec1*, *tomA* e operon *txtAB* de linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata.

Espécie	IBSBF	<i>nec1</i>	<i>txtAB</i>	<i>tomA</i>
<i>S. scabiei</i>	2049 ^T	+++	+++	+++
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023 ^T	+++	+++	+++
<i>S. stelliscabiei</i>	2084 ^T	+++	+++	+++
<i>S. acidiscabies</i>	2110 ^T	+++	+++	+++
<i>S. turgidiscabies</i>	2114 ^T	+++	+++	+++
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086 ^T	-	-	+++
<i>S. caviscaies</i>	2051 ^T	-	-	-
<i>S. setonii</i>	2106 ^T	-	-	-
<i>S. luridiscabiei</i>	2011 ^T	-	+	+
<i>S. puniscabiei</i>	2012 ^T	-	+	+
<i>S. sampsonii</i>	2111 ^T	-	-	+
<i>S. ipomoeae</i>	2117 ^T	-	-	-

^T linhagem Tipo; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil); +++ (amplificação intensa); + (amplificação pouco intensa); - (ausência de amplificação).

Os resultados de caracterização dos genes de patogenicidade das linhagens Tipo foram concordantes com aqueles obtidos no estudo realizado por Wanner e colaboradores

(2006), sendo que no referido estudo somente as linhagens Tipo das espécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* e *S. acidiscabies* foram caracterizadas e todas também apresentaram a amplificação dos três genes de patogenicidade.

As espécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies* são causadoras da sarna comum, e, portanto, apresentam os genes da ilha de patogenicidade, como os de síntese de taxtomina, fitotoxina relacionada a ocorrência dos sintomas característicos de sarna. Nessas espécies também foi possível estabelecer a correlação entre a patogenicidade e a presença dos genes *nec1* e *tomA* que atuam reprimindo a resposta de defesa da planta (BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998; BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000; LORIA; KERS; JOSHI, 2006; JOSHI et al., 2007).

Outras espécies como *S. luridiscabiei* e *S. puniscabiei* foram descritas como causadoras da sarna comum e não produtoras de taxtomina em experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência (PARK et al., 2003b). No presente estudo essas linhagens apresentaram amplificação do gene *tomA* e do peron *txtAB*, indicando a possível presença desses genes. A intensidade fraca do produto de PCR obtido para essas linhagens pode ter ocorrido devido à possíveis diferenças na região de anelamento dos *primers* utilizados.

As espécies *S. caviscabies* e *S. setonii* também causam sintomas de sarna comum, mas não apresentaram amplificação dos genes *nec1*, *tomA* e do operon *txtAB*. Esses resultados sugerem que outras vias de patogenicidade podem estar sendo utilizadas por essas espécies.

As espécies *S. reticuliscabiei* e *S. sampsonii* apresentaram amplificação somente para o gene relacionado à síntese de tomatinase. *S. reticuliscabiei* é causadora da sarna reticulada (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2006) e, provavelmente, também deve utilizar outras vias de patogenicidade ainda não descritas e independentes dos genes da *txtAB* e *nec1*. A espécie *S. sampsonii*, considerada saprófita, é comumente isolada nas lesões de sarna, no entanto a amplificação pouco intensa do gene *tomA* nessa linhagem representou um resultado inédito na literatura, podendo ser um indício de seu potencial patogênico.

Nesse estudo não foi observada amplificação dos genes de patogenicidade para a espécie *S. ipomoeae*, patogênica à batata-doce, embora relatos de literatura indiquem a produção de taxtomina (LORIA; KERS; JOSHI, 2006) e ausência do gene *nec1* (HEALY et

al., 2000). Ainda, foi relatado que em *S. ipomoeae* existem diferenças nos genes relacionados à biossíntese de taxtomina, bem como dos mecanismos que regulam a expressão desses genes quando comparada a *S. scabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*. Segundo Healy e colaboradores (2000), as sintetases de taxtomina de *S. ipomoeae* não foram adquiridas através do mesmo tipo de mecanismo de transferência horizontal proposta para as três espécies acima citadas.

O operon *txtAB*, também utilizado nesse estudo, está relacionado com a síntese de taxtomina A, principal fitotoxina associada aos sintomas de sarna nas espécies *S. scabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*. *S. ipomoeae* também produz a taxtomina A, no entanto a taxtomina C é o composto preferencialmente produzido por essa espécie (KING et al., 1994; LORIA et al., 1997; BUKHALID; CHUNG; LORIA, 1998). As diferenças nos tipos de taxtominas produzidas poderiam assim explicar a ausência de amplificação dos genes correspondentes ao operon *txtAB*, uma vez que diferenças na região dos genes de síntese de taxtomina poderiam ter dificultado o anelamento dos *primers* utilizados, desenhados com base no genoma de *S. acidiscabies*.

3.1.2 Teste de patogenicidade em minitubérculos de batata

Para a padronização desse teste foram utilizadas duas cultivares de batata suscetíveis à sarna, Ágata e Cupido. Essas variedades tiveram sua suscetibilidade avaliada contra 44 linhagens de *Streptomyces*, selecionadas ao acaso. Dessas, 32 apresentaram os mesmos resultados de virulência em minitubérculos das duas cultivares; nove mostraram-se mais virulentas na variedade Ágata; e três mais virulentas na variedade Cupido.

Segundo estudo realizado por Fischer e colaboradores (2009), das cultivares de batata mais utilizadas para plantio no Brasil, Cupido é a mais suscetível à sarna comum causada por *Streptomyces scabiei*, sendo menos resistente que a cultivar Ágata. Os resultados obtidos na padronização do teste mostraram que essas variedades não apresentam muitas diferenças quanto à sua suscetibilidade e que Ágata foi mais suscetível à nove linhagens testadas.

Assim, no teste de caracterização patogênica das linhagens Tipo de *Streptomyces* utilizadas nesse estudo foram utilizados apenas minitubérculos da cultivar Ágata. As diferentes espécies de *Streptomyces* avaliadas apresentaram graus de virulência variados

nos minitubérculos, que foram quantificados pela intensidade da necrose após dez dias da inoculação (Tabela 9).

Tabela 9. Resultado do teste de patogenicidade em minitubérculos de batata da variedade Ágata para as linhagens Tipo de *Streptomyces*.

Espécie	IBSBF	Patogenicidade em minitubérculos
<i>S. scabiei</i>	2049 ^T	++
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023 ^T	++
<i>S. stelliscabiei</i>	2085 ^T	+++
<i>S. acidiscabies</i>	2110 ^T	+++
<i>S. turgidiscabies</i>	2114 ^T	+++
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086 ^T	++
<i>S. caviscabies</i>	2051 ^T	+
<i>S. setonii</i>	2106 ^T	+++
<i>S. luridiscabiei</i>	2011 ^T	+
<i>S. puniscabiei</i>	2012 ^T	+++
<i>S. sampsonii</i>	2111 ^T	++
<i>S. ipomoeae</i>	2117 ^T	+++

^T linhagem Tipo; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil); (+++) muito virulenta; (++) moderadamente virulenta; (+) pouco virulenta.

As linhagens que apresentaram os três genes de patogenicidade, *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies*, foram muito ou moderadamente virulentas em minitubérculos. As linhagens Tipo de *S. luridiscabiei* e *S. puniscabiei* não apresentaram o gene *necl* e foram pouco e muito virulentas em minitubérculos, respectivamente. As linhagens Tipo de *S. reticuliscabiei* e *S. sampsonii* apresentaram amplificação somente do gene *tomA* e mostraram-se moderadamente virulentas em minitubérculos, mesmo na ausência de amplificação de outros genes de patogenicidade considerados essenciais, como os de biossíntese da taxtomina (*txtAB*).

As espécies Tipo que não apresentaram sinal de amplificação dos genes de patogenicidade avaliados apresentaram graus de virulência diferentes em minitubérculos. *S. caviscabies* mostrou-se pouco virulenta (+) em minitubérculos, enquanto que *S. setonii* e *S. ipomoeae* foram muito virulentas (+++) (Tabela 9). A patogenicidade dessas linhagens

pode ser explicada pela utilização de outras vias diferentes da ilha de patogenicidade presente na maior parte das espécies.

Nesse estudo, as espécies *S. sampsonii* e *S. ipomoeae* mostraram-se patogênicas à batata causando necrose nos minitubérculos, embora *S. sampsonii* seja considerada não patogênica e *S. ipomoeae*, causadora da sarna da batata-doce, não tenha sido relatada anteriormente como causadora de doença em batata.

Cabe ressaltar que foram observadas diferenças nos graus de virulência das linhagens Tipo causadoras da sarna comum, até mesmo entre as genomoespécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*, e esse fato ressalta, portanto, a importância da identificação da espécie causadora. Além disso, a identificação do agente causal é muito importante, pois para diferentes linhagens as medidas de manejo a serem adotadas podem ser bem distintas.

3.2 Caracterização patogênica de linhagens de *Streptomyces* sp.

3.2.1 Amplificação dos genes *nec1*, *tomA* e operon *txtAB*

As 178 linhagens desse estudo foram avaliadas quanto à presença dos genes *nec1*, *tomA* e do operon *txtAB* (Tabela 10).

Noventa e quatro linhagens (52,8%) apresentaram amplificação dos três genes de patogenicidade avaliados, quatorze não apresentaram nenhum dos genes (7,9%) e 70 linhagens (39,3%) apresentaram variações com a ausência de um ou mais genes demonstrando alta variabilidade na ilha de patogenicidade (Tabelas 10 e 11). Essa variação também foi encontrada na caracterização patogênica de linhagens obtidas de campos de produção de batata nos Estados Unidos, em um levantamento realizado Wanner (2006). Nessa caracterização foi avaliada a presença dos mesmos genes de patogenicidade e pelo menos dez das 92 linhagens analisadas apresentaram variações no conjunto desses genes.

Apesar das variações encontradas entre as linhagens, os casos mais comuns foram a presença dos três genes de patogenicidade (94 linhagens) ou pelo menos dos genes da *txtAB* e *tomA* (38 linhagens). Em muitas delas (74 linhagens) não foi observada a presença do gene *nec1*.

As 14 linhagens que não apresentaram os genes de patogenicidade avaliados poderiam ser consideradas como:

- linhagens do gênero *Streptomyces* que não são patogênicas à batata. Nesse caso, a sua ocorrência nas amostras de tecido vegetal infectado foi devido ao fato desse gênero estar representado por saprófitas habitantes de solo, ou;
- linhagens pertencentes à espécies como *S. caviscabies*, *S. setonii* ou *S. ipomoeae* que não possuem esses genes.

Para essas linhagens foi imprescindível a utilização de testes em minitubérculos para confirmação da patogenicidade.

3.2.2 Teste de patogenicidade em minitubérculos de batata

O teste em minitubérculos foi utilizado para confirmação da patogenicidade de todas as linhagens que não apresentaram o gene *nec1*, de algumas que apresentaram somente um a dois genes ou nenhum deles. No total, foram avaliadas 110 linhagens de *Streptomyces* sp., sendo que 94 foram patogênicas e exibiram graus variados de virulência, quantificados de acordo com a intensidade de necrose nos minitubérculos (Figura 13 e Tabela 10). As outras dezesseis linhagens apresentaram resultados negativos de patogenicidade e nesse caso foram realizadas duas repetições do teste de patogenicidade a fim de se confirmar os resultados obtidos. Essas linhagens foram consideradas não patogênicas, porém não saprófitas pois algumas apresentaram amplificação de genes marcadores de patogenicidade.

O teste de patogenicidade em minitubérculos utilizado mostrou-se muito eficiente para a avaliação da patogenicidade, possibilitando a discriminação de linhagens patogênicas. As linhagens patogênicas colonizaram as fatias de batata causando a aderência do meio de cultura inoculado com a bactéria na superfície do tubérculo e posterior necrose no tecido abaixo e ao redor do disco de inóculo. Para as linhagens consideradas não patogênicas não ocorreu necrose e nem colonização da bactéria na superfície do tubérculo.

Os resultados de caracterização patogênica das 178 linhagens de *Streptomyces* sp. estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

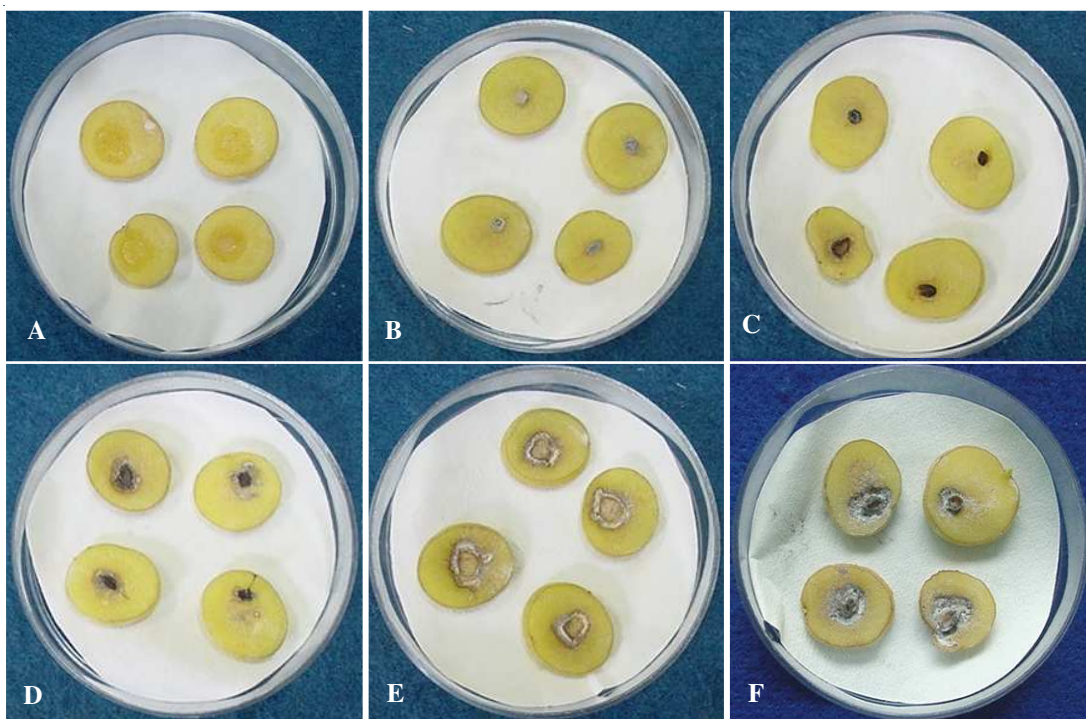


Figura 13. Necrose em fatias de minitubérculos de batata da variedade Ágata após teste de patogenicidade. (A) Controle negativo; (B) SC 2B linhagem não patogênica (-); (C) IBSBF 2958 pouco virulenta (+); (D) IBSBF 2952 moderadamente virulenta (++); (E) IBSBF 2867 muito virulenta (+++); (F) IBSBF 2811 muito virulenta (+++).

Tabela 10. Caracterização da patogenicidade das linhagens de *Streptomyces* sp. pela amplificação dos genes *nec1*, *tomA* e operon *txtAB* e por teste de patogenicidade em minitubérculos de batata.

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Patogenicidade em minitubérculos	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>	<i>txtAB</i>
<i>S. scabiei</i>	1774	n/a	+++	+++	+++
	1884	n/a	+++	+++	+++
	1886	n/a	+++	+++	+++
	1936	n/a	+++	+++	+++
	2005	n/a	+++	+++	+++
	2124	n/a	+++	+++	+++
	2147	n/a	+++	++	+++
	2203	n/a	+++	++	+++
	2204	n/a	+++	+++	+++
	2228	n/a	+++	++	+++
	2239	n/a	+++	+++	+++
	2242	n/a	+++	+++	+++
	2243	n/a	+++	+++	+++

Tabela 10. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Patogenicidade em minitubérculos	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>	<i>txtAB</i>
<i>S. scabiei</i>	2248	n/a	+++	+++	+++
	2250	n/a	+++	+++	+++
	2251	n/a	+++	+++	+++
	2257	n/a	+++	+++	+++
	2282	n/a	+++	+++	+++
	2283	n/a	+++	+++	+++
	2292	n/a	+++	+++	+++
	2293	n/a	+++	+++	+++
	2294	n/a	+++	+++	+++
	2298	n/a	+++	+++	+++
	2306	n/a	+++	+++	+++
	2308	n/a	+++	+++	+++
	2315	n/a	+++	+++	+++
	2316	n/a	+++	+++	+++
	2317	n/a	+++	+++	+++
	2318	n/a	+++	+++	+++
	2359	+++	+++	+++	+++
	2388	n/a	+++	+++	+++
	2396	n/a	+++	+++	+++
	2406	n/a	+++	+++	+++
	2407	n/a	+++	+++	+++
	2408	n/a	+++	+++	+++
	2409	n/a	+++	+++	+++
	2410	n/a	+++	+++	+++
	2411	n/a	+++	+++	+++
	2429	n/a	+++	+++	+++
	2475	n/a	+++	+++	+++
	2476	n/a	+++	+++	+++
	2482	n/a	+++	+++	+++
	2500	n/a	+++	+++	+++
	2501	n/a	+++	+++	+++
	2502	n/a	+++	+++	+++
	2523	n/a	+++	+++	+++
	2527	n/a	+++	+++	+++
	2809	+++	+++	+++	+++
	2811	+++	+++	+++	+++
	2814	+++	+++	+++	+++
	2860	++	+++	+++	+++

Tabela 10. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Patogenicidade em minitubérculos	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>	<i>txtAB</i>
<i>S. scabiei</i>	2950	+++	+++	+++	+++
	2954	+++	+++	+++	+++
	RS 1	+++	+++	+++	+++
	RS 2	+++	+++	+++	+++
	RS 4	+++	+++	+++	+++
	RS 5	+++	+++	+++	+++
<i>S. europaeiscabiei</i>	1945	n/a	+++	+++	+++
	2474	n/a	+++	+++	+++
	2498	n/a	+++	+++	+++
	2510	n/a	+++	+++	+++
<i>S. ipomoeae</i>	1773	+	+	+	+
	2397	+	-	+	-
	2401	+++	-	+	+
	2402	+	-	+	+
	2426	+	-	-	-
	2427	+	-	+	+
	2428	+	-	+	+
	2430	+	-	-	-
	2431	+	-	+	+
	2432	+	-	+	+
	2437	-	-	+	+
	2438	n/a	-	+	+
	2439	n/a	+++	+	+
	2449	-	-	+	-
	2450	+	+	+	+
	2455	n/a	+	+	+
	2466	+	-	+	+
	2468	-	+	+	-
	2483	-	-	-	-
	2484	n/a	+++	+	+
	2485	n/a	+++	-	-
	2486	-	-	-	-
	2528	+	-	+	+
	2529	-	-	+	+
	2960	+	-	-	-
	2964	+	-	-	-
	2967	+	-	-	-
	2969	+	-	-	-

Tabela 10. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Patogenicidade em minitubérculos	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>	<i>txtAB</i>
Linhagens agrupadas com <i>S. ipomoeae</i>	2019	n/a	+	+	+
<i>S. caviscabies</i> / <i>S. setonii</i>	2021	++	+	-	+
	2235	++	-	+	+
	2236	n/a	+++	+++	+++
	2260	++	-	++	++
	2368	+++	-	++	++
	2389	+	-	+	-
	2391	++	-	+	+
	2392	+	-	+	+
	2393	+	-	+	+
	2398	-	-	+	+
	2399	-	-	+	-
	2400	+++	-	+	+
	2861	-	-	-	-
<i>S. sampsonii</i>	2020	+	-	+	-
	2360	n/a	+	+	+
Grupo 1 (G1)	1943	n/a	+++	+++	+++
	1944	n/a	+++	+++	+++
	2162	n/a	+++	+++	+++
	2351	n/a	+++	+++	+++
	2472	n/a	+++	+++	+++
	2473	n/a	+++	+++	+++
	2499	n/a	+++	+++	+++
	2508	n/a	+++	+++	+++
Grupo 2 (G2)	2247	+	-	+	+
	2352	++	-	+	+
	2390	+++	-	+	+
Agrupadas com linhagens do G2	2864	+	-	-	+
	2970	+	+	+	+
Grupo 3 (G3)	2395	n/a	+++	+++	+++
Linhagens agrupadas com as do G3	2808	+++	-	+	-
	2866	++	++	+	-
	2931	+++	+++	++	++
	2952	++	-	+	+
	2958	+	-	+	+
	2965	++	+	++	+
	RS 19	-	-	+	-
	RS 23	+	-	+	-

Tabela 10. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Patogenicidade em minitubérculos	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>	<i>txtAB</i>
Grupo 4 (G4)	2403	+++	-	+	+
	2404	+++	-	+	+
	2405	+++	-	+	+
Grupo 5 (G5)	2509	+	+++	-	++
	2805	+++	-	++	-
	2806	+++	-	-	-
	2807	+++	-	+	-
	2812	+++	-	-	+++
	2815	+++	-	+	-
	2865	+++	-	+	+
	2949	+++	-	+	+
	2953	+++	-	+	+
	2955	+	-	+	+
Grupo 6 (G6)	2520	+	+	+	+
	2521	+	+	+	+
	2522	+++	+	+	+
	2524	+++	+	++	+
Linhagens agrupadas com as do G6	2932	+++	+++	-	+
	SC 3B	+++	+++	-	+
Grupo 7 (G7)	2394	+	-	-	-
	2503	n/a	+	+	+
	2507	+	-	-	-
	2968	+	++	-	-
	RS 8	-	-	-	-
Grupo 8 (G8)	RS 17	+	-	+	-
	RS 18	-	-	+	-
	RS 21	+	-	+	-
Grupo 9 (G9)	2823	+++	+++	+++	+++
	2863	+++	-	+++	+++
	2867	+++	+++	+++	+++
	2942	+++	+++	+++	+++
	2959	+++	+++	+++	+++
Grupo 10 (G10)	2862	+	+++	+	+
	2951	++	+++	+	+
	2956	+	+++	+	+
	2957	+	-	-	+
Linhagens agrupadas com as do G10	2941	+++	+++	+	+

Tabela 10. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Patogenicidade em minitubérculos	<i>nec1</i>	<i>tomA</i>	<i>txtAB</i>
Linhagens com perfis genéticos diferentes	2006	+	-	-	-
	2229	+	+++	+	+
	2258	+	-	+	+
	2804	+++	++	+	-
	SC 10	+	-	-	+
Linhagens muito diferentes na análise filogenética	2343	+	-	+	+
	2344	+	-	+	+
	2435	+++	-	+	-
	SC 18	++	-	-	+
	SC 23C	+	-	+	+
Linhagens com perfis diferentes não patogênicas em minitubérculos	2467	-	-	+	+
	SC 2B	-	-	-	++
	SC 12	-	-	+	+
	SC 15	-	-	-	+

Amplificação dos genes de patogenicidade: (+) amplificação pouco intensa; (++) amplificação moderada; (+++) amplificação intensa; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil); Patogenicidade: (n/a) não avaliada; (-) não patogênica; (+) pouco virulenta; (++) moderadamente virulenta; (+++) muito virulenta; UFV (Universidade Federal de Viçosa, Brasil).

3.2.3 Patogenicidade das linhagens de *Streptomyces* sp.

O primeiro marcador molecular de patogenicidade utilizado nesse estudo foi o gene *nec1*. No entanto, das 162 linhagens nacionais consideradas patogênicas em minitubérculos, cerca de 36,4% (59 linhagens) não apresentaram a amplificação desse gene.

No estudo de Wanner (2006) alguns isolados patogênicos não apresentaram um ou mais genes característicos da ilha de patogenicidade, mas todos apresentaram o gene de biossíntese da taxtomina, que é considerado o determinante da patogenicidade. Assim, o operon *txtAB* foi avaliado como um segundo marcador molecular de patogenicidade e das 162 linhagens patogênicas em minitubérculos, 84,6% apresentaram a amplificação desse operon. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, o operon *txtAB* mostrou-se um bom marcador molecular para a caracterização patogênica das linhagens, mas como o gene *nec1*, a não ocorrência de amplificação em algumas linhagens não refletiu em ausência de patogenicidade nos minitubérculos de batata.

Foram observadas diferentes combinações de amplificação dos três genes de patogenicidade nas linhagens analisadas. Na maioria das linhagens patogênicas em minitubérculos os genes relacionados à síntese de taxtomina estiveram presentes, no entanto, 25 linhagens mostraram-se patogênicas mesmo na ausência de amplificação desse gene. Duas linhagens (IBSBF 2485 e 2968) apresentaram somente o gene *necI*, outras duas (IBSBF 2804 e 2866) apresentaram o gene *necI* e *tomA* e 11 foram patogênicas somente com a presença do gene relacionado à síntese da tomatinase. Outras dez linhagens mostraram-se patogênicas em minitubérculos e não apresentaram nenhum dos genes da ilha de patogenicidade (Tabela 11). Esses casos indicaram que, embora o operon *txtAB* tenha sido considerado um bom marcador molecular para a caracterização patogênica de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata, no caso da ausência de amplificação desse gene, haverá necessidade da realização de testes em minitubérculos para confirmação da patogenicidade das linhagens.

Tabela 11. Balanço do número de linhagens de *Streptomyces* analisadas com relação ao conjunto dos três genes de patogenicidade avaliados e teste de patogenicidade em minitubérculos de batata.

Genes de patogenicidade			Patogenicidade em minitubérculos				Total de linhagens
<i>txtAB</i>	<i>necI</i>	<i>tomA</i>	Não patogênicas	Pouco virulentas	Moderadamente virulentas	Muito virulentas	
+	+	+	n/a	n/a	n/a	n/a	94
+	+	-	0	2	1	2	5
+	-	+	5	17	5	11	38
+	-	-	2	3	1	1	7
-	+	+	1	0	1	1	3
-	+	-	n/a	n/a	n/a	n/a	2
-	-	+	4	6	0	5	15
-	-	-	4	9	0	1	14

(+) amplificação do gene; (-) ausência de amplificação do gene; (n/a) não avaliada devido à presença do gene *necI*.

Em estudo realizado por Wanner (2007) uma linhagem filogeneticamente relacionada com *S. scabies* e *S. europaeiscabiei*, mas com diferenças na patogenicidade devido à ausência do gene *necI*, foi descrita como nova espécie. Assim, as variações na ocorrência da amplificação dos genes de patogenicidade, observadas nesse estudo, indicaram a

possível ocorrência de novas espécies ou de variantes dentro das espécies, refletindo a alta diversidade genética das linhagens analisadas.

A transferência horizontal de genes leva à evolução da patogenicidade em procariotos. As ilhas de patogenicidade são grupos de genes de virulência unidos através de múltiplas tranferências e eventos de recombinação. Essas ilhas possuem um mosaico de estruturas e estão em contínuo processo de aquisição e perda de genes (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Esse processo poderia explicar as grandes variações nas ilhas de patogenicidade de linhagens observadas no presente estudo.

Os resultados de caracterização patogênica envolvendo a amplificação dos genes de patogenicidade e os graus de virulência em minitubérculos de batata observados permitiram algumas conclusões sobre a patogenicidade de *Streptomyces*.

Das 16 linhagens não patogênicas em minitubérculos, quatro não apresentaram nenhum gene de patogenicidade e as outras 12 apresentaram amplificação fraca de um ou mais genes. Uma hipótese para explicar esse fato seria que nessas linhagens os fatores que regulam a expressão desses genes podem estar ausentes ou reprimidos, não ocorrendo desenvolvimento de patogenicidade mesmo na presença do gene.

A maior parte das linhagens patogênicas apresentou os três genes ou pelo menos os genes relacionados à síntese da taxtomina e tomatinase, porém, não foi possível correlacionar a presença desses genes e o grau de virulência. Linhagens que apresentaram amplificação dos três genes mostraram-se pouco, moderadamente ou muito virulentas. Além disso, linhagens com ausência de amplificação desses genes foram capazes de causar a necrose mostrando-se muita virulentas.

Ainda, algumas linhagens foram muito virulentas em minitubérculos e apresentaram somente amplificação para o gene da tomatinase (*tomA*). Em outros casos linhagens mostraram-se patogênicas mesmo com ausência de amplificação desse gene. Assim, a tomatinase, como a proteína Nec1, também atua reprimindo a defesa da planta, sendo um fator importante, mas não indispensável para a patogenicidade.

4. Caracterização molecular

4.1 Primers espécie-específicos

Primers específicos para as espécies *S. scabiei* e *S. turgidiscabies* disponíveis na literatura foram utilizados para auxiliar na identificação das linhagens de *Streptomyces* sp. analisadas nesse estudo. Para isso, experimentos de verificação da especificidade desses *primers* foram inicialmente realizados utilizando as linhagens Tipo de *Streptomyces* (Tabela 2).

Com a utilização do par de *primers* ScabI/ScabII, específico para *S. scabiei*, foram obtidos resultados positivos de amplificação para as espécies *S. scabiei* (IBSBF 2049^T), *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T), *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T) e *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T).

Utilizando-se o par de *primers* TurgI/TurgII, específico para *S. turgidiscabies*, foram obtidos resultados positivos de amplificação para *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T), *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T) e *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T) (Figura 14).

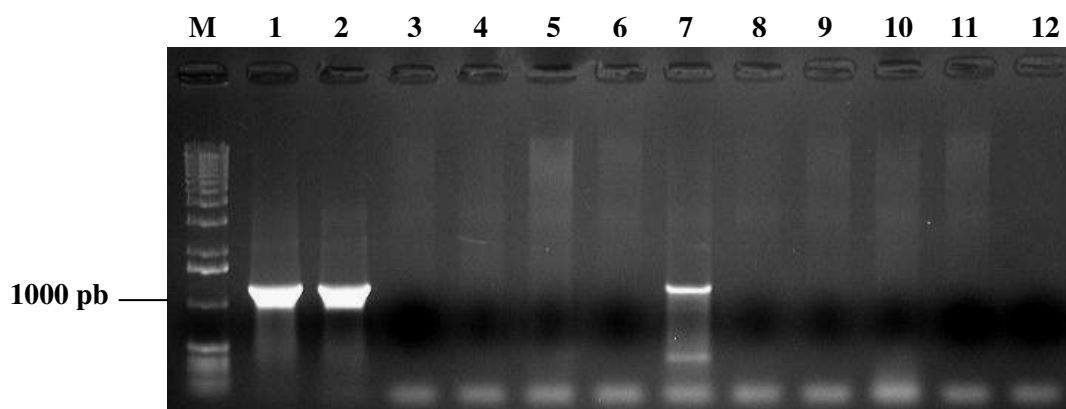


Figura 14. Amplificação das linhagens Tipo de *Streptomyces* com o par de *primers* TurgI/TurgII. (M) Marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco); (1) *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T); (2) *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T); (3) *S. scabiei* (IBSBF 2049^T); (4) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T); (5) *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T); (6) *S. puniciscabiei* (IBSBF 2012^T); (7) *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); (8) *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T); (9) *S. setonii* (IBSBF 2106^T); (10) *S. acidiscabiei* (IBSBF 2110^T); (11) *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T); (12) *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T).

Segundo Lehtonen, Rantala e Kreuze (2004), com a utilização da combinação ScabI/ScabII somente as espécies *S. scabiei* e *S. europaeiscabiei* apresentaram resultados positivos de amplificação e com a combinação TurgI/TurgII, específica para *S.*

turgidiscabies, foram obtidos resultados positivos de amplificação para *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T) e *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T). No presente estudo, as mesmas condições de amplificação sugeridas na literatura foram empregadas, porém não foram obtidos os mesmos resultados, sendo que foi observada a amplificação positiva em linhagens não citadas no referido trabalho.

Mesmo com esses resultados, esses *primers* foram empregados nas amplificações dos DNAs das linhagens de *Streptomyces* sp. Nas amplificações com os *primers* ScabI/ScabII, das 178 linhagens avaliadas, 79 delas apresentaram sinal de amplificação podendo, assim, pertencer as espécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* ou *S. turgidiscabies* (Tabela 12). Um total de 88 linhagens, incluindo as que apresentaram sinal de amplificação com *primers* ScabI/ScabII, foi avaliado com a utilização dos *primers* TurgI/TurgII e não ocorreu sinal de amplificação para nenhuma delas, sugerindo que as mesmas provavelmente não pertençam as espécies *S. turgidiscabies*, *S. reticuliscabiei* ou *S. stelliscabiei* (Tabela 12).

4.2 Análises de PCR-RFLP do gene *atpD*

O gene *atpD* foi avaliado como marcador molecular para diferenciação das linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata.

A amplificação de parte desse gene gerou um fragmento de 998 pb para todas as linhagens Tipo testadas. Nas digestões realizadas com as enzimas *Dde* I, *Hinf* I, *Hpa* II ou *Taq* I os perfis de restrição obtidos foram idênticos ou muito similares, dificultando a diferenciação dessas linhagens. As enzimas *Alu* I, *Hsp* 92 II, *Mbo* I ou *Rsa* I geraram perfis que possibilitaram a diferenciação de algumas linhagens Tipo, porém as enzimas que geraram maiores polimorfismos foram *Cfo* I e *Hae* III.

A digestão utilizando a enzima *Hae* III gerou perfis distintos e singulares para as espécies de *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. sampsonii* e *S. ipomoeae*. No entanto, não foi possível a diferenciação entre: *S. reticuliscabiei* e *S. turgidiscabies*, consideradas genomoespécies (Figura 15, canaletas 5 e 6); e entre *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T), *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T), *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T) e *S. setonii* (IBSBF 2106^T) (Figura 15, canaletas 7, 8, 9 e 10 respectivamente). Mas, utilizando a enzima *Cfo* I, foi possível diferenciar as espécies *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T)

e *S. setonii* (IBSBF 2106^T) de *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T) e *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T) (Figura 16, canaletas 7, 8, 9 e 10 respectivamente).

Os resultados obtidos indicaram que a análise de PCR-RFLP do gene *atpD*, utilizando as enzimas de restrição *Cfo* I ou *Hae* III, pode ser empregada para a diferenciação das principais espécies de *Streptomyces* causadoras da sarna. A utilização dessas enzimas permitiu a diferenciação até mesmo de espécies próximas como *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*, consideradas genomoespécies.

Diante desses resultados, decidiu-se empregar essa técnica para a caracterização de todas as 178 linhagens envolvidas nesse estudo (Tabela 12). Algumas linhagens apresentaram perfis de PCR-RFLP do gene *atpD* idênticos aos das linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna. A partir desses dados moleculares em associação com resultados de morfologia foi possível a identificação de 57 linhagens da espécie *S. scabiei* (*Ssc*), 28 linhagens de *S. ipomoeae* (*Sip*), 13 linhagens de *S. caviscabies* (*Sca*) ou *S. setonii* (*Sse*), quatro de *S. europaeiscabiei* (*Seu*) e 2 linhagens de *S. sampsonii*.

No entanto, as 74 linhagens restantes apresentaram perfis genéticos diferenciados das linhagens Tipo de *Streptomyces* ou perfis genéticos que não corroboraram com as demais características morfológicas e/ou patogênicas. Essas linhagens podem, portanto, representar novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna.

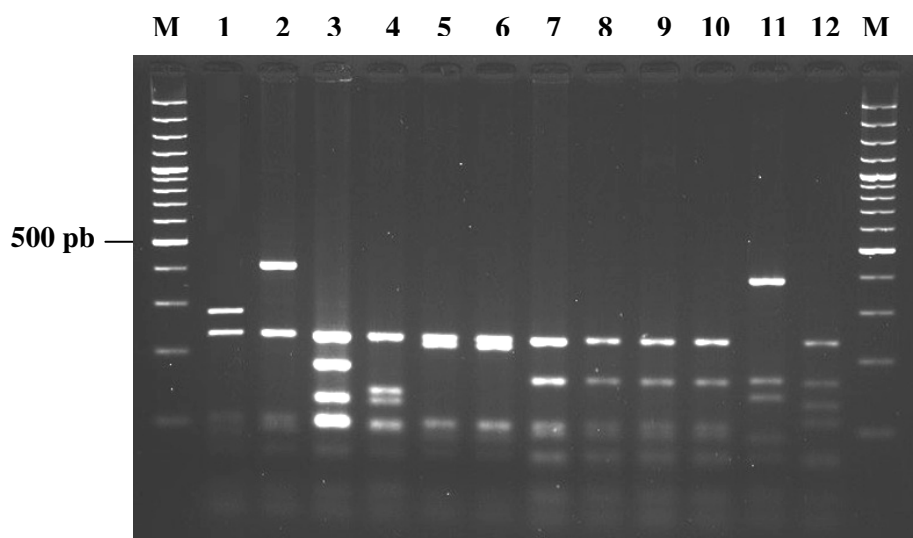


Figura 15. Produtos de amplificação correspondentes à parte do gene *atpD* das linhagens Tipo de *Streptomyces* digeridos com a enzima *Hae* III. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2049^T); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T); (3) *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); (4) *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T); (5) *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T); (6) *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T); (7) *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T); (8) *S. setonii* (IBSBF 2106^T); (9) *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T); (10) *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T); (11) *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T); (12) *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T).

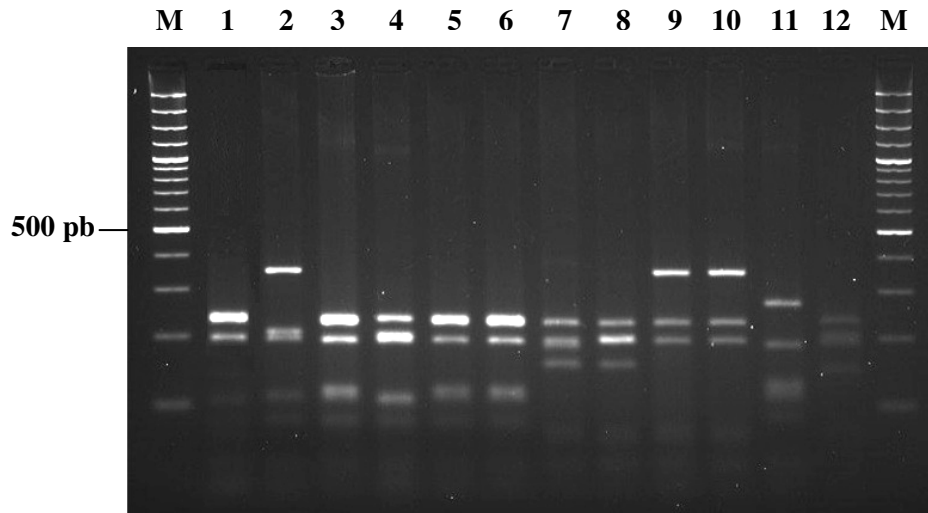


Figura 16. Produtos de amplificação correspondentes à parte do gene *atpD* das linhagens Tipo de *Streptomyces* digeridos com a enzima *Cfo* I. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) *S. scabiei* (IBSBF 2049^T); (2) *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T); (3) *S. stelliscabiei* (IBSBF 2085^T); (4) *S. acidiscabies* (IBSBF 2110^T); (5) *S. turgidiscabies* (IBSBF 2114^T); (6) *S. reticuliscabiei* (IBSBF 2086^T); (7) *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T); (8) *S. setonii* (IBSBF 2106^T); (9) *S. luridiscabiei* (IBSBF 2011^T); (10) *S. puniscabiei* (IBSBF 2012^T); (11) *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T); (12) *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T).

4.3 Análise de Multilocus das linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata

Diferentes marcadores moleculares foram testados visando um estudo filogenético das espécies Tipo de *Streptomyces* por meio de análise de multilocus. As sequências obtidas correspondentes à parte dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* foram utilizadas para a construção de árvore filogenética e matriz de similaridade das linhagens (Figura 17 e Anexo 2). As análises foram efetuadas separadamente para cada um dos genes e por fim as sequências foram concatenadas para a construção de uma única árvore filogenética, na qual as linhagens formaram três grupos principais (Figura 17).

O grupo I, suportado em 100% das repetições de *bootstrap* realizadas, ficou composto por três subgrupos: subgrupo I-A formado pelas espécies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei*; e subgrupo I-B formado por *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei*. O subgrupo I-C ficou representado apenas pela espécie *S. acidiscabies*, que ficou isolada das demais espécies desse grupo.

Na árvore filogenética construída a similaridade das espécies *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei* com *S. scabiei* foi de 94,4% e 97,2%, respectivamente. Já a similaridade entre *S. europaeiscabiei* e *S. stelliscabiei* foi de 95% (Anexo 2). O agrupamento das espécies *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* e *S. scabiei* no subgrupo I-A foi suportado por 95% das repetições de *bootstrap* e ficou de acordo com o esperado, visto que, essas espécies são consideradas genomoespécies com base em experimentos de hibridização DNA-DNA (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000). As espécies *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei*, também consideradas genomoespécies, com base em análises filogenéticas do gene 16S RNAr e hibridização DNA-DNA (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2006), formaram um subgrupo suportado por 100% das repetições de *bootstrap* e apresentaram 99,6% similaridade nas sequências dos genes analisados (Anexo 2).

A espécie *S. sampsonii* mostrou-se isolada das demais, formando o grupo II, relacionado com o grupo I.

Um terceiro grupo, suportado por 100% das repetições de *bootstrap*, ficou composto por três subgrupos: subgrupo III-A formado por *S. setonii* e *S. caviscabies*, com 99,3% de similaridade entre as sequências; e subgrupo III-B com as espécies *S. luridiscabiei* e

S. puniscabiei, com 99,7% de similaridade em suas sequências (Anexo 2). Nesse grupo, a espécie *S. ipomoeae* ficou isolada das demais formando o subgrupo III-C.

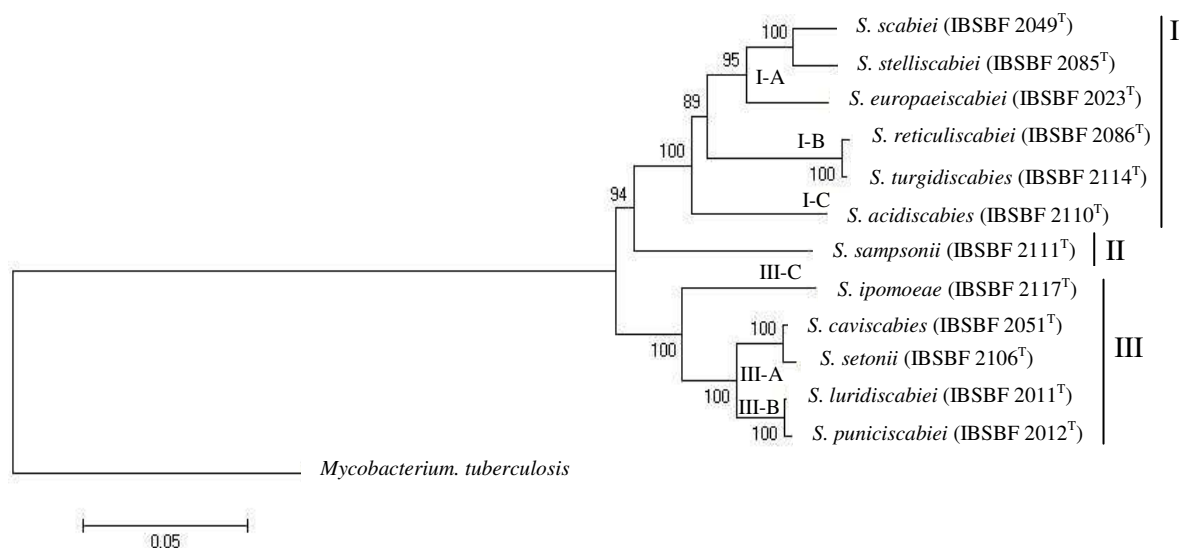


Figura 17. Árvore filogenética construída a partir das sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* das 12 linhagens Tipo de *Streptomyces* causadoras da sarna da batata, utilizando-se o método *Neighbor-joining*. A sequência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 5% de diferença nas sequências.

A análise filogenética de parte dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* permitiu a diferenciação das principais linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas a sarna, as quais ficaram separadas em grupos e subgrupos bem consistentes de acordo com os valores de *bootstrap* obtidos (maiores que 89%). Com exceção das espécies do subgrupo I-A, com similaridades de no máximo 97,2%, as genomoespécies *S. luridiscabiei* e *S. puniscabiei*; *S. setonii* e *S. caviscabies*; e *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei* apresentaram alta similaridade entre si, dificultando a separação das mesmas com base nas sequências dos diferentes genes avaliados (Anexo 2). Cabe ressaltar, que os resultados de grupamento obtidos nesta análise filogenética estão de acordo com aqueles de PCR-RFLP do gene *atpD*, apresentados no item 4.2, que também possibilitou a diferenciação dessas espécies.

4.4 Análise de multilocus das linhagens de *Streptomyces* sp.

Os perfis obtidos a partir do uso da técnica de PCR-RFLP do gene *atpD* juntamente com dados de caracterização morfológica, amplificação com *primers* espécie-específicos e análise da presença dos genes de patogenicidade permitiram a identificação de algumas

linhagens como espécies já descritas. Mesmo assim, algumas dessas linhagens foram selecionadas para sequenciamento e as sequências dos genes *rpoB* e, em alguns casos, *atpD* foram utilizadas na confirmação da identificação proposta por meio da construção de árvores filogenéticas e matrizes de similaridades incluindo as linhagens Tipo associadas à sarna. Os resultados de similaridade de sequências e os grupos formados nas árvores filogenéticas construídas corroboraram com a caracterização polifásica e confirmaram a identificação proposta para as linhagens em questão (Tabela 12).

Entretanto, para algumas linhagens os resultados foram divergentes com relação às análises morfológicas, patogênicas e moleculares (PCR-RFLP do gene *atpD* e amplificação com *primers* espécie-específicos). Nesses casos as linhagens foram separadas em grupos ou categorias de perfis genéticos, sendo que para cada grupo ou perfil foram selecionadas linhagens representantes para o sequenciamento dos diferentes genes para posterior análise das sequências de forma individual e por multilocus (Tabela 12). Foram construídas diferentes árvores filogenéticas utilizando as sequências dos genes separadamente ou de forma concatenada, em diferentes combinações. Em todas as análises foram incluídas as linhagens Tipo de espécies de *Streptomyces* associadas à sarna.

Na análise filogenética dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB*, por exemplo, a linhagem IBSBF 2351, representando o Grupo 1, agrupou filogeneticamente com a linhagem Tipo de *S. europaeiscabiei* em 100% das repetições de *bootstrap*. A linhagem 2404, representando o Grupo 4, agrupou com *S. scabiei* em 100% das repetições. Outras linhagens como as dos Grupos 2, 3, 5, 7 e 10 não agruparam com nenhuma das linhagens Tipo de *Streptomyces*, mas ficaram filogeneticamente próximas de algumas espécies. Já as linhagens IBSBF 2435, SC 18 e SC 23C, que também mostraram-se patogênicas em minitubérculos, ficaram filogeneticamente distantes das linhagens Tipo das diferentes espécies causadoras da sarna da batata (Figura 18). Essas linhagens podem representar novas espécies de *Streptomyces* e deverão ser investigadas em estudos futuros.

Diferentes análises filogenéticas foram realizadas com diferentes combinações dos genes e, então, as linhagens foram separadas em dez grupos ou em perfis genéticos (Tabela 12). A maior parte das linhagens dos diferentes grupos e perfis genéticos mostraram-se filogeneticamente próximas à espécies de *Streptomyces* associadas à sarna utilizadas nesse estudo. As oito linhagens do Grupo 1, por exemplo, foram identificadas como pertencentes

a espécie *S. europaeiscabiei*; e as três linhagens do Grupo 4, como variantes patogênicas de *S. scabiei* (Figura 17 e Tabela 12) No entanto, linhagens de outros grupos (2, 3 e 5 a 10) e perfis genéticos diferentes (IBSBF 2006, 2229, 2258, 2804 e SC10), mesmo ficando filogeneticamente próximas de espécies já conhecidas, apresentaram valores baixos de similaridade de sequências, além de divergências em caracteres morfológicos e patogênicos. Assim, essas linhagens também podem representar novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata.

Figura 18. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *rpoB*, *atpD*, *recA* e *trpB* das linhagens de *Streptomyces* spp., causadoras de sarna da batata, utilizando-se o método *Neighbor-joining*. A sequência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos grupamentos com base em análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 2% de diferença nas sequências.

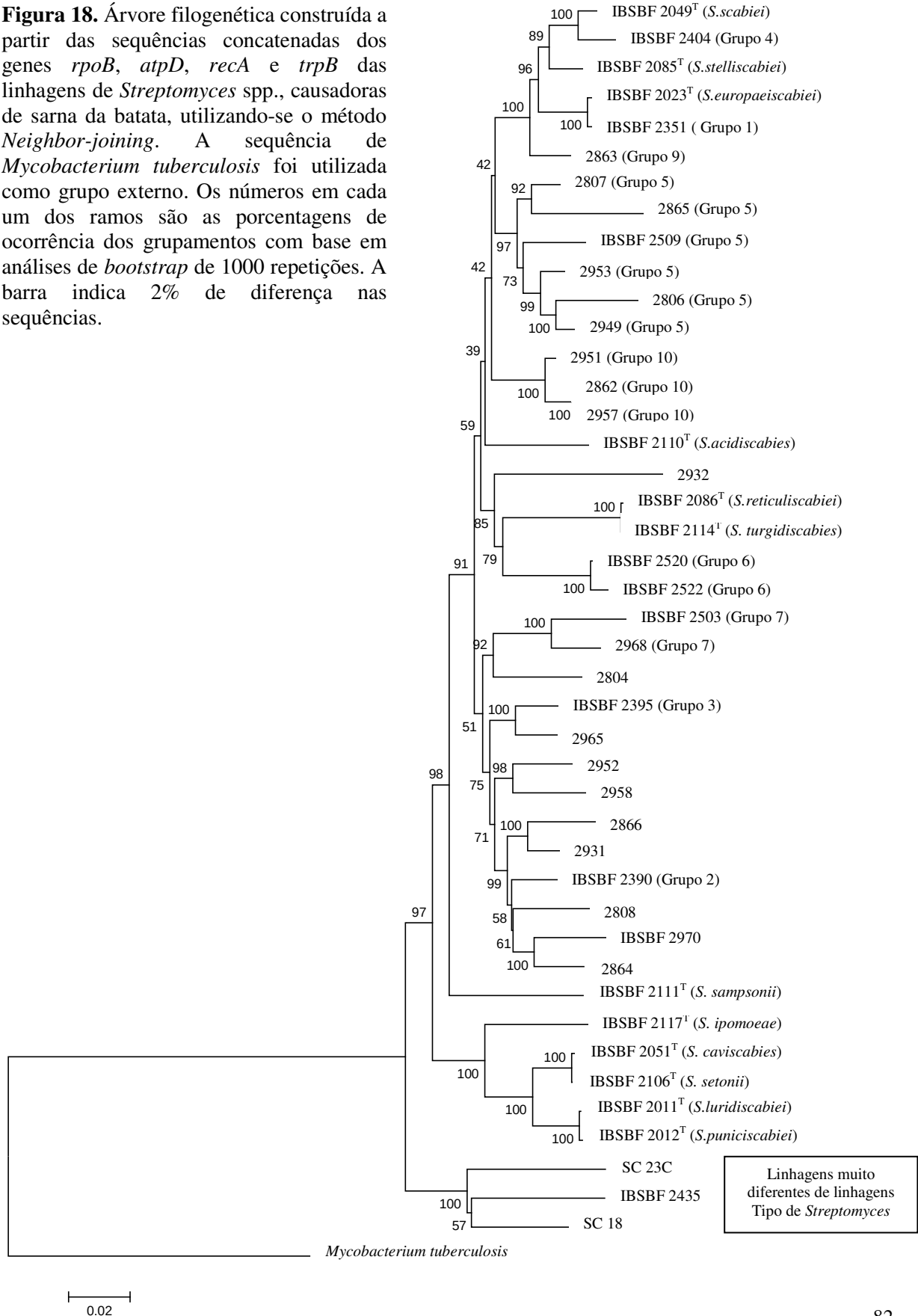


Tabela 12. Resultados das análises moleculares das linhagens de *Streptomyces* sp.

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
<i>S. scabiei</i>	1774	Desconhecida	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	<i>S. scabiei</i>
	1884	Capão Bonito (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	1886	Ibicoara (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	1936	Itapeva (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2005	Cristalina (GO)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2124	Bueno Brandão (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2147	Ibicoara (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2203	Tambaú (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2204	Tambaú (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2228	Ibicoara (BA)	+	-	<i>S. scabiei</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. scabiei</i> (99,1%/51%)	
	2239	Ibicoara (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2242	Ipuiuna (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2243	Ipuiuna (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2248	Itapetininga (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2250	Ibicoara (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2251	Ibicoara (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2257	Nova Rezende (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2282	Quitandinha (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2283	Quitandinha (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2292	São Mateus (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2293	São Mateus (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2294	São Mateus (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2298	São Gotardo (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2306	Mucugê (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2308	Mucugê (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
<i>S. scabiei</i>	2315	Pinhão (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	<i>S. scabiei</i>
	2316	Perdizes (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2317	Mucugê (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2318	Mucugê (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2359	Cristalina (GO)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. scabiei</i> (99,2%/42%)	
	2388	Itapetininga (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2396	Itapetininga (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. scabiei</i> (92,6%/72%)	
	2406	Poços de Caldas (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2407	Poços de Caldas (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2408	Poços de Caldas (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2409	Cristalina (GO)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2410	Cristalina (GO)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2411	Cristalina (GO)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2429	Castro (PR)	+	-	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2475	Ibicoara (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2476	Mucugê (BA)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2482	Guarapuava (PR)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2500	Casa Branca (SP)	+	-	<i>S. scabiei</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. scabiei</i> (98,7%/72%)	
	2501	Piedade (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2502	Bueno Brandão (MG)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2523	Ibiraíaras (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2527	Indaíatuba (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2809	São Francisco de Paula (RS)	+	-	<i>S. scabiei</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. scabiei</i> (92,5%/72%)	
	2811	São Francisco de Paula (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2814	Irineópolis (SC)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabiei</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
<i>S. scabiei</i>	2860	Irineópolis (SC)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	<i>S. scabiei</i>
	2950	Canoinhas (SC)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	2954	Canoinhas (SC)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	RS 1	São Francisco de Paula (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	RS 2	São Francisco de Paula (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	RS 4	São Francisco de Paula (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
	RS 5	São Francisco de Paula (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	n/a	n/a	n/a	
<i>S. europaeiscabiei</i>	1945	Holanda	+	n/a	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (98,3%/94%)	<i>S. europaeiscabiei</i>
	2474	Holanda	+	-	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>S. europaeiscabiei</i>	n/a	n/a	
	2498	Holanda	+	-	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (99,4%/94%)	
	2510	Holanda	+	-	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>S. europaeiscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (99,4%/94%)	
<i>S. ipomoeae</i>	1773	Desconhecida	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	<i>S. ipomoeae</i>
	2397	Santa Juliana (MG)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	Diferente	n/a	n/a	
	2401	Santa Juliana (MG)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. ipomoeae</i> (97%/99%)	
	2402	Santa Juliana (MG)	-	n/a	<i>S. ipomoeae</i>	Diferente	<i>rpoB</i>	<i>S. ipomoeae</i> (97%/99%)	
	2426	Itapetininga (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	Diferente	n/a	n/a	
	2427	Itapetininga (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	Diferente	n/a	n/a	
	2428	Itapetininga (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	Diferente	n/a	n/a	
	2430	Castro (PR)	-	n/a	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2431	Tapira (PR)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	Diferente	n/a	n/a	
	2432	Tapira (PR)	-	n/a	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2437	Tapira (PR)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. ipomoeae</i> (88,1%/100%)	
	2438	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2439	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
<i>S. ipomoeae</i>	2449	Vargem Grande do Sul (SP)	-	n/a	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	<i>S. ipomoeae</i>
	2450	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2455	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2466	Vargem Grande do Sul (SP)	-	n/a	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2468	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2483	Guarapuava (PR)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2484	Guarapuava (PR)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. ipomoeae</i> (95,5%/99%)	
	2485	Guarapuava (PR)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2486	Guarapuava (PR)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2528	Indaiatuba (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2529	Indaiatuba (SP)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2960	Irineópolis (SC)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2964	Papanduva (SC)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	n/a	n/a	
	2967	São Francisco de Paula (RS)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB/atpD/recA</i>	<i>S. ipomoeae</i> (96,3%/99%)	
	2969	São Francisco de Paula (RS)	-	-	<i>S. ipomoeae</i>	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. ipomoeae</i> (96,6%/100%)	
Linhagem agrupada com <i>S. ipomoeae</i>	2019	Cristalina (GO)	+	n/a	Diferente	<i>S. caviscabies</i>	<i>rpoB/atpD/gyrB/trpB</i>	<i>S. ipomoeae</i> (79,4%/82%)	Nova espécie
<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	2021	Campinas (SP)	-	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (93,4%/100%)	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>
	2235	UFV (MG)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (96,5%/100%)	
	2236	UFV (MG)	+	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (96,3%/100%)	
	2260	Mucugê (BA)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (97,6%/100%)	
	2368	Itapetininga (SP)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (97,7%/100%)	
	2389	Itapetininga (SP)	-	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	n/a	n/a	
	2391	Cristalina (GO)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (97,7%/100%)	

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	2392	Cristalina (GO)	-	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	n/a	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>
	2393	Cristalina (GO)	-	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	n/a	n/a	
	2398	Cristalina (GO)	-	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	n/a	n/a	
	2399	Cristalina (GO)	-	n/a	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	n/a	n/a	
	2400	Itapetininga (SP)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (97,6%/100%)	
	2861	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. caviscabies/S. setonii</i> (98,9%/100%)	
<i>S. sampsonii</i>	2020	Campinas (SP)	-	n/a	<i>S. sampsonii</i>	<i>S. sampsonii</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. sampsonii</i> (93,9%/100%)	<i>S. sampsonii</i>
	2360	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	<i>S. sampsonii</i>	<i>S. sampsonii</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>S. sampsonii</i> (99,5%/100%)	
Grupo 1 (G1)	1943	Holanda	+	n/a	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (97,3%/94%)	<i>S. europaeiscabiei</i>
	1944	Holanda	+	n/a	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (92,5%/94%)	
	2162	Holanda	+	n/a	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (98,4%/94%)	
	2351	Itapetininga (SP)	+	-	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (99,1%/100%)	
	2472	Holanda	+	n/a	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (99,5%/94%)	
	2473	Holanda	+	n/a	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (98,8%/94%)	
	2499	Holanda	+	n/a	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB/atpD/recA</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (99,6%/100%)	
	2508	Holanda	+	-	Diferente	<i>S. luridiscabiei</i> <i>S. puniscabiei</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. europaeiscabiei</i> (99,5%/94%)	
Grupo 2 (G2)	2247	Itapetininga (SP)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Nova espécie
	2352	Vargem Grande do Sul (SP)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2390	Casa Branca (SP)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
Linhagens agrupadas com as do Grupo 2	2864	Irineópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Nova espécie
	2970	Ibiraíaras (RS)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Nova espécie
Grupo 3 (G3)	2395	Itapetininga (SP)	+	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Nova espécie

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
Linhagens agrupadas com as do Grupo 3	2808	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Novas espécies
	2866	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. caviscabies/S. setonii</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2931	Irineópolis (SC)	-	n/a	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2952	Itaiópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>S. luridiscabies</i> <i>S. puniscabies</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2958	Canoinhas (SC)	-	-	<i>S. europaeiscabies</i>	<i>S. luridiscabies</i> <i>S. puniscabies</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2965	Canoinhas (SC)	-	-	<i>S. europaeiscabies</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	RS 19	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	Diferente	<i>atpD</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	RS23	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	Diferente	<i>atpD</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
Grupo 4 (G4)	2403	Uberaba (MG)	+	n/a	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB</i>	<i>Ssc, Sst</i> (98,1-98,8%/58%)	Variantes patogênicas de <i>S. scabiei</i>
	2404	Uberaba (MG)	+	n/a	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	<i>Ssc</i> (97,9%/100%)	
	2405	Uberaba (MG)	+	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst</i> (93-93,3%/100%)	
Grupo 5 (G5)	2509	França	-	n/a	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Novas espécies
	2805	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2806	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2807	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2812	Irineópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	n/a	
	2815	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2865	Itaiópolis (SC)	-	n/a	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2949	Itaiópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2953	Canoinhas (SC)	-	n/a	<i>S. acidiscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2955	Itaiópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	n/a	
Grupo 6 (G6)	2520	Paranapanema (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/</i>	<i>Ssc, Sst, Seu, Sac, Stu e Sre</i>	Nova espécie
	2521	Paranapanema (SP)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu, Sac, Stu e Sre</i>	

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	<i>S. scabiei</i>	<i>S. turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
Grupo 6 (G6)	2522	Ibiraíaras (RS)	+	-	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu, Sac, Stu e Sre</i>	Nova espécie
	2524	Ibiraíaras (RS)	+	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu, Sac, Stu e Sre</i>	
Linhagens agrupadas com as do G6	2932	Água Doce (SC)	-	n/a	<i>S. acidiscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu, Sac, Stu e Sre</i>	Nova espécie
	SC 3B	Água Doce (SC)	-	n/a	<i>S. acidiscabies</i>	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a		
Grupo 7 (G7)	2394	Cristalina (GO)	-	n/a	n/a	n/a	<i>rpoB/atpD</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Novas espécies
	2503	Ibicoara (BA)	-	-	Diferente	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	2507	Ibicoara (BA)	-	-	Diferente	<i>S. ipomoeae</i>	<i>rpoB</i>	<i>S. ipomoeae</i> (93%/96%)	
	2968	São Francisco de Paula (RS)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	RS 8	São Francisco de Paula (RS)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	n/a	
Grupo 8 (G8)	RS 17	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	Nova espécie
	RS 18	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabiei</i>	Diferente	<i>atpD</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
	RS 21	Ibiraíaras (RS)	-	-	<i>S. turgidiscabies</i> <i>S. reticuliscabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD</i>	Baixa similaridade com <i>Ssc, Sst, Seu e Sac</i>	
Grupo 9 (G9)	2823	Irineópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	Nova espécie filogeneticamente próxima das genomoespécies de <i>S. scabiei</i>
	2863	Irineópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
	2867	Canoinhas (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
	2942	Canoinhas (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
	2959	Canoinhas (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
Grupo 10 (G10)	2862	Itaiópolis (SC)	-	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	Nova espécie filogeneticamente próxima das genomoespécies de <i>S. scabiei</i>
	2951	Itaiópolis (SC)	-	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
	2956	Itaiópolis (SC)	-	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	n/a	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
	2957	Itaiópolis (SC)	-	n/a	<i>S. scabiei</i>	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	
Linhagens agrupadas com as do G10	2941	Itaiópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>S. cavigabiei</i> / <i>S. setonii</i>	<i>rpoB/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu</i>	

Tabela 12. Continuação

Espécie/ Grupo Genético	IBSBF/ Código	Procedência	S. <i>scabiei</i>	S. <i>turgidiscabies</i>	<i>atpD</i> - <i>Hae</i> III	<i>atpD</i> - <i>Cfo</i> I	Genes sequenciados	Grupo (similaridade/bootstrap)	Identificação
Linhagens perfis genéticos diferentes	2006	Chile	-	n/a	Diferente	<i>S. cavigscabies</i> / <i>S. setonii</i>	n/a	n/a	Relacionada com <i>Sca/Sse</i>
	2229	Araxá (MG)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD</i>	Genomoespécies <i>S. scabiei</i> (96-96,6%/74%)	Nova espécie
	2258	Itapetininga (SP)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	<i>rpoB/atpD/recA</i>	Genomoespécies <i>S. scabiei</i> (94,2-95,3%/45%)	Nova espécie
	2804	Ibiraíaras (RS)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	<i>Ssc, Sst, Seu, Sac, Stu, Sre</i>	Nova espécie
	SC 10	Água Doce (SC)	-	n/a	Diferente	Diferente	<i>rpoB</i>	93,9% similaridade com <i>Sac</i> , sem agrupamento	Nova espécie
Linhagens muito diferentes na análise filogenética	2343	São Miguel Arcanjo (SP)	-	-	n/a	n/a	<i>rpoB/recA/trpB</i>	Baixa similaridade com linhagens Tipo	Nova espécie
	2344	São Miguel Arcanjo (SP)	-	-	n/a	n/a	<i>rpoB/recA/trpB</i>	Baixa similaridade com linhagens Tipo	Nova espécie
	2435	Poços de Caldas (MG)	-	n/a	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	Baixa similaridade com linhagens Tipo das espécies	Nova espécie
	SC 18	Papanduva (SC)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	Baixa similaridade com linhagens Tipo	Nova espécie
	SC 23C	Canoinhas (SC)	-	-	Diferente	Diferente	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	Baixa similaridade com linhagens Tipo	Nova espécie
Linhagens perfis genéticos diferentes não patogênicos em minitubérculos	2467	Vargem Grande do Sul (SP)	-	n/a	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	n/a	
	SC 2B	Irineópolis (SC)	-	-	Diferente	Diferente	n/a	n/a	
	SC 12	Itaiópolis (SC)	-	-	Diferente	<i>Ssc, Sst, Sac, Stu e Sre</i>	n/a	n/a	
	SC 15	Papanduva (SC)	-	-	Diferente	Diferente	n/a	n/a	

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil; n/a: não avaliada; (+) ocorrência de amplificação; (-) ausência de amplificação; *Sac*: *S. acidiscabies*; *Sca*: *S. cavigscabies*; *Seu*: *S. europaeiscabiei*; *Sre*: *S. reticuliscabiei*; *Ssc*: *S. scabiei*; *Sse*: *S. setonii*; *Sst*: *S. stelliscabiei*; *Stu*: *S. turgidiscabies*.

5. Identificação das linhagens de *Streptomyces* sp.

A partir dos dados de caracterização morfológica, patogênica e molecular as linhagens desse estudo foram identificadas como:

5.1 *Streptomyces scabiei* (Ssc)

A linhagem Tipo de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T) apresentou as seguintes características:

- Morfologia: hifa espiral e esporo cinza a branco;
- Patogenicidade: moderadamente virulenta nos testes de patogenicidade em minitubérculos. Apresentou amplificação positiva, com bandas intensas, para os genes de patogenicidade *necI*, *tomA* e operon *txtAB*;
- Molecular: amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e PCR-RFLP do gene *atpD* com perfil único de restrição, diferenciado de outras linhagens Tipo de *Streptomyces* causadoras da sarna (Figuras 15 e 16, canaleta 1).

Um total de 57 linhagens de *Streptomyces* sp. apresentou perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* idêntico à linhagem Tipo de *S. scabiei* (IBSBF 2049^T). Cinco dessas linhagens foram sequenciadas (genes *rpoB* e/ou *atpD*) para a confirmação da identidade e agruparam filogeneticamente com a linhagem Tipo dessa espécie (Tabela 12, Anexos 3 e 4). Além disso, as características morfológicas, patogênicas e a amplificação com o par de *primers* específicos para *S. scabiei* confirmaram essa identificação.

As linhagens identificadas como *S. scabiei* apresentaram hifas espirais e esporo de coloração branca a cinza, exceto duas linhagens que apresentaram morfologia de hifa espiral aberto (Tabela 7). Apresentaram amplificação intensa de todos os genes de patogenicidade avaliados, com resultado idêntico à linhagem Tipo da espécie (IBSBF 2049^T). O teste de patogenicidade em minitubérculos foi realizado para 11 linhagens e todas foram muito virulentas até mesmo mais agressivas que a linhagem Tipo da espécie (Tabela 10).

5.2 *Streptomyces europaeiscabiei* (Seu)

A linhagem Tipo de *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T) apresentou as seguintes características:

- Morfologia: hifa espiral e esporo cinza a branco;

- Patogenicidade: moderadamente virulenta em testes de patogenicidade em minitubérculos. Apresentou amplificação positiva, com bandas intensas, para os genes de patogenicidade *necI*, *tomA* e operon *txtAB*;
- Molecular: amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e PCR-RFLP do gene *atpD* com perfil único de restrição, podendo ser diferenciado de outras linhagens Tipo de *Streptomyces* causadoras da sarna (Figuras 15 e 16, canaleta 2).

Quatro linhagens desse grupo apresentaram perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* idêntico à linhagem Tipo de *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T) (Tabela 12). Além disso, as características morfológicas, patogênicas, a amplificação com o par de *primers* específicos para *S. scabiei* e o sequenciamento do gene *rpoB* confirmaram essa identificação. No sequenciamento do gene *rpoB* essas linhagens agruparam em 94% das repetições de *bootstrap* com a linhagem Tipo IBSBF 2023^T, apresentando valores de similaridades superiores a 98,3% (Tabela 12 e Anexos 3 e 7).

5.3 *Streptomyces caviscabies*/*Streptomyces setonii* (*Sca*/*Sse*)

As linhagens Tipo das espécies *S. caviscabies* (IBSBF 2051^T) e *S. setonii* (IBSBF 2106^T) apresentaram as seguintes características:

- Morfologia: hifa flexuosa e esporo creme ou branco;
- Patogenicidade: *S. caviscabies* causou pouca necrose nos minitubérculos, enquanto que *S. setonii* foi muito virulenta em minitubérculos. Não ocorreu amplificação de nenhum dos genes de patogenicidade avaliados;
- Molecular: não houve sinal de amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e apresentaram perfis de PCR-RFLP do gene *atpD* que permitiram a diferenciação de outras linhagens Tipo de *Streptomyces* causadoras da sarna (Figuras 15 e 16, canaletas 7 e 8).

Treze linhagens desse grupo apresentaram perfis de PCR-RFLP do gene *atpD* idênticos às linhagens Tipo de *Sca*/*Sse*; não apresentaram sinal de amplificação com o par de *primers* específicos para *S. scabiei*, exceto IBSBF 2236, e apresentaram características morfológicas que confirmaram essa identificação (hifas flexuosas e a cor do esporo variou de branca a amarela, sendo, na maioria das vezes, creme) (Tabelas 7 e 12). Além disso,

ficaram agrupadas com as linhagens Tipo de *Sca/Sse* nas análises filogenéticas dos genes *rpoB* e *rpoB/atpD* (100% das repetições de *bootstrap*) (Tabela 12, Anexos 3 e 4).

Na caracterização patogênica dessas linhagens, os resultados variaram de não patogênicas a patogênicas com diferentes graus de virulência em minitubérculos. Das 13 linhagens avaliadas, três mostraram-se não patogênicas em minitubérculos, porém com amplificação de alguns genes de patogenicidade para duas delas. As outras dez linhagens variaram de pouco a muito virulentas no teste em minitubérculos de batata.

Diferentes perfis patogênicos foram observados entre as linhagens dessa espécie com relação à amplificação dos genes de patogenicidade. Algumas linhagens apresentaram amplificação para os três genes, outras para um ou mais genes e uma delas não apresentou amplificação alguma (Tabela 10).

5.4 *Streptomyces sampsonii* (Ssa)

A linhagem Tipo de *S. sampsonii* (IBSBF 2111^T) apresentou as seguintes características:

- Morfologia: hifa flexuosa e esporo de branco a creme;
- Patogenicidade: considerada moderadamente patogênica nos testes de patogenicidade em minitubérculos. Apresentou amplificação somente do gene *tomA*;
- Molecular: não houve sinal de amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e PCR-RFLP do gene *atpD* com perfil único de restrição, diferenciado de outras linhagens Tipo de *Streptomyces* causadoras da sarna (Figura 15 e 16 canaleta 11).

Duas linhagens, IBSBF 2020 e 2360, apresentaram perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* idêntico à linhagem Tipo de *Ssa* e agruparam com essa espécie no sequenciamento dos genes *rpoB* e *atpD*, com alta similaridade de sequência e grupos confiáveis (100% das repetições de *bootstrap*) (Tabela 12 e Anexos 3 e 4). Assim como para a linhagem Tipo de *S. sampsonii*, não houve sinal de amplificação com o par de *primers* específicos para *S. scabiei*. Quanto às características morfológicas, apresentaram hifas flexuosas e a cor do esporo variou de branca a creme, como na linhagem Tipo da espécie (Tabela 7). Essas linhagens apresentaram pouca virulência em minitubérculos e quando ocorreu a amplificação dos genes de patogenicidade, esta foi pouca intensa (Tabela 10).

5.5 *Streptomyces ipomoeae* (Sip)

A linhagem Tipo de *S. ipomoeae* (IBSBF 2117^T) apresentou as seguintes características:

- Morfologia: hifa espiral aberta e esporo cinza;
- Patogenicidade: considerada muito virulenta em testes de patogenicidade em minitubérculos. Não apresentou amplificação positiva dos genes de patogenicidade, embora seja relatada a produção de taxtomina nessa espécie (Healy et al., 2000);
- Molecular: não houve sinal de amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e no PCR-RFLP do gene *atpD* apresentou perfil único de restrição, diferenciado de outras linhagens Tipo de *Streptomyces* causadoras da sarna (Figuras 15 e 16, canaleta 12).

Vinte e oito linhagens foram identificadas como *S. ipomoeae* com base no perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* e dessas algumas foram sequenciadas (genes *rpoB*, *atpD* e *recA*) a fim de confirmar a identificação proposta. Todas as linhagens sequenciadas ficaram próximas da espécie Tipo de *S. ipomoeae* em agrupamentos confiáveis e com altas similaridades (Tabela 12 e Anexos 3 e 7).

Essas linhagens apresentaram variações na morfologia de hifa de espiral aberta a flexuosa com esporos cinza (Tabela 7). Apresentaram também resultados variados com relação aos diferentes genes de patogenicidade avaliados e à patogenicidade em minitubérculos. Das 28 linhagens desse grupo, seis não exibiram patogenicidade em minitubérculos de batata, mas quatro dessas apresentaram amplificação de algum gene de patogenicidade. As outras linhagens apresentaram-se pouco virulentas, com exceção de uma linhagem IBSBF 2401 que mostrou-se muito virulenta. Com relação aos genes de patogenicidade, algumas linhagens apresentaram amplificação para os três genes, outras para alguns deles, com diferentes combinações de amplificação, e em outras não foi observado qualquer sinal de amplificação dos genes avaliados (Tabela 10).

Em estudo realizado por Healy e colaboradores (2000), linhagens de *S. ipomoeae* não apresentaram amplificação para o gene *nec1*. Contrariamente, no presente estudo, sete linhagens identificadas como *S. ipomoeae* apresentaram a amplificação desse gene. Diferentemente da linhagem Tipo ocorreu amplificação do gene da taxtomina em algumas linhagens desse grupo, embora o sinal de amplificação tenha sido pouco intenso.

Essa espécie está associada à sarna da batata-doce e não havia sido relatada como patogênica à batata, no entanto a linhagem Tipo da espécie bem como as linhagens isoladas no Brasil causaram necrose nos minitubérculos de batata. Apesar do baixo grau de virulência observado nos tubérculos, a presença de genes que codificam fatores de patogenicidade e virulência foram indicativos do potencial patogênico dessa espécie à batata.

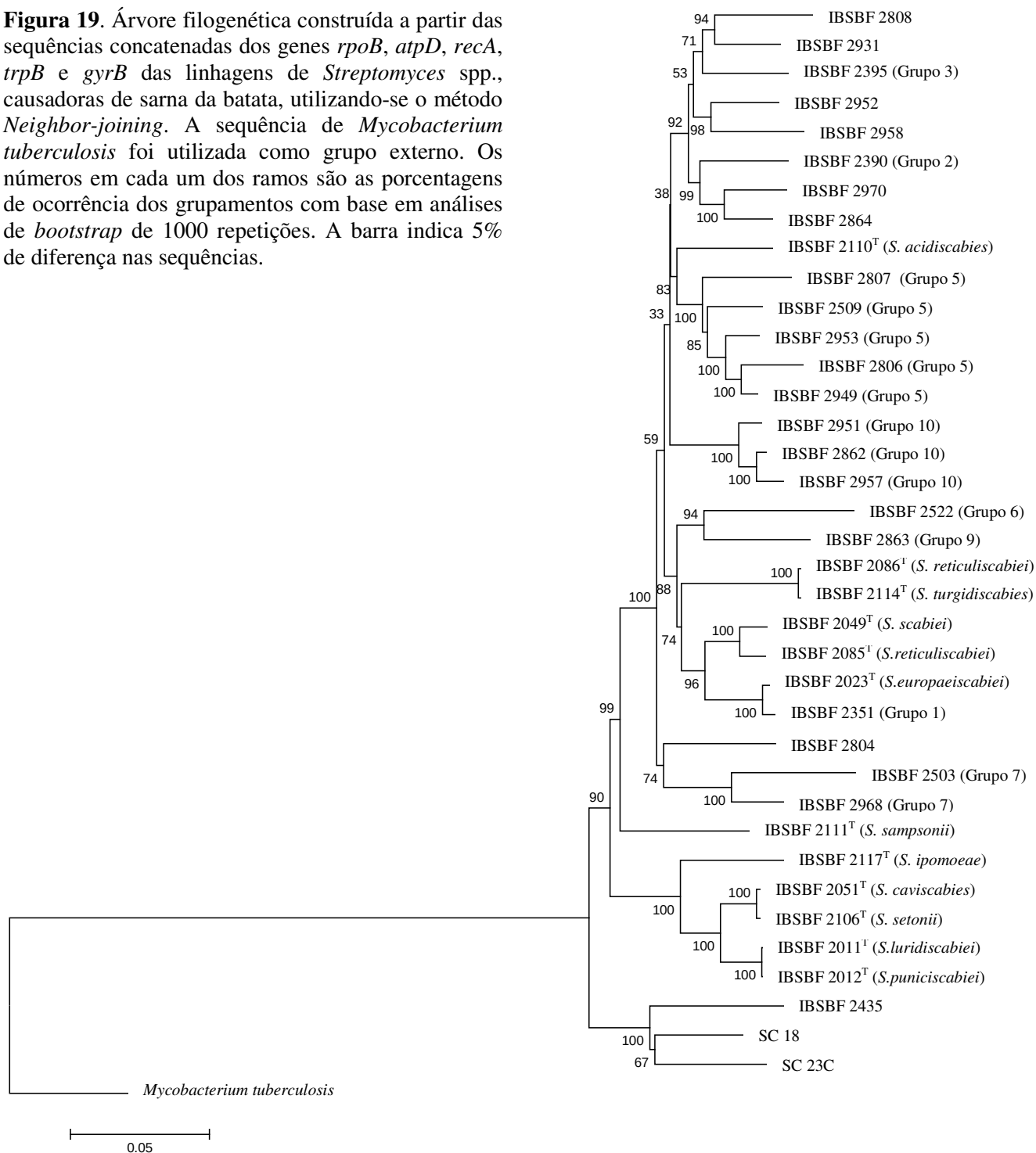
Cabe ressaltar que as linhagens identificadas como *S. caviscabies*, *S. sampsonii* e *S. ipomoeae* apresentaram, em alguns casos, resultados de patogenicidade diferentes do esperado com relação às linhagens Tipo dessas espécies. Esses resultados indicaram que pode haver uma variação da patogenicidade dentro dessas espécies, podendo estar associada a diferentes eventos e formas de aquisição ou perda dos genes de patogenicidade.

Assim, das 178 linhagens analisadas, 104 foram identificadas como *S. scabiei* (57 linhagens), *S. ipomoeae* (28), *S. caviscabies*/*S. setonii* (13), *S. europaeiscabiei* (4) e *S. sampsonii* (2).

5.6 Grupos (G) e linhagens com Perfis Genéticos Diferentes (PD)

As 74 linhagens restantes que não puderam ser identificadas foram separadas em grupos (1 a 10), os quais compartilharam características morfológicas, patogênicas e/ou moleculares, estando filogeneticamente relacionadas entre si; e também em perfis genéticos diferentes baseados nos experimentos de PCR-RFLP do gene *atpD*. As linhagens representantes de cada grupo e perfis genéticos distintos foram sequenciadas e as sequências dos genes foram utilizadas nas diferentes análises filogenéticas. Foram construídas árvores filogenéticas com diferentes combinações de genes, inclusive com os cinco genes analisados para diferentes linhagens de *Streptomyces* (Figura 19).

Figura 19. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *rpoB*, *atpD*, *recA*, *trpB* e *gyrB* das linhagens de *Streptomyces* spp., causadoras de sarna da batata, utilizando-se o método *Neighbor-joining*. A sequência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos grupamentos com base em análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 5% de diferença nas sequências.



5.6.1 Linhagens identificadas como espécies já descritas

5.6.1.1 Grupo 1 (*S. europaeiscabiei*)

Oito linhagens foram classificadas como Grupo 1 (G1) de acordo com a variação apresentada no perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* e apresentaram:

- Morfologia: hifa espiral e esporo cinza a branco (Tabela 7);
- Patogenicidade: apresentaram amplificação, com bandas intensas, dos três genes de patogenicidade avaliados (genes *necI*, *tomA* e operon *txtAB*). O teste de patogenicidade em minitubérculos não foi realizado para essas linhagens, visto que, foi confirmada a presença dos genes de patogenicidade (Tabela 10);
- Molecular: amplificação com o par de *primers* ScabI/ScabII; perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* diferente de todas as linhagens Tipo de *Streptomyces* com a enzima *Hae* III e idêntico a *S. luridiscabiei* e *S. puniscabiei* com a enzima *Cfo* I (Tabela 12).

As linhagens desse grupo compartilharam diversas características com as espécies *S. scabiei*, *S. stelliscabiei* e *S. europaeiscabiei*, apesar do perfil diferente de PCR-RFLP do gene *atpD*. Dentre as oito linhagens desse grupo, a linhagem IBSBF 2351 oriunda de Itapetininga (SP) foi escolhida para a análise multilocus com cinco genes a fim de se confirmar a identificação dessas linhagens. Além disso, o gene *rpoB* foi sequenciado para todas as linhagens.

Em todas as análises filogenéticas a linhagem IBSBF 2351 agrupou com a espécie Tipo de *S. europaeiscabiei* (IBSBF 2023^T) e na análise com cinco genes agrupou com valores de *bootstrap* máximos (100%) e com similaridade muito alta (99,1%) (Figura 19 e Anexo 8). No sequenciamento do gene *rpoB* das outras linhagens também foi confirmada a identificação como *S. europaeiscabiei*, devido aos altos valores de *bootstrap* no agrupamento e à alta similaridade das sequências com a linhagem Tipo (Tabela 12 e Anexo 7).

Assim, apesar da variação apresentada no PCR-RFLP do gene *atpD*, os dados de sequenciamento e as características morfológicas, patogênicas e a obtenção de produto de amplificação com os *primers* ScabI/ScabII indicaram que essas linhagens pertencem à espécie *S. europaeiscabiei*.

5.6.1.2 Grupo 4 (*S. scabiei*)

As linhagens IBSBF 2403, 2404 e 2405 foram classificadas como Grupo 4 (G4) e apresentaram as seguintes características:

- Morfologia: hifa espiral e esporo cinza (Tabela 7);
- Patogenicidade: muito virulentas em minitubérculos. Não apresentaram sinal de amplificação para o gene de patogenicidade *nec1* e a amplificação foi pouco intensa para os genes da *tomA* e *txtAB*, diferentemente de *S. scabiei* e *S. stelliscabiei* (Tabela 10);
- Molecular: amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e perfil diferente nos experimentos de PCR-RFLP do gene *atpD* com a enzima *Hae* III, mas idêntico à *Ssc*, *Sst*, *Sac*, *Stu* e *Sre* com a enzima *Cfo* I (Tabela 12).

Na análise do gene *rpoB*, as três linhagens desse grupo agruparam com as espécies *S. scabiei* e *S. stelliscabiei* (Anexo 3). Posteriormente foram analisadas sequências de outros genes das linhagens 2404 e 2405. A linhagem 2405, na análise dos genes *rpoB/atpD/gyrB*, também agrupou com *S. scabiei* e *S. stelliscabiei* em 100% das repetições. A linhagem 2404 agrupou com a linhagem Tipo de *S. scabiei* na análise com 4 genes (*rpoB/atpD/recA/trpB*) apresentando alta similaridade (97,9%) e valores de agrupamento confiáveis (100% das repetições de *bootstrap*) (Figura 18 e Anexo 9).

Devido a similaridade morfológica, às características moleculares e ao agrupamento filogenético, as linhagens do G4, foram identificadas como variantes patogênicas da espécie *S. scabiei*.

5.6.2 Linhagens filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei* e *S. europaeiscabiei* (genomoespécies de *S. scabiei*)

5.6.2.1 Linhagem IBSBF 2229

Nas análises de sequenciamento dos genes *rpoB/atpD* a linhagem IBSBF 2229 agrupou com as genomoespécies de *S. scabiei* em 74% das repetições de *bootstrap*, com similaridade de 96 a 96,6% (Tabela 13 e Anexo 4). Comparando-se essa linhagem com as outras de *Streptomyces* sp. utilizadas na construção da árvore filogenética a maior similaridade, de 96,8%, encontrada foi com uma linhagem do PD4 (IBSBF 2405), que também apresentou alta similaridade com as genomoespécies de *S. scabiei* particularmente

com *S. scabiei* e *S. stelliscabiei* (Anexo 10). A linhagem IBSBF 2229, no entanto, apresentou morfologia de hifa flexuosa, não apresentou amplificação com *primers* específicos para *S. scabiei* e o perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* foi diferente dessas genomoespécies (Tabelas 7 e 12). Nos testes de patogenicidade apresentou pouca virulência em minitubérculos, amplificação intensa do gene *necI* e pouco intensa do gene *tomA* e operon *txtAB* (Tabela 10). Com base nos resultados apresentados concluiu-se que a linhagem IBSBF 2229 pode representar uma variante patogênica e morfológica das genomoespécies de *S. scabiei*.

5.6.2.2 Linhagem IBSBF 2258

Na análise filogenética dos genes *rpoB/atpD/recA* a linhagem IBSBF 2258 agrupou com as genomoespécies de *S. scabiei* em 45% das repetições de *bootstrap* com similaridades de 94,2 a 95,3% e com as linhagens do Grupo 10 em 70% das repetições de *bootstrap* (Tabela 13 e Anexo 5). Essa linhagem apresentou a mesma morfologia de hifa espiral e esporo branco, porém, apesar de agrupar com as genomoespécies de *S. scabiei*, os valores de similaridade foram baixos, menor que 95,3% (Tabelas 7 e 13). Além disso, não ocorreu amplificação com os *primers* específicos para *S. scabiei* (Tabela 12). Quanto à patogenicidade, não apresentou o gene *necI* e mostrou-se pouco virulenta nos testes em minitubérculos (Tabela 10).

Os resultados de caracterização morfológica, patogênica e molecular indicaram que a linhagem IBSBF 2258 pode representar uma nova espécie de *Streptomyces* associada à sarna.

5.6.2.3 Grupo 9 (G9)

As cinco linhagens desse grupo (IBSBF 2823, 2863, 2867, 2942 e 2959) apresentaram as seguintes características em comum:

- Morfologia: hifa espiral e esporo creme e cinza (Tabela 7);
- Patogenicidade: muito virulentas em minitubérculos de batata. Apresentaram sinal de amplificação intenso para os genes de patogenicidade *necI*, *tomA* e operon *txtAB*. O DNA da linhagem IBSBF 2863 apresentou amplificação intensa apenas para os genes relacionados à síntese da taxtomina e tomatinase, sem amplificação do gene *necI* (Tabela 10);

- Molecular: não apresentaram sinal de amplificação com o par de *primers* específico para *S. scabiei* e o perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* foi semelhante aos das linhagens do Grupo 4, identificadas como variantes patogênicas de *S. scabiei* (Tabela 12).

Na análise filogenética do gene *rpoB* as linhagens IBSBF 2823 e IBSBF 2863 formaram um grupo em 100% das repetições de *bootstrap*, com similaridade de 99,7%. Não agruparam com as linhagens Tipo mas ficaram muito próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei* e *S. europaeiscabiei* (Anexos 3 e 7).

Na análise dos genes *recA/trpB/gyrB* as linhagens IBSBF 2863 e IBSBF 2942 apresentaram 94,6% de similaridade e agruparam entre si em 100% das repetições de *bootstrap*. Além disso, agruparam em 96% das repetições com *Ssc*, *Sst*, *Seu*, *Sre* e *Stu*. (Anexo 6). Na análise dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB* a linhagem IBSBF 2863 agrupou com as genomoespécies de *S. scabiei* em 100% das repetições (Figura 18), mas na análise dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB* essa linhagem agrupou com *Ssc*, *Sst*, *Seu*, *Sret* e *Sturg* em 88% das repetições (Figura 19). Entretanto, os maiores valores de similaridades foram observados com as genomoespécies de *S. scabiei* (Tabela 13, Anexo 8).

Devido às semelhanças morfológica e patogênica; e ao agrupamento filogenético essas linhagens foram consideradas uma nova espécie próxima das genomoespécies de *S. scabiei*.

5.6.2.4 Grupo 10 (G10)

O grupo 10 ficou composto pelas linhagens IBSBF 2862, 2951, 2956 e 2957 que apresentaram as seguintes características:

- Morfologia: hifa flexuosa e esporo creme, cinza e branco (Tabela 7);
- Patogenicidade: de pouco a moderadamente virulentas nos testes em minitubérculos. Apresentaram amplificação, com bandas intensas, para o gene de patogenicidade *necl* e pouco intensa para os genes *tomA* e *txtAB*. A linhagem IBSBF 2957 apresentou somente amplificação fraca do operon da *txtAB* (Tabela 10);
- Molecular: não ocorreu sinal de amplificação com o par de *primers* específicos para *S. scabiei* e o perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* mostrou-se idêntico à *S. scabiei* com

a enzima *Hae* III, porém diferente com a enzima *Cfo* I (perfil semelhante à *S. europaeiscabiei*) (Tabela 12).

Na análise filogenética dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB* as linhagens desse perfil genético agruparam 100% nas repetições de *bootstrap* e apresentaram similaridades de 97,1 a 97,9% entre si (Figura 19 e Anexo 8). Embora essas linhagens tenham apresentado alta similaridade com as espécies *S. scabiei* e *S. stelliscabiei* (Tabela 13) elas não agruparam com nenhuma linhagem Tipo.

A linhagem IBSBF 2941 agrupou com as linhagens do G10 em 100% das repetições na análise dos genes *rpoB/trpB/gyrB* com valores de similaridade de 91 a 93%. Além do agrupamento filogenético, essa linhagem também apresentou características patogênicas e morfológicas idênticas às linhagens desse grupo e mostrou-se muito virulenta nos testes em minitubérculos (Tabelas 7 e 10).

As linhagens desse grupo apresentam morfologia de hifa flexuosa e não apresentaram sinal de amplificação com *primers* específicos para *S. scabiei*, características divergentes em relação às genomoespécies de *S. scabiei*. Assim, apesar do agrupamento filogenético, essas linhagens podem também ser variantes dessas genomoespécies.

As linhagens perfis genéticos diferentes (IBSBF 2229 e 2258) e dos grupos 9, 10 que ficaram próximas filogeneticamente das genomoespécies de *S. scabiei* apresentaram diferenças na morfologia, patogenicidade e/ou em caracteres moleculares, apesar do agrupamento filogenético em diferentes análises. Além disso, não foi observado sinal de amplificação com os *primers* ScabI/ScabII e essas apresentaram baixo valor de similaridade de sequências com as linhagens Tipo das genomoespécies de *S. scabiei*, principalmente nas análises utilizando maior número de genes (Tabelas 12 e 13).

Esses dados indicaram que essas linhagens podem representar novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna. Essa hipótese ficou reforçada pelo fato de que as genomoespécies, mesmo constituindo espécies diferentes, apresentam similaridades entre si maiores do que as que foram observadas com as linhagens de *Streptomyces* utilizadas nesse estudo e filogeneticamente próximas. Na análise dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB*, por exemplo, a similaridade entre *Ssc*, *Sst* e *Seu* foi de 94,8 a 97,4% entre si (Anexo 8). As

linhagens de *Streptomyces* utilizadas nesse estudo apresentaram valores de similaridades ainda menores com essas genomoespécies, abaixo de 93,3%.

Tabela 13. Valores de similaridade de sequências de diferentes genes das linhagens de *Streptomyces* sp. filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei* e *S. europaeiscabiei*.

Grupo Genético	IBSBF	Genes sequenciados	Valores de similaridade de sequências com as espécies		
			<i>Ssc</i>	<i>Seu</i>	<i>Sst</i>
Linhagens perfis genéticos diferentes	2229	<i>rpoB/atpD</i>	96%	96%	96,6%
	2258	<i>rpoB/atpD</i>	95,3%	96,3%	96%
		<i>rpoB/atpD/recA</i>	94,2%	95,3%	94,9%
Grupo 9	2823	<i>rpoB</i>	97,5%	97,8%	97,2%
	2863	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	92,1%	92,7%	92,6%
		<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	96,1%	96,5%	96,6%
	2942	<i>recA/trpB/gyrB</i>	91,9%	92,9%	92,1%
Grupo 10	2862	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	93,1%	93,3%	92,5%
	2951	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	93%	93,3%	92,6%
	2957	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,6%	91,8%	91,2%
Linhagem agrupada com as do G10	2941	<i>rpoB/trpB/gyrB</i>	90,6%	90%	91%

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil; *Seu*: *S. europaeiscabiei*; *Ssc*: *S. scabiei*; *Sst*: *S. stelliscabiei*.

5.6.3 Linhagens filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. acidiscabies*

5.6.3.1 Grupo 2 (G2) e linhagens relacionadas

As linhagens IBSBF 2247, 2352 e 2390 foram classificadas como Grupo 2 (G2) com base no perfil de PCR-RFLP do gene *atpD*. Essas três linhagens apresentaram as seguintes características:

- Morfologia: hifa espiral e esporo cinza a branco (Tabela 7);
- Patogenicidade: de pouco a muito virulentas em minitubérculos; não apresentaram sinal de amplificação para o gene de patogenicidade *nec1* e a amplificação foi pouco intensa para os genes *tomA* e operon *txtAB* (Tabela 10);
- Molecular: não apresentaram sinal de amplificação com o par de *primers* ScabI/ScabII e o perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* foi diferente dos perfis das linhagens Tipo com as enzimas utilizadas.

Na análise dos genes *rpoB/atrD* essas linhagens agruparam em 100% das repetições de *bootstrap* e apresentaram alta similaridade entre si, de 98,1% entre 2390 e 2247; 99,5% entre 2390 e 2352; e 98,2% entre 2247 e 2352 (Anexos 4 e 10).

Nas análises das sequências dos diferentes genes, essas linhagens não agruparam com nenhuma linhagem Tipo de *Streptomyces* e apresentaram maiores valores de similaridade com *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac* em comparação com as demais linhagens analisadas. Apesar de mostrarem-se filogeneticamente relacionadas à essas espécies, os valores de similaridade das linhagens do G2 foram inferiores a 95% e, além disso, esse grupo apresentou variações nos resultados dos testes moleculares e de patogenicidade que não permitiram agrupá-lo com nenhuma das espécies já descritas (Tabela 14).

Em adição, duas outras linhagens, IBSBF 2864 e 2970, agruparam em 99% das repetições de *bootstrap* com IBSBF 2390, com valores de similaridades de 93,1 a 95,4% na análise de MLSA utilizando os cinco genes (Figura 19 e Anexo 8). No entanto, essas linhagens apresentaram características morfológicas e patogênicas diferentes das linhagens do G2 com o qual ficaram agrupadas na árvore filogenética. A morfologia mostrou-se diferente com hifas espirais e esporo de coloração cinza esverdeada, creme e verde (Tabela 7). Já com relação a patogenicidade ambas foram pouco patogênicas, sendo que IBSBF 2970 apresentou os três genes de patogenicidade e 2864 apresentou somente o operon da *txtAB* (Tabela 10).

Ainda, na análise de multilocus utilizando os cinco genes, as linhagens do G2 e IBSBF 2864 e 2970 apresentaram os maiores valores de similaridade de sequências com a linhagem Tipo de *S. acidiscabies*, mas com valores também parecidos com outras linhagens Tipo de *Streptomyces* utilizadas (Tabela 14).

Apesar do agrupamento dessas linhagens verificou-se diferenças morfológicas, patogênicas e moleculares entre elas, bem como valores de similaridade considerados baixos no sequenciamento de diferentes genes indicando que podem tratar-se de novas espécies associadas à sarna.

5.6.3.2 Grupo 3 (G3) e linhagens relacionadas

O grupo 3 ficou composto apenas pela linhagem IBSBF 2395, no entanto, nas diferentes análises filogenéticas essa linhagem ficou filogeneticamente próxima de outras oito linhagens IBSBF 2808, 2866, 2931, 2952, 2958, 2965, RS 19 e RS 23.

A linhagem IBSBF 2395 apresentou as seguintes características:

- Morfologia: hifa flexuosa e esporo cinza (Tabela 7);
- Patogenicidade: muito virulenta em minitubérculos e apresentou amplificação intensa dos três genes de patogenicidade avaliados (Tabela 10);
- Molecular: apresentou sinal de amplificação com o par de *primers* ScabI/ScabII e apresentou perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* semelhante ao das linhagens do Grupo 1 (*S. europaeiscabiei*) quando a enzima *Hae* III foi utilizada e perfil das linhagens *Ssc*, *Sst*, *Sac*, *Stu* e *Sre* com a enzima *Cfo* I (Tabela 12).

De acordo com as características patogênicas e moleculares (amplificação com *primers* espécie-específicos para *S. scabiei*) a linhagem IBSBF 2395 apresentou características das genomoespécies de *S. scabiei*, no entanto, apresentou morfologia de hifa flexuosa e perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* diferente dessa espécie.

Com relação às oito linhagens relacionadas ao G3, somente a linhagem IBSBF 2965 apresentou a mesma morfologia que IBSBF 2395. As demais apresentaram hifas espirais (2866, 2931, 2952, 2958, RS 19 e RS 23) e hifa espiral em tufo (IBSBF 2808) (Tabela 7). Quanto à patogenicidade as linhagens IBSBF 2965 apresentaram amplificação dos três genes de patogenicidade avaliados; IBSBF 2866 apresentou a amplificação dos genes *nec1* e *tomA*; as linhagens IBSBF 2952 e 2958 não apresentaram a amplificação do gene *nec1*; e as demais linhagens (IBSBF 2808, RS 19 e RS 23) apresentaram somente o gene relacionado à síntese de tomatinase. Todas as linhagens, exceto RS 19, foram patogênicas em minitubérculos mostrando-se pouco virulentas (IBSBF 2958 e RS 23), moderadamente virulentas (2866, 2952 e 2965) ou muito virulentas (2808 e 2931) (Tabela 10).

Nas diferentes análises de sequências realizadas essas linhagens apresentaram similaridade com as espécies *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac* (Anexos 8 e 9).

Na análise dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB*, a linhagem 2395 agrupou em 100% das repetições (similaridade de 96,9%) com a linhagem 2965, que também apresentou alta similaridade com as espécies *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac* (Figura 18, Tabela 14 e Anexo 9). Na análise com os cinco genes agrupou com outras linhagens (IBSBF 2808, 2931, 2952 e 2958), que também apresentaram similaridade com *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac*, em 92% das repetições (Figura 19, Tabela 14 e Anexo 8).

Na análise dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB* a linhagem 2866 agrupou em 100% das repetições de *bootstrap* com 2931 com valor de similaridade de 96,1% entre si (Figura 18 e Anexo 9). Assim, pela proximidade filogenética e valores de similaridades com *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac*, IBSBF 2866 foi incluída no grupo de linhagens relacionadas ao grupo 3.

Na análise do gene *atpD* as linhagens 2866, 2931, RS 19 e RS 23 ficaram agrupadas em 93% das repetições de *bootstrap* com valores de similaridade de sequências de 95,8 a 98% entre si, sendo assim, RS 19 e RS 23 também foram incluídas nesse grupo.

Apesar do agrupamento dessas oito linhagens com a linhagem IBSBF 2395 verificou-se diferenças morfológicas, patogênicas e moleculares entre elas, com diferentes perfis de PCR-RFLP do gene *atpD*. Ainda apesar do agrupamento com as espécies *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac*, os valores de similaridade com as linhagens Tipo foram muito baixos o que indicou que também podem representar novas espécies (Tabela 14).

5.6.3.3 Grupo 5 (G5)

Nesse grupo foram incluídas dez linhagens IBSBF 2509, 2805, 2806, 2807, 2812, 2815, 2865, 2949, 2953 e 2955.

Essas linhagens apresentaram morfologia idêntica as genomoespécies de *S. scabiei*, mas não apresentaram amplificação com os *primers* específicos para essas espécies (Tabelas 7 e 12). Com relação à patogenicidade, os resultados foram distintos para as diferentes linhagens sendo que a linhagem 2509 mostrou-se pouco virulenta em minitubérculos e não apresentou sinal de amplificação do gene *tomA*; as demais linhagens foram muito virulentas em minitubérculos, exceto 2955 que foi pouco virulenta. Dessas IBSBF 2805, 2807 e 2815 apresentaram amplificação somente para o gene relacionado à síntese da tomatinase; 2806 nenhuma amplificação dos genes avaliados; 2812 amplificação somente para o operon *txtAB*; e 2865, 2949, 2953 e 2955 apresentaram amplificação do gene *tomA* e do operon *txtAB* (Tabela 10).

Na análise dos genes *rpoB/atpD*, sequenciados para os membros desse grupo, as linhagens agruparam entre si em 96% das repetições de *bootstrap* e com as genomoespécies de *S. scabiei* em 42% das repetições (Anexo 4).

Em todas as árvores filogenéticas construídas as linhagens do G5 ficaram agrupadas. Em algumas análises filogenéticas as linhagens ficaram agrupadas com genomoespécies de *S. scabiei* (Figura 18), no entanto, na análise de multilocus com cinco genes elas agruparam

com a espécie *S. acidiscabies* em 83% das repetições com similaridade de 91,7 a 93,3% com essa linhagem Tipo. Nessa análise, as linhagens desse grupo apresentaram similaridades de 92,9 a 97,3% entre si (Figura 19 e Anexo 8).

Apesar do agrupamento com *Ssc*, *Sst*, *Seu* e principalmente com *Sac* os valores de similaridade foram considerados baixos com essas espécies (Tabela 14), e sendo assim, essas linhagens também podem representar uma nova espécie.

5.6.3.4 Grupo 7 (G7)

Esse grupo ficou formado pelas linhagens IBSBF 2394, 2503, 2507, 2968 e RS 8. Quanto à morfologia essas linhagens apresentaram esporos de coloração cinza e hifas espirais, com exceção de IBSBF 2968 e RS 8 que apresentaram hifas espirais em tufo (Tabela 7). Na patogenicidade, verificou-se uma grande variação nesse grupo com linhagens que apresentaram amplificação para todos os genes (IBSBF 2503), somente o gene *nec1* (IBSBF 2968) e outras nenhum dos genes de patogenicidade (IBSBF 2394, 2507 e RS 8). Essas linhagens mostraram-se pouco virulentas nos testes em minitubérculos (Tabela 10).

Na análise do gene *rpoB*, as linhagens que foram sequenciadas (IBSBF 2394, 2503, 2507 e 2968) agruparam em 96% das repetições de *bootstrap* e ficaram próximas filogeneticamente de *S. ipomoeae* (Anexo 3). No entanto, na análise com outros genes essas linhagens agruparam com outras espécies (Figuras 18 e 19 e Anexos 4, 5 e 6).

As linhagens 2503 e 2507 apresentaram o mesmo perfil de PCR-RFLP do gene *atpD*, as mesmas características morfológicas e agruparam filogeneticamente na análise do gene *rpoB*, com 97,2% de similaridade entre si (Anexo 7).

As linhagens 2394, 2503 e 2968 agruparam em 100% das repetições na análise dos genes *rpoB/atpD*. A similaridade entre as linhagens variou de 94,2 a 94,4% (Anexos 4 e 10). A linhagem RS 8 não foi sequenciada, uma vez que apresentou as mesmas características de IBSBF 2968.

Os valores de similaridade com as linhagens Tipo mostraram-se baixos (abaixo de 90,4%) e os maiores valores de similaridade foram com as espécies *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac* (Tabela 14). Esse grupo pode conter diferentes novas espécies de *Streptomyces* associada à sarna da batata.

Tabela 14. Valores de similaridade de sequências de diferentes genes das linhagens de *Streptomyces* sp. filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. acidiscabies*.

Grupo Genético	IBSBF/ Código	Genes sequenciados	Valores de similaridade com as espécies			
			<i>Ssc</i>	<i>Seu</i>	<i>Sst</i>	<i>Sac</i>
Grupo 2 (G2)	2247	<i>rpoB/atpD/recA</i>	92,3%	92,5%	92,6%	92,3%
	2352	<i>rpoB/atpD</i>	94,3%	94,9%	95,1%	94,3%
	2390	<i>rpoB/atpD/recA</i>	94%	94,5%	94,6%	94,1%
		<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,3%	91,7%	91,4%	92%
Linhagens agrupadas com as do G2	2864	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,4%	91,6%	91,5%	91,9%
	2970	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	90,8%	91%	91,2%	91,8%
Grupo 3 (G3)	2395	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,4%	91,4%	91,6%	91,5%
Linhagens agrupadas com as do G3	2808	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	89,4%	90,2%	89,8%	90,7%
	2866	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,5%	91,2%	91,7%	91,1%
	2931	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,1%	91,3%	91,2%	91,1%
	2952	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,3%	91,5%	91,3%	91,8%
	2958	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	90,5%	91%	90,9%	91,1%
	2965	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	93,1%	93,4%	93,4%	93,4%
	RS 19	<i>atpD</i>	92,2%	94,1%	94,4%	93,7%
	RS 23	<i>atpD</i>	93,4%	94,1%	94,4%	93,7%
Grupo 5 (G5)	2509	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	92,7%	93,5%	93,2%	93%
		<i>rpoB/atpD</i>	94,4	95,9%	95,5	94,2
	2805	<i>rpoB/atpD</i>	95,2%	96,8%	96,4%	95,7%
	2806	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,5%	92,2%	91,7%	91,7%
		<i>rpoB/atpD</i>	93,4%	94,8%	94,4%	93,4%
	2807	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	91,1%	91,2%	91,6%	92,1%
		<i>rpoB/atpD</i>	96%	96,8%	97%	96,5%
	2815	<i>rpoB/atpD</i>	88%	89,6%	88,9%	88,1%
	2865	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	91,5%	91,3%	91,8%	90,9%
		<i>rpoB/atpD</i>	95,8%	96,4%	96,6%	96,1%
	2949	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	93,3%	93,8%	93,4%	93,3%
		<i>rpoB/atpD</i>	94,3%	95,7%	95,2%	94,4%
Grupo 7 (G7)	2503	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	92,9%	93,2%	93,1%	93%
		<i>rpoB/atpD</i>	95,7%	96,8%	96,8%	95,7%
		<i>rpoB/atpD</i>	90,8%	90,5%	91,2%	90,7%
	2507	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	87,5%	87,5%	87,8%	87,3%
		<i>rpoB</i>	93%	91,8%	93%	92,9%
		<i>rpoB/atpD</i>	92%	92%	92,5%	92,2%
Grupo 8 (G8)	2968	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	90,4%	90,7%	90,5%	90,5%
		<i>rpoB/atpD</i>	91,2%	91,6%	91,8%	91,4%
		<i>atpD</i>	92,6%	93,4%	93,5%	92%
	RS 21	<i>rpoB/atpD</i>	91,1%	91,6%	91,8%	91,2%

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Brasil; *Sac*: *S. acidiscabies*; *Seu*: *S. europaeiscabiei*; *Ssc*: *S. scabiei*; *Sst*: *S. stelliscabiei*.

5.6.3.5 Grupo 8 (G8)

As linhagens RS 17, RS 18 e RS 21 compuseram o grupo 8. Essas linhagens apresentaram morfologia de hifas espirais e esporos brancos, características semelhantes às espécies *Ssc*, *Sst* e *Seu* (Tabela 7). No entanto, não ocorreu amplificação com *primers* específicos para essas espécies (Tabela 12). Além disso, para essas linhagens foi observada a amplificação somente do gene *tomA* e pouca virulência nos testes em minitubérculos, exceto para RS 18, que não mostrou-se patogênica (Tabela 10).

Na análise dos genes *rpoB/atpD*, as linhagens RS 17 e RS 21 agruparam em 100% das repetições com similaridade de 97% e não agruparam com nenhuma linhagem Tipo. Apresentaram valores de similaridade considerados baixos, menores que 91,8%, com as espécies *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei* e *S. acidiscabies* (Tabela 14 e Anexos 4 e 10). O grupo 8 também foi considerado como possível nova espécie.

5.6.4 Linhagens filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei*

5.6.4.1 Grupo 6 (G6)

As quatro linhagens, IBSBF 2520, 2521, 2522 e 2524 foram incluídas no grupo 6 e apresentaram as seguintes características:

- Morfologia: hifa espiral e esporo branco a cinza (Tabela 7);
- Patogenicidade: em minitubérculos mostraram-se de pouco a muito virulentas. Apresentaram sinal de amplificação pouco intenso para os genes de patogenicidade *nec1*, *tomA* e operon *txtAB* (Tabela 10);
- Molecular: apresentaram sinal de amplificação com o par de *primers* ScabI/ScabII, mas não amplificaram com *primers* específicos para *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei*; e apresentaram perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* idêntico à *S. scabiei* com a enzima *Hae* III, mas diferente com a enzima *Cfo* I (Tabela 12).

Na análise do gene *rpoB*, as linhagens do G6 agruparam em 100% das repetições de *bootstrap* com similaridade acima de 98% entre si. Além disso, juntamente com IBSBF 2932 formaram um grupo em 34% das repetições com as espécies *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei* (Anexos 3 e 7).

Nas análises dos genes *rpoB/atpD/recA/trpB*, as linhagens 2520 e 2522 agruparam com *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei* em 79% das repetições, mas também apresentaram similaridade alta com outras espécies como *Ssc*, *Sst*, *Seu* e *Sac*. A linhagem 2932, que apresentou as mesmas características morfológicas, patogênicas e moleculares de SC 3B, também agrupou com essas linhagens em 85% das repetições (Figura 18).

Na análise de MLSA dos cinco genes, a linhagem IBSBF 2522 agrupou em 88% das repetições com *Ssc*, *Sst*, *Seu*, *Sre* e *Stu* (Figura 19). Os valores de similaridade com essas diferentes espécies foram semelhantes (Tabela 15 e Anexo 8).

As linhagens do G6 apresentaram morfologia e algumas características moleculares de genomoespécies de *S. scabiei*. No entanto, o agrupamento com as espécies *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei*, na análise do genes *rpoB/atpD/recA/trpB*, indicou que são diferentes, podendo representar novas espécies. Além disso, os valores de similaridades com as diferentes espécies foram baixos (Tabela 15 e Anexo 9), principalmente quando um número maior de genes foi considerado na análise filogenética.

Apesar da linhagem IBSBF 2932 agrupar com outras, esta apresentou características morfológicas (hifa flexuosa e esporo marrom) e patogênicas (amplificação intensa do gene *necI*) distintas (Tabelas 7 e 10). Além disso, os valores de similaridade com aquelas linhagens foram baixos, inferiores à 90,8% o que indicou que constituem grupos de espécies distintos (Anexo 9).

Assim, as linhagens do grupo 6 e as linhagens IBSBF 2932 e SC 3B foram consideradas duas possíveis novas espécies de *Streptomyces*, visto que apresentam diferenças entre si e com as principais linhagens Tipo de *Streptomyces*.

5.6.4.2 Linhagem IBSBF 2804

A linhagem IBSBF 2804 apresentou morfologia de hifa em espiral e esporos de cor cinza, característica de *S. scabiei*, mas não apresentou sinal de amplificação com os *primers* específicos para essa espécie e nem com os *primers* específicos para *Stu* e *Sre* (Tabelas 7 e 12). Mostrou-se muito virulenta em minitubérculos e não apresentou amplificação do gene associado à síntese de taxomina (Tabela 10). Por essas diferenças pode representar uma nova espécie associada à sarna.

Na análise de MLSA de cinco genes, a linhagem IBSBF 2804 não agrupou com nenhuma linhagem Tipo e apresentou valores de similaridade inferiores à 90,5% com as espécies *Ssc*, *Sst*, *Seu*, *Sac*, *Sre* e *Stu* (Figura 19, Tabela 15 e Anexo 8).

Tabela 15. Valores de similaridade de sequências de diferentes genes das linhagens de *Streptomyces* sp. filogeneticamente próximas de *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. reticuliscabiei*

Grupo Genético	IBSBF/ Código	Genes sequenciados	Valores de similaridade com as espécies					
			<i>Ssc</i>	<i>Seu</i>	<i>Sst</i>	<i>Sre</i>	<i>Stu</i>	<i>Sac</i>
Grupo 6 (G6)	2520	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	92,4%	93%	93%	92,9%	93%	92,4%
	2521	<i>rpoB</i>	92,5%	91,8%	92,9%	92,9%	93%	94,2%
	2522B	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	88,6%	89,4%	89,1%	88,8%	88,9%	88,2%
	2524	<i>rpoB/recA</i>	92,7%	93,1%	93,2%	92,5%	92,7%	92,8%
	2932	<i>rpoB/atpD/recA/trpB</i>	89,6	90%	90,7%	90%	90,1%	90,2%
Linhagem perfil genético diferente	2804	<i>rpoB/atpD/recA/trpB/gyrB</i>	90,5%	90,4%	91%	89,8%	89,9%	90,1%

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico; *Sac*: *S. acidiscabies*; *Seu*: *S. europaeiscabiei*; *Sre*: *S. reticuliscabiei*; *Ssc*: *S. scabiei*; *Sst*: *S. stelliscabiei*; *Stu*: *S. turgidiscabies*.

5.6.5 Linhagem filogeneticamente próxima de *S. ipomoeae*

A linhagem IBSBF 2019 apresentou muitas características divergentes das linhagens Tipo analisadas com hifas flexuosas e esporos com coloração de cinza a creme; amplificação pouco intensa dos três genes de patogenicidade avaliados; e amplificação positiva com *primers* específicos para *S. scabiei*, o que não ocorreu em outras linhagens pertencentes à espécie *S. ipomoeae* (Tabelas 7, 10 e 12).

Essa linhagem apresentou perfil de PCR-RFLP do gene *atpD* diferente das linhagens Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna da batata, no entanto, em todas as análises de sequenciamento essa linhagem agrupou com a espécie Tipo de *S. ipomoeae*. Na análise combinada dos genes *rpoB/atpD/gyrB/trpB* essa linhagem agrupou com *S. ipomoeae* em 82% das repetições com valores de similaridade de 79,4% (Figura 18 e Anexo 9).

De acordo com esses resultados essa linhagem também pode representar uma nova espécie causadora da sarna da batata, relacionada com *S. ipomoeae*.

5.6.6 Linhagens filogeneticamente distantes das linhagens Tipo de *Streptomyces*

Cinco linhagens, IBSBF 2343, 2344, 2435, SC18 e SC 23C, mostraram-se muito distantes filogeneticamente das diferentes espécies de *Streptomyces* associadas à sarna.

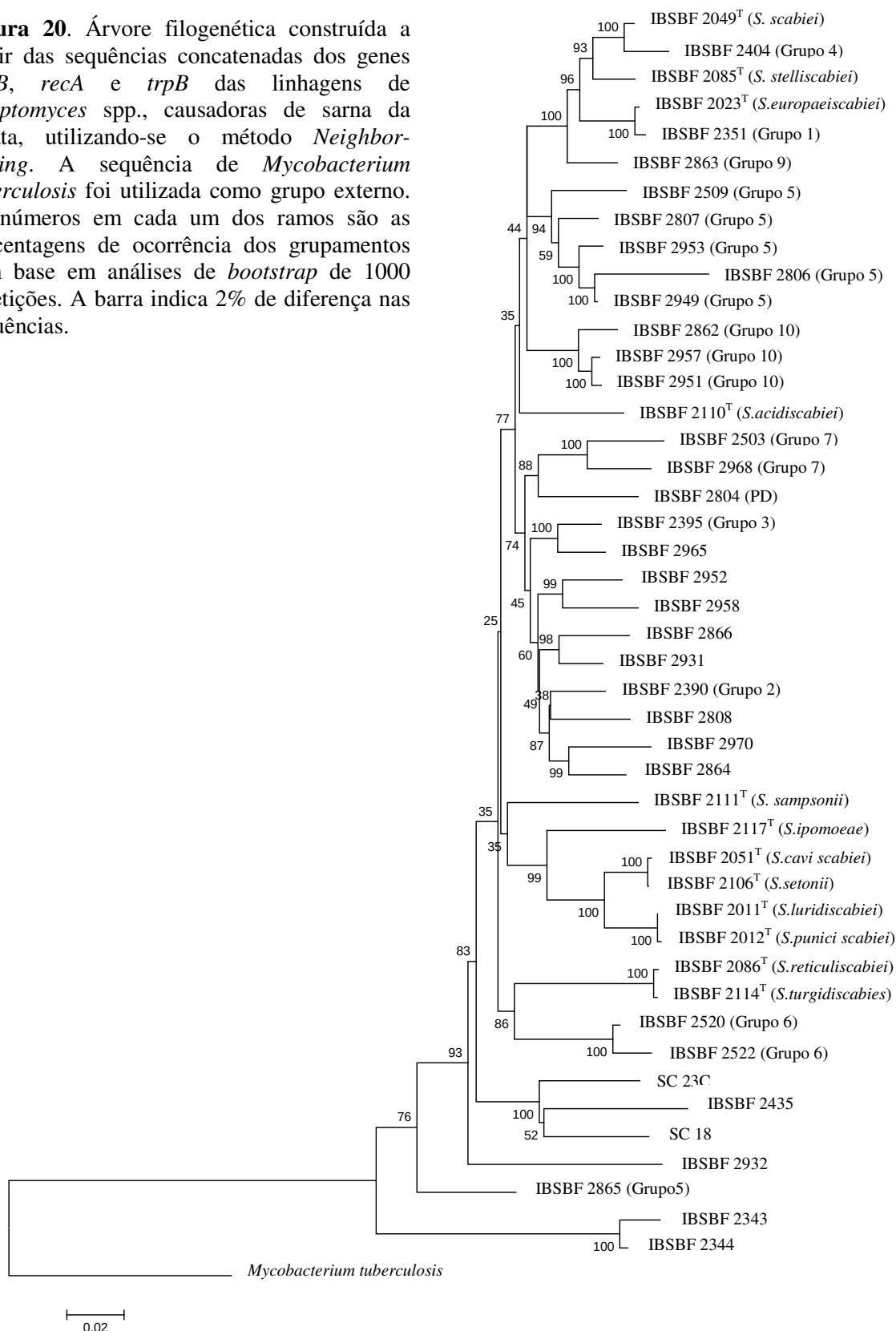
As linhagens IBSBF 2343 e 2344 apresentaram morfologia de hifa flexuosa e esporo de coloração cinza; mostraram-se pouco virulentas em minitubérculos e apresentaram amplificação para os genes relacionados à síntese da tomatinase e taxtomina (Tabelas 7 e 10). Na análise dos genes, *rpoB/recA/trpB* ficaram agrupadas em 100% das repetições com valores de similaridade de 98,3%. Não agruparam com nenhuma linhagem Tipo e apresentaram valores de similaridade bem próximos para as diferentes espécies. O maior valor de similaridade foi com *S. scabiei* 81,4% para a linhagem 2343 e 82,7% para a linhagem 2344 (Figura 20 e Anexo 11).

As linhagens IBSBF 2435, SC 18 e SC 23C apresentaram morfologias distintas, sendo que, IBSBF 2435 apresentou hifas espirais e esporo branco; SC 18 hifas espirais em tufo e esporo branco; e SC 23C hifas flexuosas e esporo bege. Quanto à patogenicidade IBSBF 2435 mostrou-se muito virulenta em minitubérculos e apresentou somente o gene relacionado à síntese da tomatinase; SC 18 mostrou-se moderadamente virulenta em minitubérculos apresentando amplificação somente para gene relacionado à síntese da taxtomina; e SC 23C foi pouco virulenta em minitubérculos e a amplificação do gene de patogenicidade *necI* não foi observada para essa linhagem.

As linhagens IBSBF 2435, SC18 e SC 23C agruparam em todas as árvores filogenéticas construídas. Nas análises de cinco, quatro e de cada um dos genes separadamente esse grupo foi formado com altos valores de *bootstrap* (Figuras 18 e 19). Na análise de MLSA, utilizando cinco genes, a linhagem 2435 apresentou valores de similaridade de 85,9 a 86,8% com as linhagens Tipo de *Streptomyces*; SC18 apresentou valores de 88,1 a 88,3% com as espécies *Sca*, *Sse*, *Slu* e *Spu*; e SC23C apresentou valor de 88,2% com *S. sampsonii* (Anexo 8).

Essas linhagens apresentaram perfis diferenciados no PCR-RFLP do gene *atpD*, não apresentaram sinal de amplificação com *primers* específicos para *S. scabiei* e apresentaram baixos valores de similaridade com as principais linhagens Tipo de *Streptomyces* na análise de MLSA com cinco genes (Tabela 12 e Anexo 8), podendo também representar diferentes novas espécies de *Streptomyces* associada à sarna.

Figura 20. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *rpoB*, *recA* e *trpB* das linhagens de *Streptomyces* spp., causadoras de sarna da batata, utilizando-se o método *Neighbor-joining*. A sequência de *Mycobacterium tuberculosis* foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos grupamentos com base em análises de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 2% de diferença nas sequências.



5.6.7 Outras linhagens com perfis genéticos diferentes

A linhagem IBSBF 2006, obtida de lesão de batata oriunda do Chile, apresentou características morfológicas de hifa flexuosa, com esporo de cor branca a amarela. Mostrou-se pouco virulenta em minitubérculos e não apresentou amplificação para os genes de patogenicidade avaliados. Essa linhagem não apresentou amplificação com *primers* específicos para *S. scabiei* e o perfil de PCR-RFLP com a enzima *CfoI* foi idêntico ao da espécie *S. caviscabies*. As características morfológicas, patogênicas e moleculares indicaram tratar-se de uma linhagem relacionada a espécie *Sca/Sse* (Tabelas 7, 10 e 12).

A linhagem SC 10 apresentou maior similaridade com *S. acidiscabies* na análise filogenética utilizando o gene *rpoB* (Tabela 12), no entanto, não ficou agrupada com nenhuma linhagem Tipo de *Streptomyces* associada à sarna (Anexo 3). Essa linhagem apresentou morfologia diferenciada, com hifa espiral organizada em tufo e esporo de cor marrom a cinza. Mostrou-se pouco virulenta apresentando e apresentou sinal de amplificação somente para o gene relacionado à síntese da taxtomina (Tabelas 7 e 10).

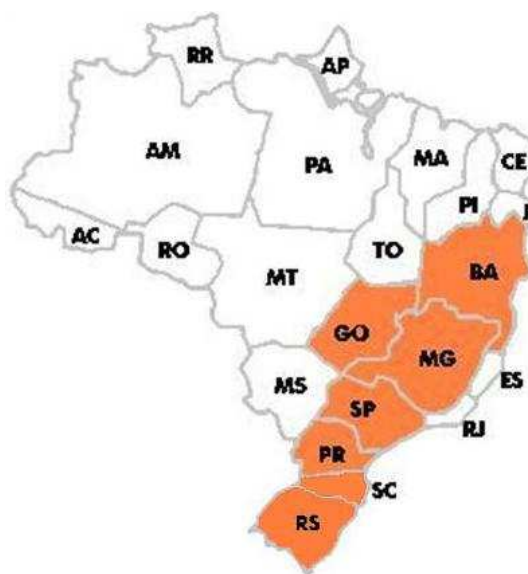
As linhagens IBSBF 2229 e 2258 foram agrupadas com genomoespécies de *S. scabiei* (itens 5.6.2.1 e 5.6.2.2, respectivamente) e IBSBF 2804 com diferentes linhagens Tipo de *Streptomyces* (item 5.6.4.2).

5.6.8 Linhagens com perfis genéticos diferentes não patogênicas em minitubérculos

As linhagens IBSBF 2467, SC 2B, SC 12 e SC 15 não apresentaram morfologia diferenciada das espécies associadas à sarna (Tabela 7). Essas linhagens apresentaram perfis de PCR-RFLP do gene *atpD* diferentes das linhagens Tipo de *Streptomyces* e não foram patogênicas nos testes de patogenicidade em minitubérculos, entretanto, foi observada amplificação de alguns dos genes de patogenicidade como os associados à síntese de tomatinase e de taxtomina. As linhagens 2467 e SC 12 não apresentaram o gene *nec1* e a amplificação dos genes *tomA* e *txtAB* foi pouco intensa. Já as linhagens SC 2B e SC 15 apresentaram somente o gene da taxtomina (Tabelas 10 e 12). Assim, essas linhagens também deverão ser investigadas futuramente.

6. Levantamento e distribuição das linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata no Brasil

Foi realizado o levantamento da ocorrência e distribuição da sarna da batata nas regiões produtoras do Brasil utilizando os dados de procedência das amostras recebidas. As 165 linhagens nacionais foram obtidas a partir de material vegetal de diferentes regiões produtoras dos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, segundo a distribuição indicada na Figura 21. Nesse estudo, a representatividade das linhagens provenientes dos quatro estados considerados os maiores produtores do país (Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo) foi considerada alta, tanto no número de linhagens (102) quanto em relação ao número de regiões produtoras amostradas (29 cidades).



São Paulo (39): Itapetininga (13), Vargem Grande do Sul (10), Indaiatuba (3), Campinas (2), Casa Branca (2), Paranapanema (2), São Miguel Arcanjo (2), Tambaú (2), Capão Bonito (1), Itapeva (1) e Piedade (1).

Santa Catarina (34): Itaiópolis (10), Canoinhas (9), Irineópolis (9), Água Doce (3) e Papanduva (3)

Rio Grande do Sul (27): Ibiraiaras (17), São Francisco de Paula (10).

Minas Gerais (20): Poços de Caldas (4), Santa Juliana (3), Uberaba (3), Bueno Brandão (2), Ipuiuna (2), Viçosa (2), Araxá (1), Nova Resende (1), Perdizes (1) e São Gotardo (1).

Paraná (16): Guarapuava (5), Tapira (3), São Mateus do Sul (3), Quitandinha (2), Castro (2) e Pinhão (1).

Bahia (15): Ibicoara (9) e Mucugê (6).

Goiás (12): Cristalina (12).

Procedência desconhecida (2).

Figura 21. Distribuição da sarna da batata em regiões produtoras de diferentes estados de acordo com a procedência das amostras recebidas no Laboratório de Bacteriologia Vegetal.

As cultivares de batata mais plantadas no Brasil são importadas, sendo elas Ágata, Monalisa, Asterix, Atlantic, Cupido e Mondial. A cultivar mais plantada é a Ágata, sendo muito produtiva, mas suscetível à doenças (IBGE, 2010). Com relação às cultivares de batata infectadas por *Streptomyces*, Ágata, Cupido e Asterix foram as mais acometidas pela

sarna, sendo que das amostras recebidas 41,6% foram Ágata, 19,7% Cupido e 15,2% Asterix. Outras variedades como Atlantic (4,5%), Monalisa (4,5%), Markies (3,4%) e Mondial (2,8%) também apresentaram os sintomas de sarna, porém representaram uma parcela menor das amostras recebidas. Do material vegetal importado, as linhagens de *Streptomyces* foram isoladas das variedades Baraka, Caesar, Carreira, Eden e Vivaldi.

A ocorrência da doença predominantemente em algumas cultivares pode estar associada à sua suscetibilidade à linhagens de *Streptomyces*. Nesse estudo, a maior parte das amostras de batata recebidas foram das cultivares Ágata, Cupido e Asterix, indicando que são muito suscetíveis. Essa suscetibilidade também foi demonstrada no estudo realizado por Fischer e colaboradores (2006), que verificou que essas três cultivares foram mais suscetíveis à sarna da batata quando comparadas à outras também utilizadas para plantio no Brasil.

Após a identificação das espécies foi possível verificar a distribuição das diferentes espécies de *Streptomyces* em regiões produtoras de batata do país (Tabela 16). A espécie *S. scabiei* foi a mais abundante (32% das linhagens) e mais amplamente distribuída no país, uma vez que foi detectada em tubérculos de batata de todas as regiões produtoras amostradas. Das 12 linhagens da espécie *S. europaeiscabiei*, 11 foram isoladas de batatas oriundas da Holanda e uma de Itapetininga (SP). Estudos realizados por Flores-González e colaboradores (2008) mostraram que *S. europaeiscabiei* está amplamente distribuída na Europa, sendo a principal espécie causadora da sarna comum, corroborando com os resultados de identificação do presente estudo, uma vez que as 11 linhagens isoladas eram de material vegetal proveniente da Holanda. Os resultados também revelaram a ocorrência de *S. europaeiscabiei* no país, porém essa espécie esteve restrita ao estado de São Paulo.

As treze linhagens de *S. caviscabies* foram isoladas de tubérculos de batata provenientes de diferentes estados produtores do país (BA, GO, SP, MG e RS), estando amplamente distribuída apesar de menos abundante (7,3%). Nas análises filogenéticas, linhagens dessa espécie, isoladas de diferentes estados, apresentaram similaridades muito altas entre si e agruparam em 100% das repetições de *bootstrap* (Anexos 4 e 10).

As duas linhagens da espécie *S. sampsonii* identificadas foram isoladas de batata de regiões produtoras do estado de São Paulo. Essa espécie foi descrita como saprófita comumente encontrada em lesões de sarna (LORIA; LAMBERT, 1989a). No entanto, nesse

estudo uma das linhagens dessa espécie apresentou os três genes de patogenicidade avaliados (IBSBF 2360) e a outra (IBSBF 2020), que apresentou somente o gene *tomA*, mostrou-se virulenta em minitubérculos, indicando o potencial de patogenicidade dessa espécie.

Vinte oito linhagens foram identificadas como *S. ipomoeae*, considerada, até o momento, patógeno de batata-doce. Essas linhagens foram isoladas de tubérculos de batata dos estados PR, MG, RS, SC e SP, estando também amplamente distribuída nessas regiões.

Tabela 16. Distribuição das espécies de *Streptomyces* e dos grupos genéticos por estado produtor de batata do Brasil

Procedência	Espécies	Grupos Genéticos	Linhagens perfis genéticos diferentes	Total de linhagens
São Paulo	<i>S. ipomoeae</i> (12), <i>S. scabiei</i> (10), <i>S. caviscabies</i> (4), <i>S. sampsonii</i> (2) e <i>S. europaeiscabiei</i> (1)	Grupo 2 (3), Grupo 6 (2) e Grupo 3 (1)	4	39
Santa Catarina	<i>S. scabiei</i> (4) e <i>S. ipomoeae</i> (2)	Grupo 5 (5), Grupo 9 (5), Grupo 10 (5), linhagens agrupadas com G3 (4), com G6 (2) e com G2 (1)	6	34
Rio Grande do Sul	<i>S. scabiei</i> (7), <i>S. ipomoeae</i> (2) e <i>S. caviscabies</i> (1)	Linhagens agrupadas com G3 (4), Grupo 5 (4), Grupo 6 (2), Grupo 7 (2), Grupo 8 (3) e linhagens agrupadas com G2 (1)	1	27
Minas Gerais	<i>S. scabiei</i> (10), <i>S. caviscabies</i> (2) e <i>S. ipomoeae</i> (3)	Grupo 4 (3)	2	20
Paraná	<i>S. scabiei</i> (8) e <i>S. ipomoeae</i> (8)	-	0	16
Bahia	<i>S. scabiei</i> (12) e <i>S. caviscabies</i> (1)	Grupo 7 (2)	0	15
Goiás	<i>S. scabiei</i> (5), <i>S. caviscabies</i> (5) e Agrupada com <i>S. ipomoeae</i> (1)	Grupo 7 (1)	0	12
Desconhecida	<i>S. scabiei</i> (1) e <i>S. ipomoeae</i> (1)	-	0	2
Chile	Agrupada com <i>S. caviscabies</i> e <i>S. setonii</i>	-	0	1
França	-	Grupo 5 (1)	0	1
Holanda	<i>S. europaeiscabiei</i> (11)	-	0	11

Os demais grupos de linhagens com perfis genéticos diferenciados foram obtidos de diferentes estados. Alguns grupos ocorreram somente em um estado produtor como o Grupo 4 em Minas Gerais, Grupo 8 no Rio Grande do Sul, Grupos 9 e 10 em Santa Catarina. Outros grupos de linhagens foram encontrados em diferentes estados produtores como Grupo 2 e linhagens a ele relacionadas (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São

Paulo), Grupo 3 e linhagens a ele relacionadas (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo), Grupo 5 (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e França), Grupo 6 e linhagens a relacionadas (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) e Grupo 7 (Bahia, Goiás e Rio Grande do Sul) (Tabela 16).

As linhagens com perfis genéticos diferentes, que ficaram isoladas nos agrupamentos filogenéticos, foram obtidas a partir de batata dos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

As cultivares Ágata, Cupido e Asterix foram suscetíveis às diferentes espécies como *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. caviscabies* e *S. ipomoeae*. A cultivar Monalisa foi suscetível a *S. scabiei* e *S. sampsonii* e as cultivares Mondial e Atlantic suscetíveis à *S. scabiei*, *S. caviscabies* e *S. ipomoeae*. Algumas espécies como *S. scabiei*, *S. caviscabies* e *S. sampsonii* foram isoladas de beterraba, que também é uma cultura afetada por espécies de *Streptomyces*.

As linhagens que apresentaram características genéticas diferenciadas separadas em grupos e perfis causaram a doença em diferentes cultivares de batata, principalmente as cultivares Ágata, Asterix e Cupido, consideradas mais suscetíveis.

DISCUSSÃO

A sarna comum vem se tornando uma doença de suma importância na produção de batata no Brasil (ABBA, comunicação pessoal), no entanto estudos voltados para o manejo da doença e, principalmente, para o conhecimento das espécies patogênicas que aqui ocorrem são escassos.

Segundo Loria, Kers e Joshi (2006) a primeira etapa para o desenvolvimento de estratégias de manejo da sarna deve ser o levantamento das espécies patogênicas presentes nas regiões produtoras de batata. A grande quantidade de estudos relacionados à sarna que vem sendo realizados no mundo é indicativa da importância dessa doença que prejudica a produção de batata em diferentes países.

Estudos recentes de detecção e caracterização de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata vêm sendo realizados em diferentes países como Alemanha, Espanha, França, Holanda e Reino Unido (FLORES-GONZÁLEZ; VELASCO; MONTES, 2008), Canadá (ST-ONGE et al., 2008), Estados Unidos (WANNER, 2006), Coreia (SONG et al., 2004), Finlândia (LINDHOLM et al., 1997; KREUZE et al., 1999). Ainda, estudos de levantamento de espécies de *Streptomyces* possibilitaram a descrição de *S. acidiscabies* causando a sarna na China (ZHAO; YU; LIU, 2010) e *S. turgidiscabies* e *S. acidiscabies* no Reino Unido (THWAITES et al., 2010).

Assim, o levantamento da ocorrência e distribuição dessa doença a partir do isolamento de linhagens de diferentes regiões produtoras do país e a caracterização e identificação dessas no presente estudo foram passos iniciais e essenciais para o melhor conhecimento da doença no Brasil.

Nesse estudo, as linhagens de *Streptomyces* sp. foram caracterizadas com base em análises morfológicas, patogênicas e moleculares. Inicialmente, a Coleção de Culturas IBSBF possuía em seu acervo um número reduzido de isolados da região Sul. O isolamento de novas linhagens de *Streptomyces* e a incorporação dessas na Coleção IBSBF aumentou a representatividade da Coleção com relação à diversidade de *Streptomyces* encontrada no Brasil. O estabelecimento de uma Coleção de linhagens oriundas das principais regiões produtoras de batata do país contribuirá enormemente para estudos futuros relacionados à sarna da batata no Brasil.

Na caracterização morfológica das linhagens de *Streptomyces* desse estudo foram encontrados diferentes tipos de morfologia de hifas e coloração de esporos, indicando a

possível ocorrência de diversas espécies de *Streptomyces* em nosso país, visto que, o formato da cadeia de esporos e a coloração são características taxonômicas importantes que podem ser utilizadas na diferenciação de espécies (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Além disso, algumas linhagens que não puderam ser identificadas ainda apresentaram morfologia de hifas espirais organizadas em tufos, característica essa, não descrita nas principais espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata.

A caracterização morfológica foi muito importante no processo de identificação de espécies de *Streptomyces* e vem sendo utilizada em todos os estudos de caracterização de linhagens em diferentes países. Apesar disso, diferentes espécies de *Streptomyces* compartilham algumas características morfológicas, havendo a necessidade da utilização de outras características em associação a essa análise para a identificação de linhagens.

Na caracterização patogênica foram utilizados marcadores moleculares da ilha de patogenicidade de *Streptomyces*, os genes *necl*, *tomA* e operon *txtAB* e a presença desses marcadores foi correlacionada com a patogenicidade das linhagens. A análise da ocorrência desses genes foi utilizada em diferentes estudos, principalmente do gene *necl* e de genes relacionado à síntese de taxtamina genes *txtA*, *txtB* e o operon *txtAB* para confirmação da patogenicidade das linhagens (PARK et al., 2003b; BOUCHEK-MECHICHE et al., 2006; CULLEN; LEES, 2007; QU; WANNER; CHRIST, 2008). Outro estudo, no entanto, utilizou os três genes marcadores de patogenicidade (WANNER, 2006).

As linhagens avaliadas nesse estudo apresentaram variações nas ilhas de patogenicidade, com a presença de amplificação de todos os três genes ou ausência de um ou mais genes. As grandes variações na ilha de patogenicidade das linhagens desse estudo indicaram que pode haver grupos patogênicos distintos nas linhagens causadoras da sarna no Brasil. Resultados semelhantes foram encontrados por Wanner (2006) que, analisando linhagens de *Streptomyces* de campos de produção de batata dos Estados Unidos, verificou que alguns isolados não possuíam um ou mais genes dessa ilha.

Segundo vários estudos, o primeiro determinante da patogenicidade em *Streptomyces* é a produção de fitotoxinas denominadas taxtominas, principalmente da taxtamina A (HEALY et al., 2000; WANNER, 2006). Assim, os genes *txtA* e *txtB* relacionados à síntese de taxtamina A podem, então, ser considerados importantes marcadores de patogenicidade.

O operon *txtAB* foi avaliado como marcador molecular de patogenicidade nesse estudo, no entanto, nem sempre a patogenicidade pode ser correlacionada com a presença desse operon, uma vez que algumas linhagens consideradas patogênicas à batata não apresentaram amplificação desse gene. Outros estudos também reportaram linhagens de *Streptomyces* que não produziram taxtomina A e ainda assim causaram lesões em batata (CONN et al., 1998; PARK et al, 2003b). Ainda, no presente estudo, algumas linhagens não patogênicas em minitubérculos apresentaram sinal fraco de amplificação do operon *txtAB*. Estudo realizado por Conn e colaboradores (1998) também mostrou que algumas linhagens de *S. scabiei* produtoras de taxtomina não causaram sintomas de sarna em testes em casa de vegetação, devido à perda da patogenicidade, à pouca sobrevivência ou às condições ambientais inadequadas.

Assim, a produção de taxtomina A por linhagens de *Streptomyces* patogênicas pode ser considerada um fator de agressividade ou determinante secundário de patogenicidade, visto que contribui para a severidade da doença, mas não impede seu desenvolvimento na ausência dessa toxina. Outros compostos como toxinas do tipo concanamidas, proteína Nec1, enzimas hidrolíticas e outros mecanismos bioquímicos de ataque, ainda desconhecidos, podem estar envolvidos no processo de patogenicidade na ausência da produção da taxtomina (GARCIA, 2008).

Nesse estudo, uma parcela das linhagens mostrou-se patogênica, apresentando o operon *txtAB* e ausência de amplificação do gene *nec1*. Existe uma forte correlação entre a produção da taxtomina A e a presença do gene *nec1* em algumas linhagens patogênicas como *S. scabiei*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies* (BUKHALID; LORIA, 1997; BUKHALID; CHUNG; LORIA., 1998). No entanto, a proteína Nec1 não é requerida para a produção de taxtomina e, portanto, esses compostos representam fatores de virulência independentes (KERS et al., 2005).

Em outros estudos foram encontradas linhagens patogênicas, produtoras de taxtomina A e com ausência do gene *nec1* (BUKHALID; CHUNG; LORIA., 1998; KREUZE et al., 1999). Porém todas as linhagens não patogênicas não apresentaram esse gene (CULLEN; LEES, 2007). A ausência do gene *nec1* pode ocorrer devido à perda desse fator de virulência ou à presença de fatores de virulência diferentes (CULLEN; LEES, 2007).

Nesse estudo, no caso da ausência dos genes marcadores de patogenicidade (*necI*, *tomA* e operon *txtAB*), a confirmação da patogenicidade por meio de testes em minitubérculos de batata foi fundamental, contrariando Cullen e Lees (2007) que propuseram a utilização da avaliação apenas do gene *necI* como um marcador molecular para detectar linhagens de *Streptomyces* patogênicas, em substituição aos testes de patogenicidade em tubérculos de batata, que demandam mais tempo.

Em testes moleculares diferentes marcadores e ferramentas podem ser utilizados para a diferenciação de linhagens de *Streptomyces*. *Primers* específicos para diferentes espécies de *Streptomyces* podem auxiliar no processo de identificação de linhagens e foram utilizados em estudos de levantamento de espécies de *Streptomyces* presentes em diferentes países (LEHTONEN; RANTALA; KREUZE, 2004; WANNER, 2006). No entanto, no presente estudo, a especificidade desses *primers* não possibilitou a separação de linhagens mais próximas filogeneticamente. Os *primers* utilizados nesse estudo foram desenhados com base em sequências do gene 16S RNAr, gene com regiões pouco variáveis em diferentes espécies de *Streptomyces*. Seria interessante a utilização de sequências de genes como *atpD*, *recA*, *rpoB*, *trpB* e *gyrB* para o desenho de novos *primers* espécie-específicos que tivessem uma especificidade maior.

Nesse estudo, a análise de PCR-RFLP do gene *atpD* foi utilizada como ferramenta para diferenciação de linhagens de *Streptomyces* e mostrou-se eficiente separando as principais espécies associadas à sarna da batata. O uso dessa ferramenta pode facilitar o processo de identificação de linhagens de *Streptomyces* por meio de um experimento de fácil realização, reproduzível e barato. Além disso, essa ferramenta permite a seleção de linhagens que podem representar novas espécies de *Streptomyces* associadas à sarna. Ainda, a técnica de PCR-RFLP do gene *atpD* pode ser considerada uma nova ferramenta molecular que permite otimizar o processo de identificação de linhagens de *Streptomyces* e que pode auxiliar a comunidade científica em trabalhos futuros de identificação dessas bactérias.

A análise de multilocus com as sequências dos genes *atpD*, *recA*, *rpoB*, *trpB* e *gyrB* das linhagens Tipo de *Streptomyces* possibilitou elucidar as relações filogenéticas das principais espécies associadas à sarna, permitindo a diferenciação até mesmo de linhagens muito próximas geneticamente (genomoespécies). Essa análise permitiu a confirmação da

identificação das linhagens por PCR-RFLP do gene *atpD* e, ainda, o agrupamento de linhagens em diversos grupos com perfis genéticos diferentes, que podem representar novas espécies de *Streptomyces* e que devem ser investigados em estudos futuros.

Cabe ressaltar que a maioria dos estudos taxonômicos de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna utilizou apenas um gene nas análises filogenéticas, como sequências do gene 16S RNAr (KREUZE et al., 1999; PARK et al., 2003; LEHTONEN; RANTALA; KREUZE, 2004; SONG et al., 2004) e do gene *rpoB* (MUN et al., 2007). Destaca-se que a utilização da análise de multilocus para as diferentes espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata, conduzida no presente trabalho, é inédita.

A análise das características morfológicas, patogênicas e moleculares permitiu a identificação de 112 das 178 linhagens (165 nacionais e 13 de material vegetal importado) distribuídas em cinco espécies de *Streptomyces* que já foram descritas e relatadas em outros países. São elas, *S. scabiei*, *S. caviscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. sampsonii* e *S. ipomoeae*. Essa última espécie havia sido relatada como causadora de sarna somente em batata-doce, no entanto, este trabalho revelou que a mesma pode ser agente causal da sarna em batata. As 66 linhagens restantes mostraram-se diferentes das espécies de *Streptomyces* já descritas e podem representar novas espécies associadas à sarna da batata no Brasil.

Em estudos realizados em diferentes países também foram encontradas linhagens que diferiram das espécies de *Streptomyces* comumente associadas à sarna da batata. Nesses estudos foram descritos grupos de linhagens adaptadas às condições específicas, dependendo da localidade e que poderiam representar novas espécies de *Streptomyces* (LINDHOLM et al., 1997; WANNER, 2006). A evolução de estreptomicetos bem adaptados às novas condições ambientais é esperada, considerando a possibilidade de transferência horizontal da ilha de patogenicidade que pode conter diferentes genes. Além disso, diferenças ambientais, entre elas as climáticas, podem determinar a ocorrência ou predominância de diferentes perfis de *Streptomyces* causadores da sarna (WANNER, 2007).

Os resultados do presente trabalho, assim como de outros realizados nos Estados Unidos (LAMBERT; LORIA, 1989b; WANNER, 2006), Europa (FLORES-GONZÁLEZ; VELASCO; MONTES, 2008; BOUCHEK-MECHICHE, 2000; KREUZE et al., 1999) e Coréia (SONG et al., 2004), sugerem que há diferenças no perfil de linhagens de

Streptomyces causadoras da sarna em diferentes partes do mundo. No Brasil, houve predominância de *S. scabiei* (57 linhagens) em relação às genomoespécies *S. europaeiscabiei* (uma linhagem) e *S. stelliscabiei*, que não foi detectada. Estudos realizados na Europa indicaram predominância de *S. europaeiscabiei* sobre as demais (FLORES-GONZÁLEZ; VELASCO; MONTES, 2008).

Ainda, a espécie *S. acidiscabies* presente na Coreia, China, Estados Unidos, Japão e Reino Unido (LAMBERT; LORIA, 1989b; TÓTH et al., 2001; SONG et al., 2004; THAWAITES et al., 2010; ZHAO; YU; LIU, 2010) não foi detectada no presente estudo, embora Fischer e colaboradores (2006) tenham relatado a ocorrência dessa espécie no Brasil. Também não foram encontradas linhagens pertencentes à espécie *S. turgidiscabies*, descrita em outros países como Coreia, Finlândia e Reino Unido (KREUZE et al., 1999; LINDHOLM et al., 1997; SONG et al., 2004; THAWAITES et al., 2010).

No estudo de levantamento e distribuição das linhagens de diferentes regiões produtoras do Brasil, a espécie *S. scabiei* foi a mais abundante e amplamente distribuída no país, como observado em outros estudos. As espécies *S. caviscabies* e *S. ipomoeae* também se mostraram amplamente distribuídas e *S. europaeiscabiei* e *S. sampsonii* foram restritas às regiões produtoras de São Paulo. Os demais grupos de linhagens com perfis genéticos diferenciados foram obtidos de diversos estados, entretanto, alguns grupos ficaram restritos a um único estado produtor.

As cultivares de batata recebidas para esse estudo foram acometidas por diferentes espécies de *Streptomyces* ou grupos de linhagens com perfis diferentes, indicando assim, que as cultivares utilizadas para o plantio no Brasil são suscetíveis às diferentes espécies e grupos de linhagens identificados nesse trabalho.

O conhecimento das espécies patogênicas presentes no país, como realizado no presente estudo, pode fornecer subsídios para diversos outros estudos relacionados ao manejo da doença, envolvendo análises da suscetibilidade de cultivares, programas de melhoramento genético, além de estudos epidemiológicos.

Em estudo de comportamento de variedades de batata em relação à sarna, foi verificado que diferentes linhagens de *Streptomyces* causaram diferentes graus de severidade da doença, dependendo da cultivar utilizada (GARCIA, 2008). Assim, é de extrema importância a utilização de diferentes linhagens para avaliar a reação de genótipos

de batata, já que a resistência pode ser alterada em função da variabilidade genética do patógeno. Nesse sentido, a identificação de linhagens que ocorrem nas regiões produtoras do país torna-se imprescindível já que diferentes espécies de *Streptomyces* podem produzir diferentes tipos de sintomas e afetar de forma distinta as cultivares de batata.

Nos programas de melhoramento genético poderão ser desenvolvidas variedades que apresentem resistência ou menor suscetibilidade às principais espécies de *Streptomyces* que ocorrem nas regiões produtoras do país. Ainda, o conhecimento das espécies presentes nas áreas produtoras, associado aos estudos de suscetibilidade de cultivares, também pode permitir a indicação de variedades mais resistentes para plantio em regiões produtoras já contaminadas com a bactéria, representando uma importante ferramenta no controle integrado da doença.

O levantamento de linhagens de *Streptomyces* que ocorrem no Brasil revelou também a possível presença de novas espécies associadas à sarna. Segundo Lindholm e colaboradores (1997), o controle da sarna da batata ainda permanece complexo, principalmente devido à grande diversidade genética das espécies. Assim, o conhecimento da ecologia de espécies locais poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o manejo dessa doença.

CONCLUSÕES

- O isolamento de novas linhagens provenientes de regiões produtoras de batata dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, possibilitou o aumento da representatividade de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna no acervo da Coleção de Culturas IBSBF;
- A caracterização morfológica das linhagens revelou a presença de esporos de coloração cinza, creme, branca, amarela, marrom, verde e laranja com variações nas tonalidades, bem como morfologia de hifas do tipo espiralada (63,5%), flexuosa (26,4%), espiral aberto (7,3%) e espiral em tufo (2,8%);
- Na caracterização patogênica das 178 linhagens avaliadas, 94 (52,8%) apresentaram amplificação dos genes de patogenicidade *necI*, *tomA* e operon *txtAB*, 70 (39,3%) mostraram sinal positivo de amplificação para um ou mais genes e 14 (7,9%) não apresentaram a amplificação de nenhum deles;
- A ausência dos genes *necI*, *tomA* e operon *txtAB* em linhagens de *Streptomyces* patogênicas sugere que outras vias de patogenicidade podem estar envolvidas na relação patógeno-hospedeiro;
- Não foi observada correlação entre a presença da amplificação dos genes de patogenicidade *necI*, *tomA* e operon *txtAB* e o grau de severidade da doença em minitubérculos;
- Os testes em minitubérculos de batata foram imprescindíveis para confirmação da patogenicidade das linhagens que não apresentaram sinal de amplificação dos genes *necI*, *tomA* e operon *txtAB*, indicando que amplificação desses genes não pode ser utilizada como única ferramenta para determinação da patogenicidade de linhagens de *Streptomyces*;
- As análises morfológicas e patogênicas não permitiram a diferenciação de todas as espécies de *Streptomyces*, sendo fundamental a utilização de caracterização molecular nas análises;
- A utilização dos *primers* espécie-específicos ScabI/ScabII e TurgI/TurgII auxiliou no processo de identificação de *Streptomyces* sp., porém não permitiu a distinção de linhagens consideradas genomoespécies;
- A técnica de PCR-RFLP do gene *atpD* mostrou-se uma ferramenta bastante útil para a diferenciação de espécies de *Streptomyces* associadas à sarna da batata; para identificação de linhagens de *Streptomyces* sp. e para a separação das linhagens em grupos e perfis genéticos distintos;

- As análises de multilocus envolvendo os genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*, permitiram elucidar as relações filogenéticas entre as espécies Tipo de *Streptomyces* associadas à sarna; identificar as espécies que atualmente ocorrem no país; além de evidenciar a presença de possíveis novas espécies associadas à sarna da batata;
- A taxonomia polifásica mostrou que das 178 linhagens analisadas, 57 (32%) foram identificadas como pertencentes à *S. scabiei*, 28 linhagens (15,7%) à *S. ipomoeae*, 13 (7,3%) à *S. caviscabies/S. setonii*, 12 (6,72%) semelhantes a *S. europaeiscabiei* e duas linhagens (1,1%) semelhantes a *S. sampsonii* e 66 (37%) apresentaram perfis genéticos distintos e/ou características morfológicas e patogênicas diferentes, podendo representar novas espécies e/ou subespécies de *Streptomyces* em nosso país;
- *S. scabiei* foi a espécie predominante e mais amplamente distribuída no país, tendo sido isolada de todas as regiões produtoras de batata amostradas;
- A espécie *S. sampsonii*, considerada saprófita, apresentou genes de patogenicidade associados com a doença, evidenciando seu potencial patogênico;
- A espécie *S. ipomoeae*, considerada de patogenicidade restrita à batata-doce, foi detectada em diferentes regiões produtoras do país e se revelou também patogênica a batata;
- As cultivares de batata utilizadas para plantio no país mostraram-se suscetíveis às diferentes espécies e aos grupos genéticos de *Streptomyces* encontrados no Brasil, não tendo sido verificada associação entre a cultivar e o agente causal.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 4th ed. Academic Press, San Diego.
- ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 797-814, 2001.
- 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.
- BANG, H. Studies on potato russet scab. I. A characterization of different isolates from northern Sweden. **Academic Agriculture Technicae Olstensis**, v. 29, p. 145-150, 1979.
- BLASZCZAK, W.; CHRZANOWSKA, M.; FORNAL, J.; ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; PALACIOS, M. C.; VACEK, J. Scanning electron microscopic investigation of different types of necroses in potato tubers. **Food Control**, v. 16, p. 747-752, 2005.
- BONDE, M. R.; McINTYRE, G. A. Isolation and biology of a *Streptomyces* sp. causing potato scab in soils below pH 5.0. **American Potato Journal**, v. 45, p. 273-278, 1968.
- BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; ADRIVON, D.; NORMAND, P. *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces reticuliscabiei*: one genomic species, two pathogenic groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2771-2776, 2006.
- BOUCHEK-MECHICHE, K.; GARDAN, L.; NORMAND, P.; JOUAN, B. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 91-99, 2000.
- BUKHALID, R. A.; CHUNG, S. Y.; LORIA, R. *necl*, 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.; LORIA, R. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 7776-7783, 1997.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 738-744, 2002.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, Agronômica Ceres, p. 729-760, 1995.
- CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H.-J.; FREDERIKSEN, W. C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 166-178, 2007.
- COELHO, R. S. B.; PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R. L. R. Doenças da batata-doce. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds). **Manual de Fitopatologia** 3rd ed., Agronômica Ceres, v. 2, 1997.
- 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.
- CULLEN, D. W.; LEES, A. K. Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1082-1094, 2007.
- DOERING-SAAD, C.; KÄMPFER, P.; MANULIS, S.; KRITZMAN, G.; SCHNEIDER, J.; ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J.; SCHREMPF, H.; BARASH, I. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3932-3940, 1992.
- EGAN, S.; WIENER, P.; KALLIFICAS, D.; WELLINGTON, E. M. Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 127-133, 2001.
- EUZÉBY, J. P. LPSN (List of prokaryotic names with standing in nomenclature internet) Disponível em: www.bacterio.cict.fr/index.html. Acesso: 20 de dezembro de 2010.

- FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). The statistics division. Disponível em: www.potato2008.org/en/world/index.html. Acesso: 27 de agosto de 2008.
- FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Strengthening potato value chains: technical and policy options for developing countries. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1710e/i1710e.pdf>. Acesso: 30 de novembro de 2010.
- FAUCHER, E.; OTRYSCO, B.; PARADIS, E.; HODGE, N. C.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Quebec. **Plant Disease**, v. 77, p. 1217-1220, 1993.
- FAUCHER, E.; PARADIS, E.; GOYER, C.; HODGE, N. C.; HOGUE, R.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing deep-pitted scab of potato in Québec, Canada. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 222-225, 1995.
- FAUCHER, E.; SAVARD, T.; BEAULIEU, C. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 14, p. 197-202, 1992.
- FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; MARTINS, M. C. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 650-655, 2003.
- FISCHER, I. H.; MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. A.; KIMATI, H. Efeito de fertilizantes e fungicidas na incidência da sarna da batata. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 3, p. 263-266, 2005.
- FISCHER, I. H.; TEIXEIRA, A. P. M.; TOFFANO, L. GARCIA, E. O. MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. A.; KIMATI, H. Reação de cultivares de batata a *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum profunda. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 219-222, 2009.
- FLORES-GONZÁLEZ, R.; VELASCO, I.; MONTES, F. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. **Plant Pathology**, v. 57, p. 162-169, 2008.
- FRY, B. A.; LORIA, R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 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 taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*): aspectos bioquímicos e ultraestruturais**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba. 2008. 92p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-21082008-153819/pt-br.php>

- GOUWS, R. **Etiology and integrated control of common scab on seed potatoes in South Africa.** MSc Thesis, Univ. Pretoria, África do Sul, 118 p., 2006.
- GOYER, C.; BEAULIEU, C. Host range of streptomycete strains causing common scab. **Plant Disease**, v. 81, p. 901-904, 1997.
- GOYER, C.; FAUCHER, E.; BEAULIEU, C. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, p. 635-639, 1996.
- GUO, Y.; ZHENG, W.; RONG, X.; HUANG, Y. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 149-159, 2008.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARRISON, M. D. Potato russet scab, its cause and factors affecting its development. **American Potato Journal**, v. 39, p. 368-387, 1962.
- HATANO, K.; NISHII, T.; KASAI, H. Taxonomic re-evaluation of whorl-formins *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Kato and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1519-1529, 2003.
- HEALY, F. G.; LAMBERT, D. H. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 479-482, 1991.
- HEALY, F. G., WACH, M., KRASNOFF, S. B., GIBSON, D. M.; LORIA, R. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. **Molecular Microbiology**, v. 38, p. 794-804, 2000.
- HOOKE, W. J. Common Scab. In: Compendium of Potato Diseases. W. J. Hooker ed. **American Phytopathological Society**, St. Paul MN. 125 p, p. 33-34, 1981.
- HORINOCHI, S. A microbial hormone, a-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 2045-2057, 2002.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Fundação Instituto Brasileiro. de Geografia e Estatística**, v. 23, n. 11, p. 1-80, 2010. Disponível em:

- JADOSKI, S. M.; MAGGI, A. S. L.; BRUNETTA, L.; WAZNE, R. Sucessão de culturas na fitossanidade e produtividade da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 1, p. 161-166, 2009.
- 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.
- KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. **Practical Streptomyces Genetics**. Hopwood, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England: John Innes Foundation, 2004.
- KIM, B. J.; KIM, C. J.; CHUN, J.; KOH, Y. H.; LEE, S. H.; HYUN, J. W.; CHA, C. Y.; KOOK, Y. H. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 593-598, 2004.
- 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.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.
- KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; CALHOUN, L. A.; RISTAINO, J. B. Isolation and characterization of thaxtomin-type phytotoxins associated with *Streptomyces ipomoeae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1791-1794, 1994.
- KING, R. R.; LAWRENCE, C. H.; CLARK, M. C.; CALHOUN, L. A. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 13, p. 849-850, 1989.
- 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*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 768-776, 1998.

- KRAINSKY, A. Die Aktinomyceten und ihren Bedeutung in der Natur. **Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II**, v. 41, p. 649-688, 1914 (in German).
- KREUZE, J. F.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; VALKONEN, J. P. T. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *nec1* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. **Phytopathology**, v. 89, p. 462-469, 1999.
- LAMBERT, D. H. Field report of additional hosts for the acid scab pathogen, *Streptomyces acidiscabies*. **Plant Disease**, v. 75, p. 750, 1991.
- LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 387-392, 1989.
- LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 393-396, 1989.
- LAPWOOD, D. H. The relative importance of weather, soil and seed-borne inoculums in determining of common scab (*Streptomyces scabies*) in potato crops. **Plant Pathology**, v. 21, p. 105-108, 1972.
- LAWRENCE, C. H.; CLARK, M. C.; King, R. R. Introduction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. **Phytopathology**, v. 80, p. 606-608, 1990.
- LEHTONEN, M. J.; RANTALA, H.; KREUZE, J. F. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. **Plant Pathology**, v. 53, p. 280-287, 2004.
- 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. **Molecular Microbiology**, v. 10, p. 923-933, 1993.
- LINDHOLM, P.; KORTEMA, H.; KOKKOLA, M.; HAAHTELA, K.; SALKINOJA-SALONEN, M.; VALKONEN, J. P. T. *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. **Plant Disease**, v. 81, p. 1317-1322, 1997.
- LIU, Z.; SHI, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z. O.; LU, Z.; LI, W.; HUANG, Y.; RODRIGUEZ, C.; GOODFELLOW, M. Classification of *Streptomyces griseus* (Krinsky 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.; 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.
- 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*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 469-487, 2006.
- LUTMAN, B. F. The pathological anatomy of potato scab. **Phytopathology**, v. 3, p. 255-265, 1914.
- MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.
- MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.
- MANZER, F. E.; McINTYRE, G. A.; MERRIAM, D. C. A new potato scab problem in Maine. **Maine Life Sciences and Agriculture Experiment Station Miscellaneous Report**, v. 85, p. 1-24, 1977.
- MANZER, F. E.; STORCH, R. H.; SEWELL, G. H. Evidence for a relationship between certain soil arthropods and acid scab development. **American Potato Journal**, v. 61, p. 741-746, 1984.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa nº 12, de 10 de Junho de 2005. Disponível em: www.fiscolex.com.br/doc_362873_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_12_10_JUNHO_2005.aspx. Acesso: 15 de Janeiro de 2011.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Projeções do Agronegócio Brasil 2009/10 a 2019/20. Disponível em: <http://www.promoalgo.com.br/documentos/Projecoes%20-%20Mapa%20-%202009.10%20a%202019.20.pdf>. Acesso: 30 de novembro de 2010.

- MAYFIELD, C. I.; WILLIAMS, S. T.; RUDDICK, S. M.; HATFIELD, H. L. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. iV. Observations on the form and growth of *Streptomyces* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 4, p. 79-91, 1972.
- MILLARD, W. A.; BURR, S. A study of twenty-four strains of *Actinomyces* and their relation to types of common scab of potato. **Annals of Applied Biology**, v. 13, p. 580-644, 1926.
- MIRANDA FILHO, H. S. “Sarna Comum” nova ameaça de uma velha doença. **Batata Show**, v. 1, 2001.
- MIYAJIMA, K.; TANAKA, F.; TAKEUCHI, T.; KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 495-502, 1998.
- MIZUNO, N.; YOSHIDA, H.; TADANO, T. Efficacy of Single Application Ammonium Sulfate in Suppressing Potato Common Scab. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 611-616, 2000.
- MUN, H.-S.; OH, E.-J.; KIM, H.-J.; LEE, K.-H.; KOH, Y.-H.; KIM, C.-J.; HYUN, J.-W.; KIM, B.-J. Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 401-407, 2007.
- ONIKI, M.; SUZUI, T.; ARAKI, T.; SONODA, R.-I.; CHIBA, T.; TAKEDA, T. Causal agent of russet scab of potato. **Bulletin of the National Institute of Agro-Environmental Sciences**, v. 2, p. 56-59, 1986.
- PARADIS, E.; GOYER, C.; HODGE, N. C.; HOGUE, R.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 561-564, 1994.
- PARK, D. H.; KIM, J. S.; KWON, S. W.; WILSON, C.; YU, Y. M.; HUR, J. H.; LIM, C. K. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2049-2054, 2003.
- PARK, D. H.; YU, Y. M.; KIM, J. S.; CHO, J. M.; HUR, J. H.; LIM, C. K. Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea. **Plant Disease**, v. 87, p. 1290-1296, 2003.
- PARK, H-S; KILBANE II, J. J. Rapid detection and high-resolution discrimination of the genus *Streptomyces* based on 16S-23S rDNA spacer region and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 289-297, 2006.

- PERSON, L. H.; MARTIN W. J. Soil rot of sweet potatoes in Louisiana. **Phytopathology**, v. 30, p. 913-926, 1940.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J., Rapid extration of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.
- QU, X.; WANNER, L. A.; CHRIST, B. J. Using the *txtAB*.operon to quantify pathogenic *Streptomyces* in potato tubers and soil. **Phytopathology**, v. 98, p. 405-412, 2008.
- RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L.; SHIMOYAMA, N. Y. A sarna da batata causada por *Streptomyces* spp. **Publicação Técnica ABBA**, 31 p., 2008.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SALLES, L. A. Mercado mundial: a batata (*Solanum tuberosum*) é a quarta cultura em importância agrícola no mundo, seu mercado está em expansão. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, n. 10, 2001. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=386>. Acesso: 17 de setembro de 2010.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edition. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, 2001.
- SCHOLTE, K.; LABRUYÈRE, R. E. Netted scab: a new name for an old disease in Europe. **Potato Research**, v. 28, p. 443-448, 1985.
- SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 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.
- SOLTANI, N.; CONN, K. L.; ABBASI, P. A.; LAZAROVITS, G. Reduction of potato scab and verticillium wilt with ammonium lignosulfonate soil amendment in four Ontario potato fields. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 332-339, 2002.
- SONG, J.; LEE, S.-C.; KANG, J.-W.; BAEK, H.-J.; SUH, J.-W. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 203-209, 2004.
- SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 312-316, 1999.

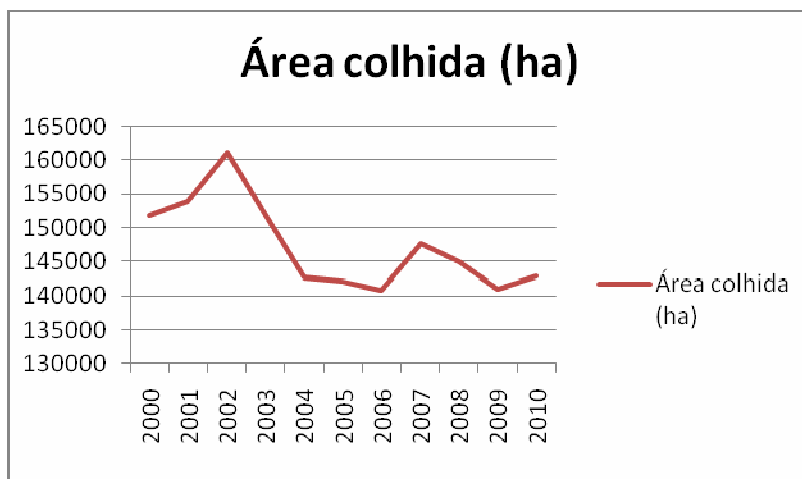
- ST-ONGE, R.; GOYER, C.; COFFIN, R.; FILION, M. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 474-484, 2008.
- STURZ, A. V.; RYAN, D. A. J.; COFFIN, A. D.; MATHERSON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; KIMPINSKI, J.; CHRISTIE, B. R. Stimulating disease suppression in soils: sulphate fertilizers can increase biodiversity and antibiosis ability of root zone bacteria against *Streptomyces scabies*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 343-352, 2004.
- TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 476-479, 1996.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J. NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TANAKA, F.; TAKEUCHI, T.; TANII, A.; MIYAJIMA, K.; ABE, H.; KUNINAGA, S. A causal pathogen of scab on potato, *Streptomyces turgidiscabies* n. sp. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 61, p. 253-254, 1995 (abstract).
- THWAITES, R.; WALE, S. J.; NELSON, D.; MUNDAY, D.; ELPHINSTONE, J. G. *Streptomyces turgidiscabies* and *S. acidiscabies*: two new causal agents of common scab of potato (*Solanum tuberosum*) in the UK. **Plant Pathology**, v. 59, p. 804, 2010.
- TOTH, L., MAEDA, M., TANAKA, F.; KOBAYASHI, K. Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 48, p. 575-585, 2001.
- WAKSMAN, S. A.; HENRICI, A. T. Family II. Actinomycetaceae Buchanan and family *Streptomycetaceae* Wakesman and Henrici. In: BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., HITCHENS, A. P. (Eds.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 6th ed. The Williams & Wilks Co., Baltimore, p. 892-980, 1948.
- 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.
- WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ANDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H.; SAKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 1743-1813, 1983.

- WILSON, C. R.; RANSON, L. M.; PEMBERTON, B. M. The relative importance of seed-borne inoculums to common scab disease of potato and the efficacy of seed tuber and soil treatment for disease control. **Journal of Phytopathology**, v. 147, p. 13-18, 1999.
- ZHAO, W. Q.; YU, X. M.; LIU, D. Q. First report of *Streptomyces acidiscabies* causing potato scab in China. **Plant Pathology**, v. 59, p. 405, 2010.

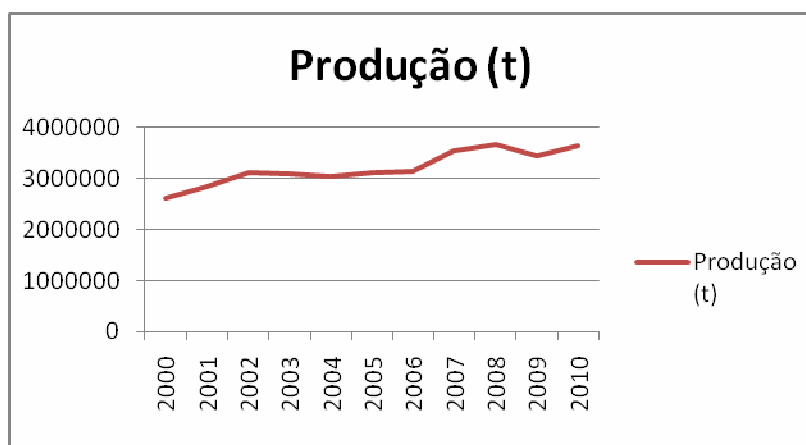
Anexo 1

Gráficos de produção de batata no Brasil

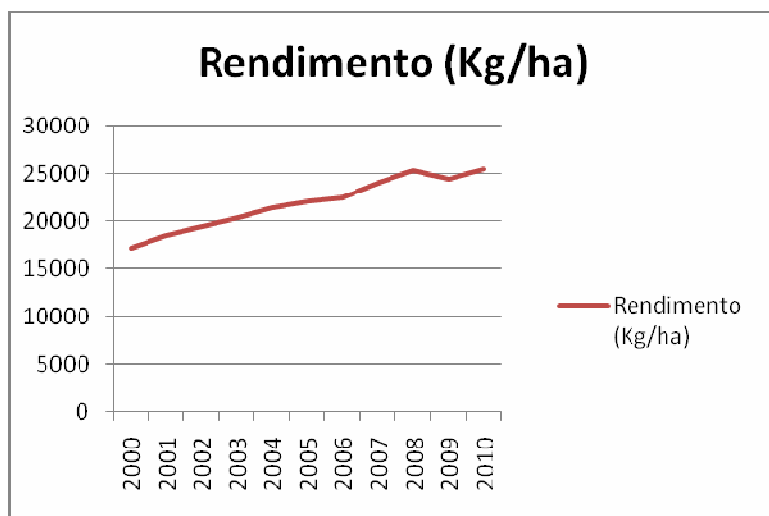
Ano	Área colhida (ha)
2000	151731
2001	153984
2002	161124
2003	151850
2004	142704
2005	142219
2006	140826
2007	147719
2008	144916
2009	140987
2010	142978



Ano	Produção (t)
2000	2606932
2001	2848664
2002	3126411
2003	3089016
2004	3047083
2005	3130174
2006	3151721
2007	3550511
2008	3676938
2009	3434587
2010	3643459



Ano	Rendimento (Kg/ha)
2000	17181
2001	18500
2002	19404
2003	20343
2004	21352
2005	22010
2006	22380
2007	24036
2008	25373
2009	24361
2010	25483



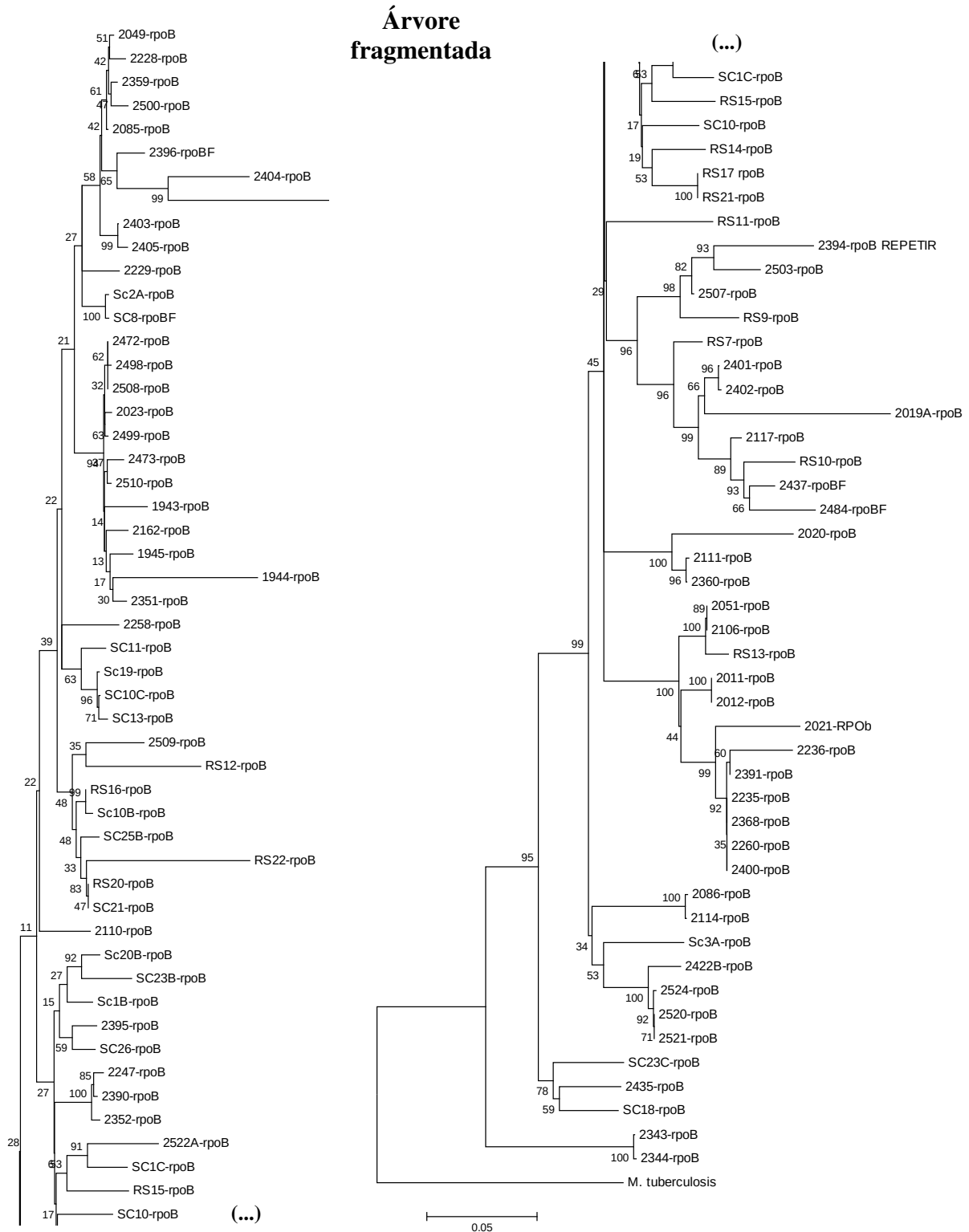
Anexo 2

Matriz de similaridade das linhagens Tipo de *Streptomyces* na análise de multilocus (genes *atpD*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* e *trpB*)

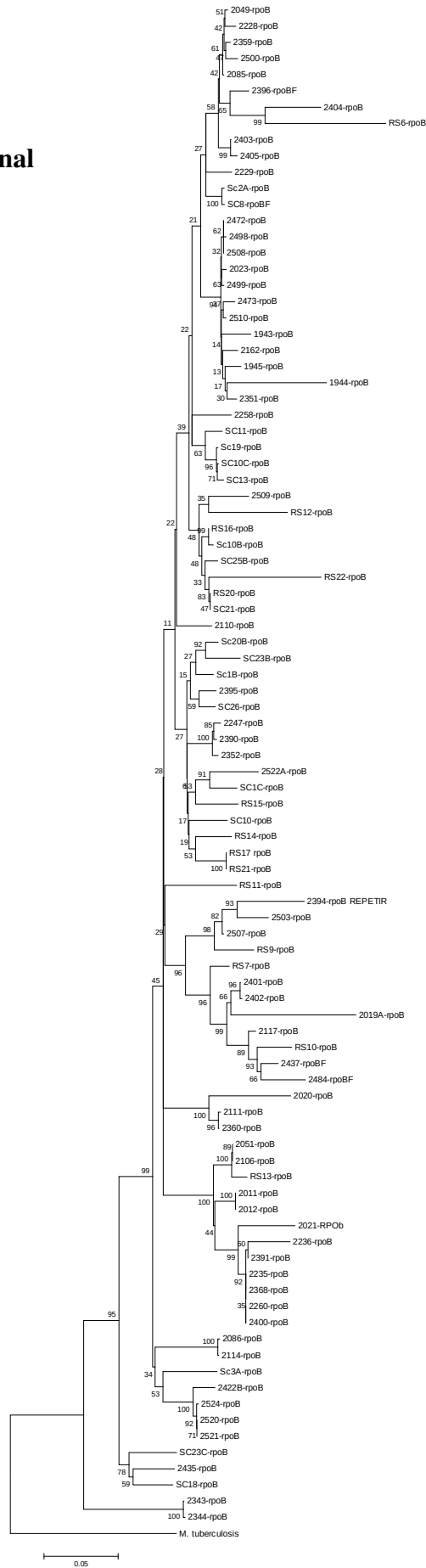
Espécie	IBSBF	Porcentagem de similaridade com as diferentes linhagens Tipo de <i>Streptomyces</i>											
		2049	2023	2085	2110	2086	2114	2051	2106	2011	2012	2111	2117
<i>S. scabiei</i>	2049												
<i>S. europaeiscabiei</i>	2023	94,4											
<i>S. stelliscabiei</i>	2085	97,2	95										
<i>S. acidiscabies</i>	2110	92	92	92,2									
<i>S. reticuliscabiei</i>	2086	91,2	92,9	91,4	90,3								
<i>S. turgidiscabies</i>	2114	91,2	93	91,5	90,4	99,6							
<i>S. caviscabies</i>	2051	87,9	88,1	88	88,3	87,7	87,9						
<i>S. setonii</i>	2106	87,9	88	87,8	88,1	87,7	87,7	99,3					
<i>S. luridiscabiei</i>	2011	87,9	88,3	87,7	88,8	88	88,1	96,9	96,6				
<i>S. puniscabiei</i>	2012	87,7	88,1	87,6	88,6	87,8	87,9	96,7	96,5	99,7			
<i>S. samponii</i>	2111	88,6	88,3	88,8	89	87,8	88	88,5	88,4	89,1	88,9		
<i>S. ipomoeae</i>	2117	87	87,1	87,1	87,1	87,3	87,3	92,7	92,6	92,7	92,6	87,6	
<i>M. tuberculosis</i>		66,8	65,9	66,2	66,2	65,8	65,7	67,4	67,3	67,5	67,4	67,3	67,6

Anexo 3

Árvore filogenética de sequências do gene *rpoB* (*Neighbor joining* – Kimura 2)

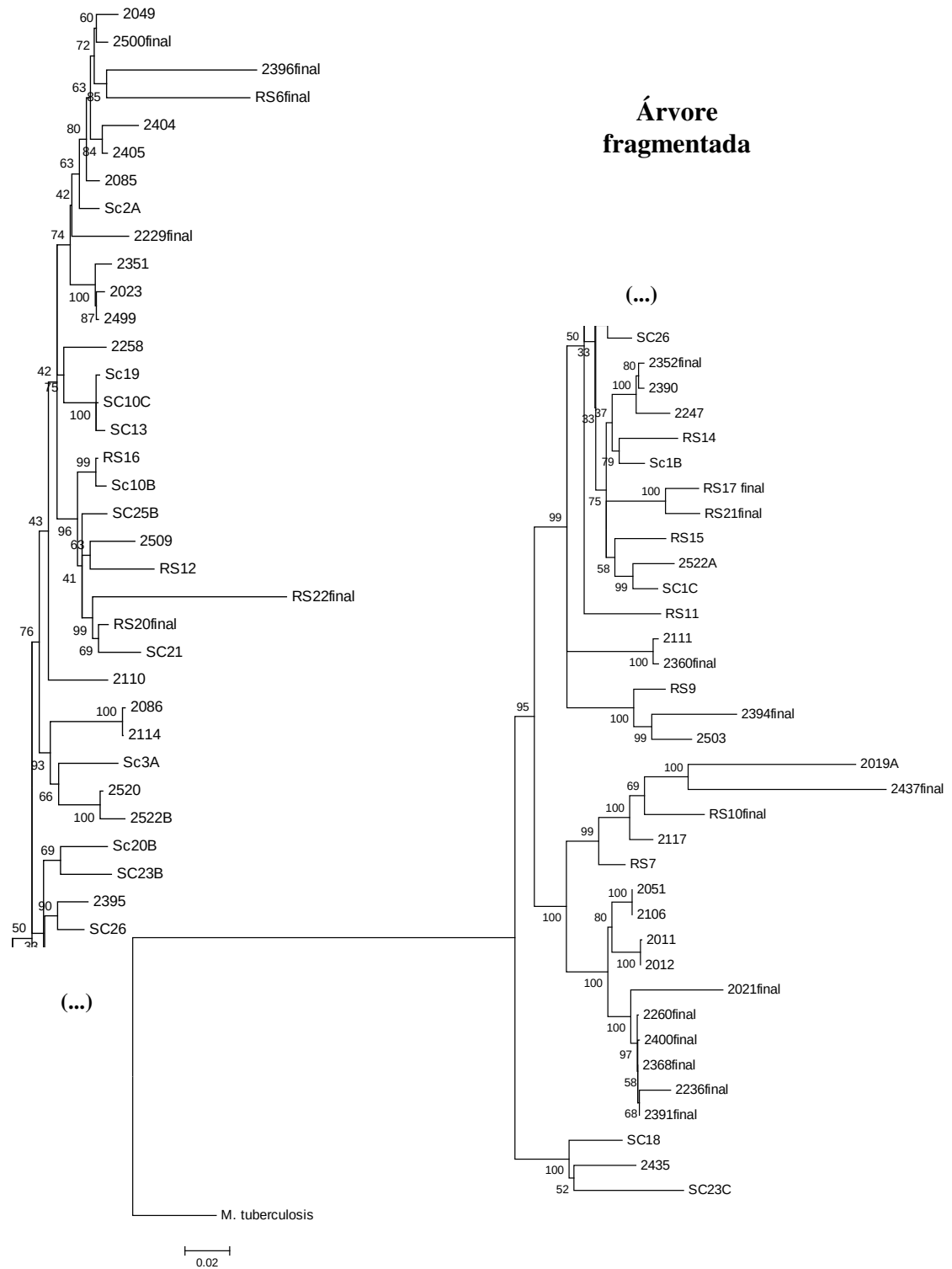


Árvore original



Anexo 4

Árvore filogenética de sequências concatenadas dos genes *rpoB* e *atpD* (*Neighbor joining* – Kimura 2)

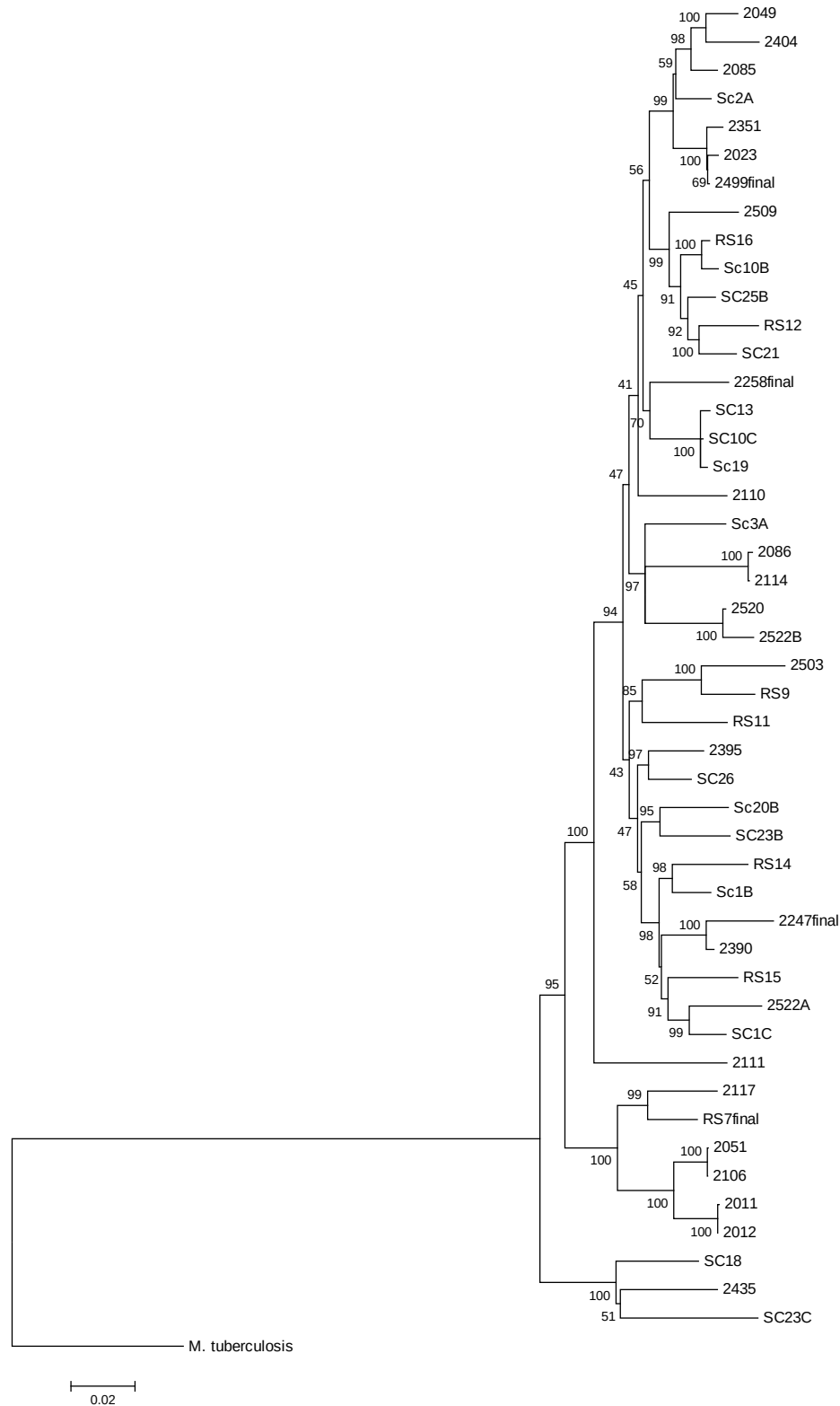


Árvore original



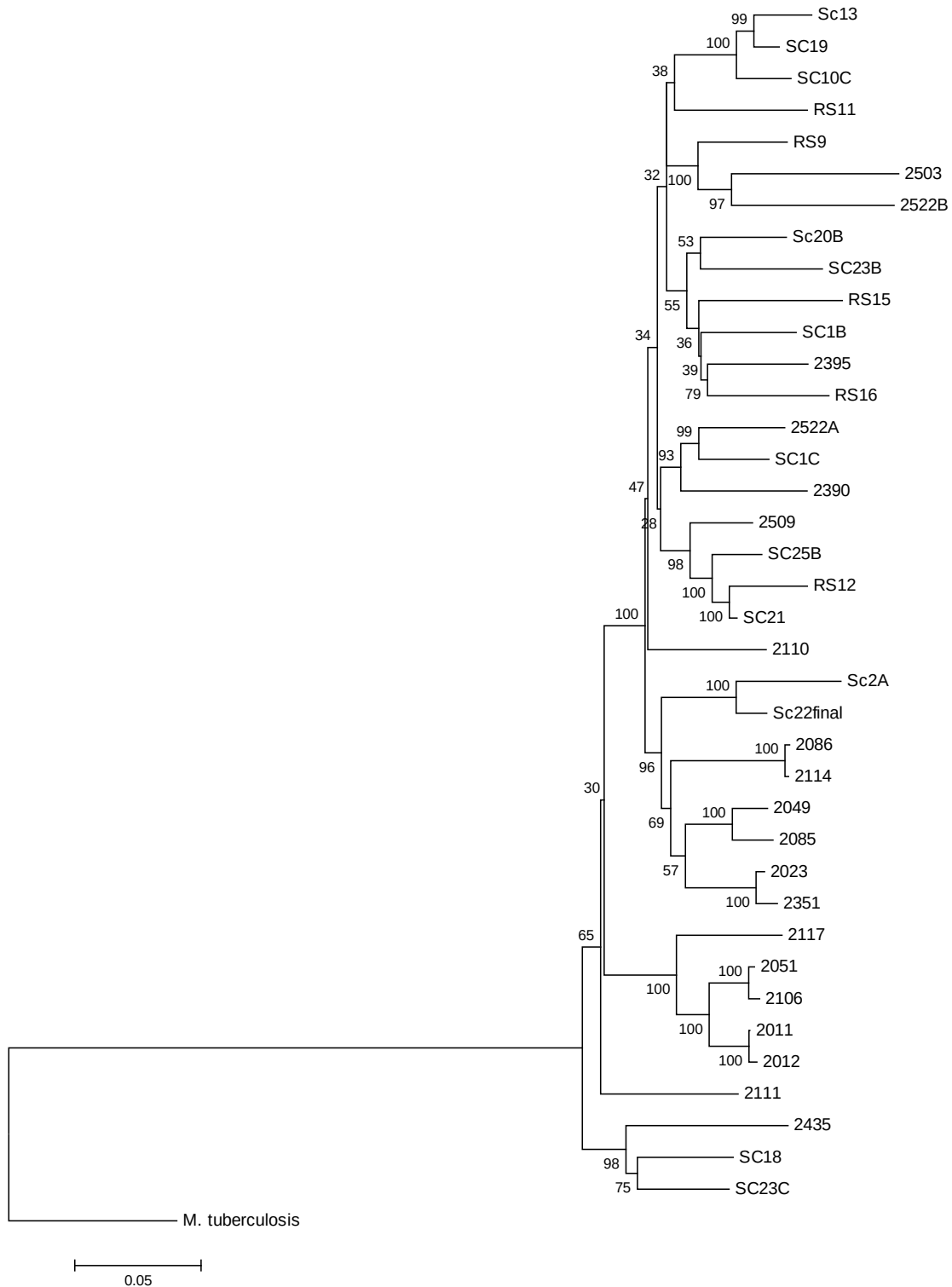
Anexo 5

Árvore filogenética de sequências concatenadas dos genes *rpoB*, *atpD* e *recA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



Anexo 6

Árvore filogenética de sequências concatenadas dos genes *recA*, *trpB* e *gyrB* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



Anexo 7

Matriz de similaridade das linhagens na análise do gene *rpoB*

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																															
IBSBF	20 49	20 23	20 85	21 10	20 86	21 14	20 51	21 06	20 11	20 12	21 11	21 17	19 43	19 44	19 45	20 19	20 20	20 21	21 62	22 28	22 29	22 35	22 36	22 47	22 58	22 60	23 43	23 44	23 51	23 52	23 59	23 60	23 68	23 90	23 91	23 94	23 95	23 96	24 00	24 01	24 02	24 03	24 04	24 05	24 35			
2023	96, 4																																															
2085	99, 4	96, 7																																														
2110	94, 7	94, 4	94, 7																																													
2086	90, 1	90, 4	90, 4	90, 4																																												
2114	90, 1	90, 4	90, 4	90, 4	99, 8																																											
2051	90, 6	91, 1	90, 6	91, 8	90, 1	90, 1																																										
2106	90, 6	91, 1	90, 6	91, 8	90, 1	90, 1	10 0																																									
2011	90, 4	91, 5	90, 4	91, 3	90, 8	91	97, 5	97, 5																																								
2012	90, 4	91, 5	90, 4	91, 3	90, 8	91	97, 5	97, 5	10 0																																							
2111	92, 3	91, 7	92, 7	93, 2	90, 6	90, 8	90, 3	90, 3	91	91																																						
2117	90, 1	89, 9	90, 4	91, 3	90, 1	90, 3	91	91	90, 4	90, 4	89, 4																																					
1943	94, 4	97, 3	94, 7	92, 7	89, 2	89, 2	89, 9	89, 9	90, 3	90, 3	90, 4	87, 7																																				
1944	89, 2	92, 5	89, 6	87, 2	84, 2	84, 2	84, 2	84, 4	84, 4	84, 4	84, 8	82, 3	91, 5																																			
1945	95, 2	98, 3	95, 5	93, 2	89, 5	89, 5	89, 9	89, 9	90, 3	90, 3	90, 4	88, 7	96, 8	92, 2																																		
2019	82, 7	82, 6	83, 4	83, 6	83, 4	83, 2	83, 8	83, 8	83, 2	83, 2	82, 3	88, 1	82, 5	77	83																																	
2020	87	87	87, 4	88, 7	86, 1	86, 1	85, 9	85, 9	86, 1	86, 1	93, 9	83, 8	86, 5	82, 3	86, 1	79, 7																																
2021	85, 7	86, 8	85, 7	87, 9	85, 5	85, 7	92, 7	92, 7	93, 4	93, 4	88, 1	85, 7	85, 5	80, 9	85, 9	80, 7	84, 4																															
2162	95, 4	98, 4	95, 7	93, 4	90, 2	90, 2	90, 8	90, 9	90, 3	91, 3	91, 3	91, 3	88, 7	96, 7	92, 5	97, 6	82, 6	87	86, 4																													
2228	99, 1	95, 7	99, 1	94	89, 4	89, 4	89, 9	89, 9	89, 7	89, 7	91, 7	89, 7	93, 7	89, 2	94, 5	82, 8	86, 6	85, 3	94, 7																													
2229	96, 7	96, 2	97	94	90, 6	90, 6	90, 8	90, 8	90, 3	90, 3	90, 3	90, 6	94	89, 2	95	83, 4	85, 1	86, 6	95, 2	96, 3																												
2235	89, 6	90, 3	89, 6	91, 3	88, 7	88, 8	96, 5	96, 5	96, 5	96, 5	91, 1	89, 2	88, 8	83, 2	89	82, 5	87	95, 7	89, 9	88, 8	90, 1																											
2236	86, 6	87, 6	86, 6	88, 3	85, 7	85, 9	93, 5	93, 5	93, 4	93, 4	88, 1	86, 9	85, 1	80, 1	86, 3	79, 3	83, 8	92, 5	87	85, 9	87, 2	97																										
2247	93, 7	94	94	93, 5	92	92	91, 5	91, 5	90, 4	90, 4	92, 9	87, 9	92, 2	87, 6	92, 9	81, 3	88, 1	87	93, 7	93, 4	90, 6	87, 7																										
2258	94, 2	95, 5	94, 4	93, 4	90, 4	90, 4	91, 8	91, 3	91, 3	91, 3	89, 9	89	93, 5	89	94, 5	81, 7	85, 9	86, 8	94, 5	93, 5	94, 6	90, 6	87, 8	95, 2																								
2260	89, 6	90, 3	89, 3	91, 7	88, 8	88, 5	96, 5	96, 5	96, 5	96, 5	91, 1	89, 2	88, 8	83, 2	89	82, 5	87	95, 7	89, 9	88, 1	90, 0	10 0	97	90, 6	90, 6																							
2343	83, 4	82, 1	83, 8	85, 5	85, 1	85, 1	83, 8	83, 8	83, 6	83, 6	84	83, 8	80, 5	75, 7	80, 5	75, 5	79, 1	78, 8	80, 9	82, 7	83, 2	82, 4	79, 2	83, 6	82, 6	82, 4																						
2344	83, 4	82, 1	83, 8	85, 5	84, 9	84, 8	83, 8	83, 8	83, 6	83, 6	83, 8	83, 8	85, 5	75, 7	75, 5	78, 5	78, 9	78, 8	80, 9	82, 7	83, 2	82, 4	79, 2	83, 6	82, 4	82, 4																						
2351	95, 5	98, 6	95, 9	93, 5	90, 1	90, 1	90, 3	90, 3	90, 6	90, 6	90, 8	89, 2	92, 5	92, 7	98, 1	83, 2	86, 8	86, 6	97, 6	95, 2	95, 4	89, 4	86, 5	93, 2	94, 9	81, 3	81, 3																					

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																															
IBSBF	20 49	20 23	20 85	21 10	20 86	21 14	20 51	21 06	20 11	20 12	21 11	21 17	19 43	19 44	19 45	20 19	20 20	20 21	21 62	22 28	22 29	22 35	22 36	22 47	22 58	22 60	23 43	23 44	23 51	23 52	23 59	23 60	23 68	23 90	23 91	23 94	23 95	23 96	24 00	24 01	24 02	24 03	24 04	24 05	24 35			
2352	94	94	94	93	92	92	91	91	90	90	92	88	92	87	93	81	88	87	94	93	93	90	87	97	97	95	90	83	83	93	93																	
2359	99	96	99	94	89	89	90	90	89	89	92	89	94	89	95	82	86	85	95	98	96	89	86	93	94	89	83	83	95	93	9																	
2360	92	91	92	93	90	90	90	90	90	90	99	89	90	85	90	82	93	87	91	91	90	91	87	93	90	91	84	83	91	93	92	3																
2368	89	90	89	91	88	88	96	96	96	96	91	89	88	83	89	82	87	95	89	88	90	10	97	90	90	10	82	82	89	90	89	91																
2390	94	94	94	93	92	92	91	91	90	90	93	88	92	87	93	81	88	87	94	93	93	91	88	99	95	91	83	83	93	99	93	9	93	91														
2391	89	90	89	91	88	88	96	96	96	96	91	89	88	83	88	82	86	95	89	88	89	99	97	90	90	99	82	82	89	90	88	90	99	90	88	90	88	90	88	90	88	90	88	90	88	90	88	
2394	87	86	87	87	83	83	85	85	84	84	85	86	84	78	85	78	80	80	85	87	86	84	82	86	87	86	84	78	78	85	86	87	86	84	86	84	86	84	86	84	86	84	86	84	86	84		
2395	93	93	93	95	92	92	91	91	91	91	92	89	91	86	92	81	87	87	92	93	93	90	87	94	93	90	84	84	93	94	93	92	90	95	90	87	9											
2396	97	94	97	92	89	89	88	88	88	88	91	88	92	87	93	83	87	84	93	97	94	88	85	92	93	88	82	82	93	92	97	91	88	92	88	85	91											
2400	89	90	89	91	88	88	96	96	96	96	91	89	88	83	89	82	87	95	89	88	90	10	97	90	90	10	82	82	89	90	89	91	10	91	99	84	90	88										
2401	91	91	92	91	90	90	91	91	91	91	90	89	89	84	90	85	86	90	91	92	89	87	89	87	89	90	83	83	90	89	91	90	89	89	89	87	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	
2402	91	91	91	91	90	90	91	91	91	91	90	89	89	83	90	84	86	90	90	92	89	86	88	88	89	89	83	83	90	89	91	90	89	89	89	87	89	89	99									
2403	98	96	98	93	90	90	90	90	90	90	91	89	94	89	95	83	86	85	95	97	97	89	86	93	94	89	83	83	96	93	98	91	89	93	89	86	92	96	89	91	91							
2404	91	90	92	87	83	83	84	84	83	83	85	82	89	84	90	79	81	81	89	91	91	83	80	86	87	83	76	76	91	86	92	85	83	86	83	80	86	92	83	84	84	93						
2405	97	96	98	92	89	89	90	90	89	89	91	89	95	89	95	83	86	85	95	97	96	89	86	92	93	89	82	82	95	92	97	91	89	92	89	86	92	96	89	91	91	99	93					
2435	89	88	89	89	90	90	87	87	87	89	89	86	81	86	81	83	82	87	89	89	87	84	88	87	87	88	87	87	89	89	89	87	88	87	83	90	88	87	89	90	88	82	88					
2437	88	88	88	89	89	89	89	89	88	88	87	97	86	81	87	88	82	84	87	87	88	87	84	86	87	81	81	87	86	88	87	87	86	87	87	86	87	87	95	95	87	81	87	87	87	87		
2472	96	99	96	94	90	90	91	91	91	91	91	90	97	92	98	82	87	87	98	95	96	90	87	94	95	90	82	82	98	94	96	92	90	94	90	86	93	94	90	91	91	97	90	96	88			
2473	95	98	96	93	89	89	90	90	90	90	91	89	2	97	92	98	82	87	86	97	95	95	89	86	93	95	89	81	81	98	93	95	91	89	93	89	85	92	93	89	90	90	96	90	87			
2484	86	86	87	87	87	87	87	87	87	87	86	95	85	80	86	87	81	82	86	86	86	85	82	84	85	85	80	80	86	84	86	85	84	85	85	83	85	86	85	93	93	86	80	85	85			
2498	96	99	96	94	90	90	91	91	91	91	91	89	97	92	98	82	87	98	95	96	90	87	94	95	90	82	82	98	94	96	91	90	94	90	86	93	94	90	91	91	96	90	96	88				
2499	96	99	96	94	90	90	91	91	91	91	91	90	97	92	98	82	87	98	96	96	90	87	94	95	90	82	82	98	94	96	92	90	94	90	86	93	94	90	91	91	97	90	96	88				
2500	98	96	99	94	89	89	89	89	89	89	91	89	93	88	94	82	86	84	94	98	96	88	85	93	88	85	83	94	93	94	93	98	91	88	93	88	92	97	88	91	90	97	91	97	88			
2503	89	88	89	89	86	86	88	88	87	87	87	89	87	81	87	81	83	84	87	89	86	83	88	89	86	88	81	81	87	89	89	88	86	89	86	93	89	88	86	90	90	89	83	89	86			
2507	93	91	93	92	89	89	91	91	91	91	91	93	89	84	90	85	86	90	92	92	92	87	87	91	92	89	84	84	91	92	92	91	91	92	89	92	91	89	92	91	93	93	92	85	91	89		
2508	96	99	96	94	90	90	91	91	91	91	91	90	97	92	98	82	87	87	98	95	96	90	87	94	95	90	82	82	98	94	96	92	90	94	90	86	93	94	90	91	91	97	90	96	88			
2509	93	94	93	92	88	88	90	90	90	90	89	89	91	89	93	80	87	86	92	92	92	89	85	91	92	89	82	81	91	94	92	93	91	92	88	84	92	92	89	91	87	93	93	86	86			
2510	96	99	96	94	90	90	91	91	91	91	91	91	97	92	98	82	86	98	95	96	90	87	94	95	90	82	82	98	94	96	91	90	94	90	86	93	94	90	91	91	96	90	96	88				

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp																																																						
IBS BF	24 37	24 72	24 73	24 84	24 98	24 99	25 00	25 03	25 07	25 08	25 09	25 10	25 20	25 21	29 70	25 22	25 24	R S 6	R S 7	R S 9	RS 10	RS 11	RS 12	RS 13	RS 14	RS 15	RS 17	RS 16	RS 20	RS 21	RS 22	SC 3A	SC 10	SC 1B	SC 1C	SC 2A	S C 8	SC 10B	SC 10C	SC 11	SC 13	SC 18	SC 19	SC 20B	SC 21	SC 23B	SC 23C	SC 25B	SC 26						
Sc2 0B	87 ,9	93 ,9	93	84 ,8	93 ,7	93 ,9	92 ,7	89 ,9	93	93 ,9	92 ,7	93 ,7	92 ,3	92 ,3	91 ,7	91 ,1	92 ,2	92 ,9	91 ,1	91 ,3	86, 3	92, 5	89, 5	90, 8	94, 9	94, 4	95, 7	95, 5	95, 2	95, 7	87	90, 8	95, 4	97, 3	93, 7	93, 7	93 ,7	95, 2	94, 9	95, 9	94, 7	91, 1	94, 7												
SC2 1	88 ,5	97 ,2	96 ,7	86 ,8	96 ,8	97 ,9	95 ,5	89 ,7	92 ,9	97	95 ,9	96 ,8	93 ,4	93 ,4	90 ,8	92 ,3	93 ,4	84 ,8	92 ,5	90 ,6	87, 4	91, 8	94, 4	91, 7	94, 2	92, 7	93, 9	99, 1	10 0	93, 9	92, 3	92, 2	93, 5	95, 9	92, 9	95, 9	95, 9	98, 8	95, 9	94, 9	95, 4	89, 9	96	95, 2											
SC2 3B	85 ,9	92 ,8	91 ,2	83 ,7	92 ,7	92 ,5	88 ,8	91 ,7	92 ,9	91	92 ,5	90 ,8	90 ,8	90 ,3	90 ,6	90 ,6	81 ,7	90 ,1	89 ,4	84, 6	91, 7	88, 3	88, 7	92, 9	92, 9	93, 7	93, 5	93, 7	86, 4	89, 7	93, 1	89, 4	93, 9	95, 9	92, 2	93	93 ,5	93, 2	93, 7	93 ,8	88, 8	93	96, 8	93, 5											
SC2 3C	85 ,5	87 ,8	86 ,8	83 ,4	87 ,6	87 ,8	88 ,7	85 ,3	88 ,5	87 ,8	86 ,8	87 ,6	92	92	88 ,3	90 ,3	92	78 ,2	88 ,1	86 ,8	84, 6	89	83, 4	87, 6	90, 4	89, 4	90, 3	89, 9	89, 2	90, 3	82, 1	89, 5	89, 9	90, 3	89, 9	88, 8	88 ,8	89, 6	89	89, 7	88, 8	94	89, 2	89, 7	89, 2	87, 7									
SC2 5B	87 ,9	96 ,4	95 ,5	86 ,3	96 ,2	96 ,4	94 ,9	89 ,2	92 ,3	96 ,4	94 ,9	96 ,3	93 ,2	93 ,2	90 ,1	92 ,2	93 ,2	84 ,6	92 ,1	90 ,1	87	91, 8	93, 7	91	94	92	93, 9	98, 6	98, 9	93, 9	91, 1	92, 5	92, 7	94, 7	92, 3	95, 4	95 ,4	98, 3	95, 5	94, 5	95	90, 1	95, 7	94, 4	98, 9	92, 7	89, 6								
SC2 6	87 ,4	93 ,7	92 ,9	85 ,2	93 ,5	93 ,7	92 ,5	89 ,7	92 ,9	93 ,7	92 ,5	93 ,5	93	93	92 ,7	91 ,5	93	82 ,5	91 ,7	90 ,6	86, 7	93, 7	89, 4	90, 6	94, 7	94, 9	95, 5	95, 9	95, 2	95, 5	87	92, 5	95, 4	97, 8	95	93, 9	93 ,9	95, 5	94, 9	95, 7	94, 7	91, 8	94, 7	97	95, 2	95, 4	91, 1	95							
G. exte rno	72 ,7	73 ,1	72 ,4	69 ,9	72 ,9	73 ,1	74 ,2	72 ,7	75 ,9	73 ,1	72 ,4	72 ,9	74 ,9	74 ,9	75 ,1	74	75 ,1	63 ,2	74 ,4	72 ,9	71, 8	73, 8	69	74, 6	74, 4	74, 9	75, 5	75, 5	74, 9	75, 5	67, 3	74, 6	75, 1	75, 3	75, 3	74, 4	74 ,2	75, 7	73, 8	74, 2	74	76, 1	74	75, 5	74, 9	74	76, 4	74, 2	75, 3						

Anexo 8

**Matriz de similaridade das linhagens na análise dos genes *rpoB*, *recA*, *atpD*,
trpB e *gyrB***

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																				
Linhagem	204 9	202 3	208 5	211 0	208 6	211 4	205 1	210 6	201 1	201 2	211 1	211 7	235 1	239 0	239 5	243 5	250 3	250 9	297 0	252 2	296 8	280 4	280 6	RS1 5	280 7	SC1 B	SC1 C	SC2 A	SC10 C	SC1 3	SC1 8	SC1 9	SC20 B	294 9	SC23 B	SC23 C	295 3
2023	94,8																																				
2085	97,4	95,4																																			
2110	92,4	92,5	92,6																																		
2086	91,5	93,1	91,7	90,8																																	
2114	91,5	93,1	91,7	90,8	99,8																																
2051	88,5	88,6	88,5	88,7	88,3	88,3																															
2106	88,4	88,5	88,3	88,5	88,2	88,2	99,6																														
2011	88,2	88,5	88	89	88,3	88,4	97,1	96,8																													
2012	88,1	88,4	87,9	88,9	88,2	88,3	97	96,8	99,8																												
2111	89,4	89,2	89,6	89,7	88,9	88,9	89,1	89	89,7	89,5																											
2117	87,6	87,7	87,7	87,6	87,8	87,9	93,2	93,2	93,2	93,1	88,4																										
2351	94,5	99,1	95,2	92,2	92,9	92,9	88,4	88,3	88,3	88,1	88,8	87,6																									
2390	91,3	91,7	91,4	92	90,1	90,1	88	87,9	87,9	87,7	89,6	86,4	91,4																								
2395	91,4	91,4	91,6	91,5	90,1	90,1	87,9	87,7	87,6	87,5	89,1	86,4	91,2	91,6																							
2435	86,4	86	86,5	86,6	86	86,1	86,1	85,9	86,4	86,3	86,8	86,5	85,9	85,3	85,4																						
2503	87,5	87,5	87,8	87,3	86,2	86,3	85,5	85,4	85,4	85,2	86,4	85,1	87,3	88,1	88,3	83,2																					
2509	92,7	93,5	93,2	93	91,3	91,4	89,2	89	89,2	89	90,2	87,6	93,4	92,5	91,5	86,8	88,1																				
2970	90,8	91	91,2	91,8	90,1	90,2	88,3	88,3	88,4	88,3	89,7	87,2	91	93,1	91,8	86,1	87,9	92,1																			
2522	88,6	89,4	89,1	88,2	88,8	88,9	86	85,8	86,1	86	86,6	85,3	89,2	87,6	88,2	83,7	87,4	88,9	87,9																		
2968	90,4	90,7	90,5	90,5	89,6	89,6	88,2	88,1	87,9	87,8	89	87,9	90,5	90,7	91,1	86,4	93,2	91	90,4	88,3																	
2804	90,5	90,4	91	90,1	89,8	89,9	87,6	87,5	87,8	87,7	89,5	87,2	90,3	90,4	91,8	86,4	88,8	91,5	91,1	88,2	91,1																
2806	91,5	92,2	91,7	91,7	89,9	89,9	87,6	87,5	87,4	87,3	88,5	86,2	92,2	90,5	90,1	85,2	86,5	94,7	90,6	87,5	89,5	90,3															
RS15	89,4	90,2	89,8	90,7	89,2	89,3	87,2	87,1	87,1	87	88,9	86	90,1	91,8	92,7	84,9	87,7	91,2	91,7	87	90,3	90,9	89,6														
2807	91,1	91,2	91,6	92,1	89,5	89,5	87,5	87,6	87,3	87,2	88,8	86,4	91,1	91	92,3	85	87,6	93,6	90,9	87,4	90,1	91,1	92,9	91,7													
Sc1B	91,1	91,3	91,2	91,1	90,6	90,6	87,7	87,7	87,6	87,5	88,7	86,1	91,2	93,2	93,7	85,5	89	91,8	93,1	88,1	91,3	92	90,8	93,8	92,5												
SC1C	91,4	91,6	91,5	91,9	90,8	90,9	88,9	88,8	88,8	88,6	90,1	87,2	91,5	93,7	92,8	86,2	87,9	92,6	95,4	88	90,8	91,2	91,2	92,6	91,2	94											
Sc2A	92,1	92,7	92,6	90,1	89,4	89,5	86,7	86,6	86,6	86,5	87,3	86,1	92,5	89,6	89,8	84,6	87,2	91	89,1	90,1	89,2	89	89,2	88,6	90,1	89,9	89,4										
SC10C	93,1	92,5	93,3	92,1	91	91,1	88,8	88,9	88,6	88,5	89,7	88	92,4	91,6	92,2	85,9	88,9	92,6	91,1	89,1	91,4	91,4	91,3	90,7	92	92,1	92	90,7									
SC13	91,6	91,2	91,8	91,1	89,8	89,9	87,5	87,4	87,4	87,2	88,3	86,6	91	90,3	92	84,6	87,8	91,5	89,9	88,1	90,1	90,9	90,1	90,6	92,1	91,7	90,8	90	97,9								
SC18	87,5	87,1	87,7	87,7	87,1	87,1	88,3	88,1	88,2	88,1	88,3	87,7	86,8	87,4	87,2	91,5	85	88,2	88,1	84,9	87,6	88,5	86,2	86,2	86,1	87,2	88,4	85,9	87,4	86							
Sc19	93	92,6	93,3	92,3	91,4	91,4	89	89	89	88,8	89,8	88	92,5	91,8	92,9	86,1	89,2	93,1	91,5	89,4	91,7	92	91,7	91,4	92,8	92,9	92,3	91,2	97,8	97,1	87,7						

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																							
Linhagem	204 9	202 3	208 5	211 0	208 6	211 4	205 1	210 6	201 1	201 2	211 1	211 7	235 1	239 0	239 5	243 5	250 3	250 9	297 0	252 2	296 8	280 4	280 6	RS1 5	280 7	SC1 B	SC1 C	SC2 A	SC10 C	SC1 3	SC1 8	SC1 9	SC20 B	294 9	SC23 B	SC23 C	295 3			
Sc19	93	92,6	93,3	92,3	91,4	91,4	89	89	89	88,8	89,8	88	92,5	91,8	92,9	86,1	89,2	93,1	91,5	89,4	91,7	92	91,7	91,4	92,8	92,9	92,3	91,2	97,8	97,1	87,7									
Sc20B	91,3	91,5	91,3	91,8	90,7	90,7	88,6	88,5	88,3	88,2	89,6	87,1	91,3	92,5	92,8	85	88	92,5	92,8	87,7	90,8	91,4	90,8	92,4	92,1	94	92,9	89,8	92	91,3	87,8	92,5								
2949	93,3	93,8	93,4	93,3	91,3	91,3	89,4	89,2	89,2	89,1	90	87,9	93,6	92,1	91,8	86,6	88,1	95,9	92	88,8	91,2	91,6	96,9	91,1	94,6	92,5	92,6	90,9	93	91,9	87,8	93,4	92,7							
SC23B	90,5	91	90,9	91,1	89,8	89,8	87,2	87	87,2	87,1	88,5	85,4	90,7	91,7	91,7	84,5	87,9	91,7	91,2	88	90,2	90,8	90,3	91,3	91,2	92,6	92,1	89,2	91,3	90,5	85,9	91,8	93,7	91,7						
SC23C	86,9	86,4	87	86,9	86,6	86,6	86,9	86,8	86,9	86,8	88,2	86,5	86,1	85,9	86,3	91	83,5	87,3	86,9	84,6	86,1	87,3	85,2	85,8	85,3	86,3	87,1	85	86,8	85,5	92,6	87	86,3	86,9	85,1					
2953	92,9	93,2	93,1	93	90,9	91	89	88,8	89	88,8	89,4	87,6	92,9	91,8	92,4	86,3	88,3	95,5	91,5	89,1	91	91,6	95,7	91,5	95,1	93,1	92,4	90,8	93,2	92,6	87,5	93,8	92,9	97,3	92,1	86,6				
Grupo externo	68,8	68,2	68,5	68,5	67,8	67,8	68,8	68,7	68,8	68,7	68,9	68,7	67,9	67,3	68,1	68,6	64,3	68,4	68	65,4	67,7	67,3	66,7	66,8	66,2	67,1	68,8	66,9	68	66,8	68,6	67,9	67,8	68,1	66,3	68,1	68,1			

Anexo 9

Matriz de similaridade das linhagens na análise dos genes *rpoB*, *atpD*, *recA* e *trpB*

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																													
IBS BF	204 9	202 3	208 5	211 0	208 6	211 4	205 1	210 6	201 1	201 2	211 1	211 7	235 1	239 0	239 5	240 4	243 5	250 3	250 9	252 0	297 0	252 2	296 8	280 4	280 6	RS 14	RS 15	280 7	293 2	SC1 B	SC1 C	SC2 A	286 5	SC1 0C	SC 13	SC 18	SC1 9I	SC2 0B	294 9	SC2 3B	SC2 3C	295 3	SC 26			
2023	95, 8																																													
2085	97	96, 7																																												
2110	93	93, 2	93, 2																																											
2086	91, 6	92, 6		91, 1																																										
2114	91, 7	92, 7	92, 1	91, 2	99, 7																																									
2051	89, 7	89, 7	90	90, 3	89, 6	89, 6																																								
2106	89, 8	89, 9	90	90, 3	89, 6	89, 7	99, 9																																							
2011	89, 3	89, 6	89, 5	90, 5	89, 6	89, 6	97, 1	97, 1																																						
2012	89, 2	89, 5	89, 3	90, 5	89, 5	89, 6	97, 1	97, 1	99, 9																																					
2111	90, 6	90, 5	91	90, 6	90	89, 1	90, 9	90, 5	90, 4																																					
2117	89, 5	89, 6	89, 8	89, 8	89, 8	89, 7	93, 8	93, 4	93, 4	89, 7																																				
2351	95, 5	99, 4	96, 9	92, 6	92, 6	92, 6	89, 7	89, 4	89, 3	90, 2	89, 6																																			
2390	93	93, 2	93, 3	93, 4	91, 4	91, 5	90, 9	91	90, 5	90, 4	92, 3	89, 9	92, 9																																	
2395	93, 2	93	93, 4	93, 6	91, 7	91, 7	91, 4	91, 5	90, 9	91, 9	89, 9	92, 8	95																																	
2404	97, 9	95, 3	96, 3	91, 9	91, 2	91, 3	89	89, 1	88, 5	88, 4	89, 8	88, 8	92, 3	92, 5																																
2435	87, 4	86, 9	87, 5	87, 6	87, 2	87, 3	87, 7	87, 9	87, 9	87, 9	88, 6	86, 8	87, 3	87, 9	86, 7																															
2503	90, 6	90, 3	91	90, 9	89, 2	89, 2	89, 1	89, 2	89, 1	89	90, 1	89, 1	90, 2	92, 6	92, 1	90, 3	86, 5																													
2509	93, 3	94	92, 9	92, 3	91, 3	91, 4	90, 6	90, 7	90, 4	90, 3	91	89, 5	93, 3	93, 3	93, 1	93	87, 4	91																												
2520	92, 4	93	93	92, 4	92, 9	93	90, 3	90, 3	90, 4	90, 4	91	89, 8	92, 8	92, 5	92, 8	91, 7	88	90	92, 5																											
2970	91, 2	91, 1	92	91, 8	90	90, 1	89, 6	89, 7	89, 5	90, 5	90, 8	89, 1	91, 1	95, 1	93, 9	90, 6	87	91, 5	91, 9																											
2522	91, 5	92, 1	92, 1	91, 6	92	92, 1	89, 3	89, 3	89, 4	90	88, 9	92	91, 5	91, 9	90, 8	87	89	91, 8	98, 7	91																										
2968	91, 6	91, 6	91, 1	92, 1	90, 4	90, 2	90, 2	90, 3	90	89, 9	90, 7	90, 3	91, 5	93, 2	93, 2	90, 9	88, 2	95, 6	91, 7	90, 9	92	90																								
2804	92, 1	91, 9	92, 8	91, 1	91, 4	91, 3	89, 4	89, 3	89, 3	89, 3	91, 6	89, 4	91, 8	93, 4	93, 4	91, 7	88	92, 5	92, 9	92	93	91, 2	93																							
2806	91, 4	92, 9	91, 1	91, 5	89, 6	89, 5	88, 5	88, 6	88	87, 1	89, 7	87, 2	92, 4	91, 3	91, 5	91, 5	85, 7	88, 9	94, 1	90, 6	90, 2	89, 9	89, 8	91, 2																						
RS14	91, 5	91, 2	91, 7	91, 1	90, 3	90, 4	89, 3	89, 4	88, 8	88, 7	90, 6	88, 1	91, 7	93, 6	90, 9	91, 3	87, 1	91, 3	92, 1	93, 4	90, 5	91, 7	92, 9	90, 3																						
RS15	91, 8	92	92, 2	92, 8	90, 6	90, 7	90, 3	90, 4	90, 2	91	89, 7	89, 8	95, 5	94	91, 2	87, 5	91, 8	92, 9	92, 2	94, 3	91	92, 6	92, 9	90, 7	93, 3	92, 1	93, 1	93, 7	94, 5	93, 2	93, 1	93, 7	95, 2	93, 1	89, 1	90, 8										
2807	93, 7	93, 8	94, 3	94, 4	91, 8	91, 3	91, 4	90, 8	90, 7	92	90, 5	93, 6	94, 5	94, 1	93, 1	88, 4	92, 3	95, 7	93	93, 3	92, 1	93, 1	93, 7	94, 5	93, 2	93, 1	93, 7	94, 5	93, 2	93, 1	93, 7	95, 2	93, 1	89, 1	90, 8											
2932	89, 6	90	90, 7	90, 2	90	90, 1	87, 5	87, 6	87, 2	87, 2	88, 1	87	90	90	90, 9	89, 2	85, 3	87, 6	89, 9	90, 8	88, 1	90, 1	88, 8	89, 4	88	89, 1	89, 1	90, 8																		

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																																
	204 9	202 3	208 5	211 0	208 6	211 4	205 1	210 6	201 1	201 2	211 1	211 7	235 1	239 0	239 5	240 4	243 5	250 3	250 9	252 0	297 0	252 2	296 8	280 4	280 6	RS 14	RS 15	280 7	293 2	SC1 B	SC1 C	SC2 A	286 5	SC1 0C	SC 13	SC 18	SC1 9I	SC2 0B	294 9	SC2 3B	SC2 3C	295 3	SC 26						
2807	93,7	93,8	94,3	94,4	91,8	91,9	91,3	91,4	90,8	90,7	92	90,5	93,6	94,5	94,1	93,1	88,4	92,3	95,7	93	93,3	92,1	93,1	93,7	94,5	93,2	93,6																						
2932	89,6	90	90,7	90,2	90	90,1	87,5	87,6	87,2	87,2	88,1	87	90	90	90,9	89,2	85,3	87,6	89,9	90,8	88,1	90,8	88,4	88	89,1	89,1	90,8																						
SC1B	92,8	92,7	92,5	92,7	91,8	91,6	90,6	90,4	90,3	90,3	91,5	89,5	92,3	96,4	94,7	92,2	87,8	92,8	93,2	92,8	94,7	91,6	93,8	93,6	91,6	96,1	95,3	94,3	90,1																				
SC1C	91,9	92	92,4	92,4	91,1	91,2	90,7	90,8	90,4	90,3	91,5	89,7	91,9	95,8	95	91,3	87,3	91,7	92,5	92,4	96	91,2	92,6	93	90,8	94,3	95,3	93,7	95,8																				
SC2A	96,1	96,5	96,6	93,6	93	93,1	90,7	90,4	90,4	90,4	91,2	90,2	96,3	94,6	93,6	95,5	87,4	91,4	94,7	93,6	92,4	92,7	92,5	92,6	92,4	92,1	92,9	94,8	90,8	93,9	93,3																		
2865	91,5	91,3	91,8	90,9	89,6	89,6	87,8	87,9	87,2	87,1	89,6	87,8	91,3	91,3	91,3	90,7	85,6	88,9	92,3	90,7	89,8	89,6	90,9	91,6	91,4	90,8	95,1	89,9	91,5	90,8	92,1																		
SC10C	93,7	93,6	93,9	93,3	91,4	91,6	90,6	90,8	90,5	90,4	91,1	90,1	93,6	93,8	94,3	87	91,9	93,7	92,8	92,4	92,6	92,5	91,8	92,4	92,8	94,8	90,7	93,6	93,5	94,3	92,9																		
SC13	93,6	93,8	93,4	93,3	91,5	91,5	90,5	90,3	90,3	90,9	90,9	89,9	93,7	93,2	94,2	87	91,8	93,7	92,6	92,3	91,5	92,5	92,7	91,7	92,4	92,8	94,7	90,6	93,5	93,4	94,2	92,8	99,7																
SC18	88,2	87,5	88,4	88,4	87,7	87,9	89,5	89,5	89,2	89,2	89,3	89	87,3	89,4	89,6	87,5	92,5	87,9	88,7	88,7	88,7	88,7	89,8	86,4	89	88,6	89,1	86,9	89,7	89,6	88,9	86,3	87,9	87,9															
Sc19	94	94,1	94,2	93,8	92,3	92,4	91,2	91,3	91,2	91,1	91,6	90,4	94	94,9	94,9	93,6	87,5	92,4	94,4	93,6	93	92,8	93	93,2	92,4	93	93,3	95,4	90,7	94,3	94	94,8	92	98,3	98,2	88,8													
Sc20B	92,2	92,2	92,4	92,8	90,8	90,9	90,4	90,5	90	90,9	89,3	89,4	92	95,2	94,6	91,9	86,9	92	93,6	91,9	93,8	90,7	92,3	91,3	93,7	94,1	94,2	89,8	95,2	94,3	93,2	91,2	93,5	93,4	89,2	94,1													
2949	93,9	94,3	94,1	93,2	91,3	91,4	90,8	90,8	90,2	90,2	91,1	89,9	94,1	93,6	93,3	93,4	87,6	91	95,8	92,7	92,2	91,7	91,8	92,2	96,6	92,7	96,6	89,9	93,8	92,8	94,6	93,7	93,9	93,7	93,8	88,6	94,5	93,6											
SC23B	92,4	92,7	92,9	93	91,1	91,3	89,9	90	89,9	89,8	91	88,8	92,4	94,5	94	92	86,4	91,4	93,2	92,5	93,7	92,3	93,3	91,3	92,9	93,1	93,9	89,5	94,6	93,9	93,6	91,3	93,3	93,1	88,1	93,9	95,3	93,3											
SC23C	87,4	86,7	87,4	87,3	86,8	87	87,5	87,7	87,4	87,3	88,5	87,2	86,7	87,7	88,4	86,7	91,2	86,2	87,4	88,1	87,1	88,2	87,9	87,2	85,9	87,7	88,1	85,9	88,3	87,8	87,6	85,3	87,4	87,4	92,1	88	87,5	87,5	87										
2953	93,9	94,3	94,4	93,8	91,7	91,8	91,1	91,1	90,8	90,7	91,3	90,2	94,1	93,9	93,6	93,5	88	91,5	96,1	93,2	92,4	92,3	93,1	95,5	93,1	93	97,2	90,7	94,1	93,1	94,7	94	94,6	94,5	89,1	95,1	93,8	97,7	93,7	87,9									
SC26	93,1	93,4	93,4	93,4	91,7	91,8	91,5	91,6	91,4	91,4	92	90,2	93,1	95,1	96,9	92,1	88,2	91,8	93,6	92,8	93,7	91,8	92,6	93,8	91,5	93,7	94,4	90,9	95,3	94,9	93,7	91,6	94,1	94	89,7	94,8	94,7	93,6	94,6	88,4	94,1	71,8							
Grupo externo	71,4	70,7	71,3	71,2	70,8	70,9	71,6	71,7	71,4	71,4	71,1	71,5	70,6	71	71,9	70,6	71,3	70	70,9	71,3	70,6	70,6	71,3	71,2	69,2	71,3	70,6	70,9	71	71,4	71,6	71,9	71	71,1	71,1	71,4	71,3	71,2	70,9	70,4	70,6	71,4	71,8						

Anexo 10

Matriz de similaridade das linhagens na análise dos genes *rpoB* e *atpD*

[illegible]

165

Anexo 11

Matriz de similaridade das linhagens na análise dos genes *rpoB*, *recA* e *trpB*

[illegible]

	Porcentagem de similaridade com diferentes linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.																																															
Linhagem m	2049	2023	2085	2110	2086	2114	2051	2106	2011	2012	2111	2117	2343	2344	2351	2390	2395	2404	2435	2503	2509	2520	2970	2522	R59	RS11	RS12	RS14	RS15	RS16	SC3A	SC1B	SC1C	SC2A	SC10B	SC10C	SC13	SC18	SC19	SC20B	SC21	SC23B	SC23C	SC25B	SC26			
RS16	93,1	92,6	93,3	93,9	89,8	89,8	91,9	92,9	91,4	91,3	92,7	90,7	81,5	82,2	92,6	94,8	93,7	91,3	88,1	92,7	94,9	91,7	92,7	90,7	92,6	92,7	93,9	93,3	92,9																			
Sc3A	87,8	87,7	88,5	88,8	87,2	87,3	86,3	86,5	85,9	85,9	86,9	85,8	80,1	81,4	87,5	88,5	89,4	86,5	84,1	85,5	87,6	88,4	7,4	86,3	86,6	84,6	87,9	87,2	7,7																			
Sc1B	92,5	92,3	92,3	92,3	90,8	91,9	90,9	91,9	90,7	90,5	91,2	89,7	81,3	82,5	91,8	95,8	94,1	91,3	87,8	92,6	92,8	92,3	94,7	91,9	93,4	93,3	90,2	95,9	94,2	94,3	88,7																	
SC1C	91,4	91,4	91,7	92,7	90,1	90,2	90,8	90,9	90,2	90,7	90,1	90,3	89,3	82,1	83,2	91,1	95,4	94,1	90,8	86,9	91,8	91,7	95,9	90,2	91,6	92,5	89,2	93,8	94,9	92,1	88,9	94,9																
Sc2A	95,5	95,9	95,8	92,2	91,2	91,3	90,4	90,5	90,3	90,2	90,6	89,7	80,7	82,7	95,4	94,9	92,3	94,3	88,6	90,5	93,6	92,3	91,6	91,2	91,6	91,2	90,1	91,8	92,4	93,7	88,4	93,5	92,8															
Sc10B	90,9	89,2	89,8	89,1	86,6	86,6	87,2	87,3	86,5	86,4	88,7	87,1	85,5	88,7	88,1	90,8	89,9	88,4	87,6	87,4	90,5	88,5	88,8	87,5	88,8	88,8	89,1	90,8	89,2	93,3	87,5	90,5	89,5	89,9														
SC10C	93,9	93,9	93,8	92,6	89,8	89,2	90,4	90,3	90,1	90,3	89,5	83,2	84,2	92,7	93,5	93,9	92,2	86,4	91,8	92,9	91,5	91,4	90,4	92,3	91,5	89,8	92,4	92,3	94,7	88,3	93,8	92,4	93,8	91,4														
SC13	93,6	93,6	93,6	93,2	90,8	90,9	91,9	91,2	91,3	91,3	90,2	81,4	82,3	93,4	94,4	94,8	92,4	87,2	92,4	93,4	92,3	92,3	92,1	92,2	92,8	92,6	90,6	93,1	93,9	94,8	88,7	94,4	93,6	94,1	90,1	97,8												
SC18	88,2	87,1	88,8	88,3	87,3	87,4	89,8	89,8	88,3	88,3	89,3	88,3	81,5	82,3	86,7	89,8	89,8	86,9	91,1	88,1	88,1	88,8	88,8	87,5	88,7	88,8	89,7	85,5	89,8	89,6	89,8	88,6	85,5	87,6	88,9													
Sc19	93,5	93,6	93,5	93,4	90,8	90,9	91,9	91,2	91,3	91,3	91,1	90,2	81,2	82,5	93,3	94,4	94,7	92,7	87,5	92,7	93,5	92,2	92,6	91,9	92,9	92,3	90,6	93,1	92,9	94,8	88,8	94,3	93,4	94,1	90,1	97,8	99,3	88,9										
Sc20B	91,7	91,4	91,5	92,4	89,4	89,6	91,9	91,1	90,4	90,3	91,9	89,6	81,2	82,4	91,9	95,2	94,4	90,7	86,4	91,8	92,9	90,6	93,2	92,4	92,1	92,7	89,6	93,9	93,6	93,8	87,9	95,2	93,8	92,3	89,7	93,9	94,2	89,5	93,9									
SC21	93,8	94,7	93,7	93,2	90,1	92,1	92,5	91,3	92,6	90,9	81,6	83,9	93,6	94,1	93,6	94,9	92,3	88,3	91,3	95,7	92,3	92,3	91,2	91,8	92,3	95,8	93,7	92,9	97,1	88,5	94,5	93,3	93,1	93,9	94,8	89,4	94,8	93,9										
SC23B	91,2	91,1	91,2	91,8	89,1	89,2	89,8	89,9	89,9	89,7	90,8	88,3	81,8	82,2	90,7	94,1	93,6	90,1	86,3	91,3	91,9	90,6	92,4	89,5	91,8	92,3	89,3	93,4	92,4	93,9	86,9	94,5	93,5	92,1	89,4	92,1	93,1	88,1	93,9	95,2	93,9							
SC23C	89,7	87,6	88,6	88,9	88,2	88,3	88,5	88,1	87,9	90,8	88,3	83,3	84,4	87,4	89,7	87,6	91,2	87,6	88,8	88,3	88,8	88,8	88,6	88,3	88,3	85,7	89,4	89,4	89,6	86,9	89,9	89,7	88,7	85,8	88,5	89,1	92,8	89,3	89,1	88,5								
SC25B	93,3	93,2	93,2	93,4	89,4	89,6	91,5	91,5	91,3	91,2	91,4	90,1	81,3	82,4	92,8	93,7	93,2	92,2	88,2	91,2	95,3	92,3	91,6	91,9	92,4	92,9	94,3	93,3	92,4	96,8	88,6	94,9	92,7	93,5	92,4	94,6	89,8	94,7	93,4	98,3	92,5	89,5						
SC26	92,5	92,5	92,5	92,9	90,4	90,5	91,7	91,8	91,4	91,4	91,4	90,1	81,4	82,6	92,1	94,8	96,6	90,9	87,7	91,7	92,7	91,7	92,7	92,9	92,2	92,9	89,7	93,8	93,6	93,9	89,1	95,3	94,2	92,7	90,7	93,2	94,3	89,5	94,2	94,8	93,7	93,9	89,5	93,6				
Grupo externo	71,5	70,1	70,9	70,7	69,8	69,7	70,8	70,3	70,2	70,6	70,2	69,7	70,6	69,9	70,3	71,5	69,6	70,4	69,2	70,4	69,7	70,7	69,4	69,8	70,1	70,7	67,2	71,2	70,2	70,6	70,1	70,8	70,7	71,5	70,6	70,7	70,9	70,9	71,4	69,8	71,3	71,2	71,4					