

Isolamento, Caracterização Cultural-Morfológica, Patogenicidade e Serologia de *Streptomyces* spp. da Batata

Ivan H. Fischer*, Hiroshi Kimati & Marise C. Martins

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Cx. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, fax (019) 3434-4839, e-mail: ihfische@esalq.usp.br

(Aceito para publicação em 15/08/2003)

Autor para correspondência: Ivan H. Fischer

FISCHER, I.H., KIMATI, H. & MARTINS, M.C. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. Fitopatologia Brasileira 28:650-655. 2003.

RESUMO

O presente trabalho testou quatro métodos de isolamento de *Streptomyces* spp. em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) com sarna comum, superficial e profunda, caracterizando os isolados quanto a morfologia, serologia e patogenicidade. Para o isolamento foram testados: meio de cultura ágar-água a pH 10; meio contendo antibióticos; meio de asparagina e meio de quitina. O meio ágar-água pH 10 foi o mais eficaz no isolamento de *Streptomyces* spp. com média de 129 colônias/placa, além de ser de fácil preparo, menor custo e proporcionar melhor visualização das colônias. No meio de antibiótico verificou-se média de 54% dos fragmentos de tubérculos plaqueados com crescimento de *Streptomyces* spp. Já nos meios de asparagina e quitina a média foi de 36,3 e 2,5 colônias/placa, respectivamente. Para caracterização dos isolados obtidos utilizou-se o meio de extrato de levedura e malte. As colônias originadas

apresentaram coloração que variou de cinza a marrom e de branco a creme, com ou sem produção de pigmento, com cadeias de esporos flexuosas ou espiraladas, de tamanho variável e produzindo ou não micélio aéreo em colônias com cadeias espiraladas. Dezenove isolados, representando esses diferentes tipos, foram inoculados na batata cv. Monalisa por infestação de solo autoclavado, antes da semeadura dos tubérculos-sementes. Sintomas típicos da doença foram verificados 14 semanas após a inoculação, para oito isolados. Anti-soros produzidos em coelhos contra três isolados fitopatogênicos apresentaram reação serológica (dupla difusão em gel-ágar de Ouchterlony) para os antígenos homólogos e para poucos antígenos heterólogos, porém os isolados de *Streptomyces* com patogenicidade confirmada não apresentaram antígenos em comum.

Palavras-chave adicionais: sarna comum, pH, dupla difusão.

ABSTRACT

Isolation, cultural and morphological characterization, pathogenicity and serology of *Streptomyces* spp. from potato

Four methods of isolation of common superficial and deep scab were tested with the purpose of characterizing the isolates of *Streptomyces scabies* according to morphological and serological criteria and their pathogenicity. For isolation, obtained in water-agar at pH 10, a medium containing antibiotics, asparagine medium and colloidal chitin medium were tested. Water-agar pH 10 was the most efficient medium, giving rise to 129 colonies/Petri dishes, besides being of easy preparation, lower cost and giving better visualization of the colonies. The antibiotic medium gave an average of 54% of plated potato tuber fragments that yielded *Streptomyces* spp. growth. Asparagine and colloidal chitin showed averages of 36,3 and 2,5 colonies/Petri dish, respectively. For characterization of isolates, the

yeast extract and malt medium were used, resulting in colony colors ranging from gray to brown and from white to cream, with and without production of pigment. The colonies formed flexuous or spiral spore chains, with variable size and producing or not aerial mycelium in spiral colonies. Nineteen isolates representing the different cultural and morphological types were inoculated in potato (*Solanum tuberosum*) cv. Monalisa through infestation of sterilized soil before the sowing of the seed tubers. Typical symptoms of the disease were reproduced 14 weeks after inoculation by eight isolates. Antisera produced in rabbits against three pathogenic isolates showed serological reaction (double diffusion in Ouchterlony gel-agar) for the homologous antigens and for few heterologous antigens. *Streptomyces* spp. isolates with confirmed pathogenicity did not show antigens in common.

INTRODUÇÃO

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) tem sofrido importantes perdas econômicas, devidas à sarna comum que ocasiona lesões corticosas nos tubérculos, tanto superficiais quanto profundas. A doença é causada por diferentes espécies e raças de bactérias do gênero *Streptomyces*, que formam conídios e filamentos, estruturas normalmente relacionadas a fungos (Labruyere, 1971).

*Bolsista da FAPESP – Processo 99/11703-3

A espécie *S. scabies* (Thaxter) Waksman & Henrici é a mais encontrada causando a sarna comum, mas outras como *S. acidiscabies* Lambert & Loria, *S. turgidiscabies* Miyajima, Tanaka, Takeuchi & Kuninaga e *S. caviscabies* Goyer, Faucher & Beaulieu também podem incitar sintomas da doença. Estas quatro espécies diferenciam-se entre si por critérios morfológicos, fisiológicos e genéticos (Faucher *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1996; Miyajima *et al.*, 1998).

A espécie *S. scabies* produz esporos de coloração cinza, em forma de barril, arranjados em cadeia, formando um espiral,

medindo 0,8-1,7 x 0,5-0,8 µm, produz melanina, utiliza todos os açúcares empregados na caracterização de espécies de *Streptomyces*, conforme recomendado pelo Projeto Internacional de *Streptomyces* spp. (Shirling & Gottlieb, 1966), é sensível à estreptomina; é encontrada em solos secos, neutros a alcalinos, não se desenvolvendo em pH abaixo de 5 (Lambert & Loria's, 1989; Waterer, 2002)

A espécie *S. acidiscabies* diferencia-se morfológicamente de *S. scabies* pela produção de esporos de coloração esbranquiçada a avermelhada formados em cadeias flexuosas e pela não produção do pigmento melanina. Não é capaz de utilizar rafinose como única fonte de carbono e consegue se desenvolver em meio de cultura a pH 4 (Lambert & Loria, 1989).

A espécie *S. turgidiscabies* produz esporos em cadeia flexuosa de coloração cinza; não produz melanina ou outro pigmento difusível e apresenta baixa similaridade ao nível de DNA com as outras espécies causadoras da sarna comum (Miyajima *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). *Streptomyces caviscabies* diferencia-se de *S. turgidiscabies* por apresentar os esporos de coloração dourada e também pela baixa similaridade ao nível de DNA (Goyer *et al.*, 1996a).

Estudos taxonômicos realizados no Japão com 35 isolados patogênicos de *Streptomyces* spp., provenientes de tubérculos de batatas, permitiram a divisão desses isolados em dois grupos, baseados na morfologia da cadeia de esporos: espiralada ou flexuosa (Tashiro *et al.*, 1990). No leste do Canadá, isolados de batata causadores da sarna comum foram divididos em três grupos fenotípicos (Faucher *et al.*, 1992): isolados do primeiro grupo formavam colônias bronzeadas para marrom, esporos de coloração cinza, dispostos em cadeia espiralada e produção de melanina; isolados do segundo grupo geravam colônias amarelo-ouro para castanho brilhantes, esporos brancos em cadeias flexuosas e não produção de melanina; isolados do terceiro grupo apresentavam as mesmas características morfológicas do segundo grupo, entretanto, utilizavam somente a rafinose como fonte de carbono, assim como os isolados do primeiro grupo. Todos os isolados mostravam-se sensíveis à estreptomina.

A sarna comum pode formar lesões corticosas nos tubérculos, superficiais ou profundas. Os sintomas da sarna profunda podem ser causados por *Streptomyces* spp. dependendo das condições ambientais, virulência da raça e resistência da cultivar de batata (Lorang *et al.*, 1995; Toth *et al.*, 2001). Entretanto, a correlação entre a secreção de enzimas hidrolíticas e a severidade dos sintomas tem sido estabelecida. Isolados de *S. scabies* causadores de lesões superficiais não mostraram atividade proteolítica (Faucher *et al.*, 1995). Raças da bactéria provenientes de Quebec, causadoras de sarna profunda, exibiram atividades proteolítica e celulolítica superiores às associadas a raças isoladas da casca do tubérculo de batata com a sarna superficial (Cortean & Beaulieu citado por Goyer *et al.*, 1996b). Thaxtomins, um grupo de fitotoxinas, parece ter importante relação na patogenicidade, o que foi confirmado por King *et al.* (1991) e Healy *et al.* (2000), que obtiveram correlação positiva entre produção dessa fitotoxina e patogenicidade.

O isolamento de actinomicetos de amostras de solos e de tubérculos infetados com a sarna é relativamente difícil, devido ao grande número de contaminantes. Vários métodos de isolamento foram desenvolvidos, destacando-se o tratamento do inóculo com fenol (Lawrence, 1956) e o tratamento do solo úmido com CaCO₃ para aumentar o pH, juntamente com o ajuste do pH do meio de farinha de soja na faixa de 7,9 a 8,1 (Tsao *et al.*, 1960). Hsu & Lockwood (1975) relataram a eficácia do isolamento e quantificação de actinomicetos de amostras de água em meio de ágar acrescido de quitina coloidal a 0,4% e sais minerais, ajustado a pH 8,0.

Moyer & Echandi (1986) identificaram *S. ipomoea* (Person & Martin) Waks & Henrici agente causal da sarna da batata doce [*Ipomoea batata* (L.) Lam], em culturas puras, através das técnicas serológicas de dupla difusão e ELISA. Para obtenção deste resultado, imunizaram coelhos com suspensões homogeneizadas de células de *S. ipomoea*, combinada com adjuvante completo de Freund, aplicando injeções por via intramuscular.

Frente ao exposto, os objetivos do presente trabalho foram testar quatro metodologias de isolamento de *Streptomyces* spp. de tubérculos de batata e caracterizar os isolados quanto a critérios morfológicos-culturais, patogenicidade e análises sorológicas pelo método de dupla difusão.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e na área experimental pertencentes ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba, SP.

Isolamento de *Streptomyces* spp. de tubérculos de batata

Tubérculos de batata com sarna comum superficial e profunda foram obtidos de campos comerciais de batata, localizados nas cidades de São Miguel Arcaño/SP, Piedade/SP e Ponta Grossa/PR, pertencentes a agricultores filiados à Associação de Bataticultores do Sudoeste Paulista (ABASP) e à Associação Brasileira da Batata (ABBA). As quatro metodologias de isolamento avaliadas foram:

A) Porções de 1 g do tubérculo lesionado foram lavadas em água corrente, desinfestadas com álcool 70% e maceradas em 1 ml de água esterilizada. Espalhou-se 40 µl dessa suspensão, com o auxílio da alça de Drigalsky, em placas contendo 20 ml de ágar-água (AA) ajustado a pH 10 (NaOH 0,5 N), adaptado de Ho & Ko, (1979) (AA pH 10).

B) Porções de 0,5 cm² de tubérculos foram colocadas em solução de fenol e água esterilizada (1:140) por 10 min, seguido de duas lavagens em água esterilizada por 15 min, e posterior aquecimento em água a 55 °C por 30 min (Faucher *et al.*, 1992). Foram transferidos cinco fragmentos de tubérculos por placa contendo meio constituído de 1,2% de ágar, 50 mg de nistatina, 5 mg de sulfato de polimixina B, 1 mg de penicilina G de sódio e 50 mg de cicloheximida por litro (antibiótico).

C) Uma gota de 40 µl da suspensão, obtida conforme

item A, foi transferida para 10 ml de solução de fenol (1:140), agitando-se por 10 min; transferiu-se 40 µl para 12 ml do meio cultura de glicose-asparagina-ágar ajustado a pH 6,5 a 45 °C (Lawrence, 1956) (asparagina).

D) Porções de 1 g do tubérculo doente foram lavadas em água corrente, desinfestadas com álcool 70% e maceradas em 1 ml de tampão fosfato 0,1M (pH 8,5), espalhando-se 40 µl do macerado sobre meio de quitina com propriedades coloidais, preparado com tampão fosfato 0,1M (Lingappa & Lockwood, 1962) (quitina).

A eficiência dos métodos de isolamento de *Streptomyces* spp. em tubérculos de batata baseou-se na contagem do número de colônias de *Streptomyces* spp., bactérias não filamentosas e fungos, após dez dias de incubação no escuro, a 28 °C.

A purificação dos isolados de *Streptomyces* spp., obtidos nos diferentes métodos de isolamento, foi realizada após repicagens sucessivas em seus respectivos meios de isolamento. Buscou-se repicar as colônias mais individualizadas, distantes de colônias de bactérias não filamentosas e fungos. Para isso, porções das colônias foram coletadas com uma agulha e espalhadas no meio com a alça de Drigalsky, na presença de 40 µl de água esterilizada. Após obtenção dos isolados puros, os mesmos foram repicados para meio de extrato de levedura e malte (YME), que por ser um meio rico, facilitou a caracterização morfológica e cultural dos isolados.

Caracterização morfológica das colônias

A análise morfológica foi realizada visualmente e através de microscopia óptica, avaliando-se o formato das cadeias de esporos, a coloração das colônias e a produção de pigmentos em meio de cultura.

Testes de patogenicidade

Batatas-sementes da cultivar Monalisa foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (0,5%), por 15 min, enxaguadas em água destilada por mais 15 min e plantadas em sacos de polietileno preto com capacidade de 4 Kg, mantidos em casa de vegetação a temperatura média de 28 °C. O substrato utilizado, composto de terra, esterco bovino e areia, na proporção de 2:1:1, apresentando pH em água de 6,3, foi autoclavado e previamente infestado com uma suspensão de *Streptomyces* spp., incorporada nos primeiros 10 cm, à razão de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro por quilo de solo. Procurou-se manter a umidade do solo baixa, principalmente durante a fase de tuberização. Foi realizada uma adubação com nitrato de cálcio na proporção de 6 g por saco, aos 25 dias do plantio. A distribuição dos sacos foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições (plantas) por isolado, de um total de 19 isolados, representando os diferentes tipos morfológicos encontrados. O experimento foi repetido duas vezes (setembro de 2000 e março de 2001).

A avaliação dos sintomas da sarna comum foi realizada 14 semanas após o plantio, efetuando-se em seguida o reisolamento em AA pH 10 de *Streptomyces* spp. dos tubérculos formados e comparação dos diferentes isolados obtidos em YME.

Produção de anti-soro

As colônias bacterianas usadas para produção do anti-soro foram suspensas em 0,02 M Tris-HCl (pH 7,2). A suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 10.000 g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso e ajustado para uma absorbância igual a 1,4 a 280 nm. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 1 ml, que foi emulsionada com 1 ml de coadjuvante Freund completo e injetado por via intramuscular na perna traseira de um coelho jovem, imunologicamente competente (quatro meses). Injeções foram aplicadas semanalmente. As sangrias foram realizadas a partir da quarta semana após o início das injeções (Moyer & Echandi, 1986).

Detecção da bactéria mediante teste imunológico

Preparou-se uma suspensão bacteriana dos isolados em 0,02 M Tris-HCl, pH 7,2, contendo 0,15 M NaCl, padronizando a mesma fotometricamente conforme citado para produção de anti-soro. A suspensão padronizada foi empregada para as reações sorológicas.

Os testes serológicos foram realizados empregando-se a técnica de dupla difusão em gel – ágar de Ouchterlony. Colocou-se 5 ml de uma solução fundente de agarose (Moyer & Echandi, 1986) em lâminas de vidro para microscopia, perfurando-se esta camada após a solidificação, com o auxílio de um conjunto de seis cilindros ocos de 0,4 cm de diâmetro, dispostos hexagonalmente, e um cilindro central, sendo a distância entre os vértices do hexágono de 0,5 cm.

Os antígenos reagentes foram colocados nos poços circundantes e o anti-soro no poço central, sendo que o preenchimento dos poços foi feito duas vezes dentro de um intervalo de 30 min. As lâminas foram mantidas em câmara úmida por dois dias, quando se procedeu a avaliação dos testes serológicos. Esta mesma técnica foi utilizada para a titulação dos anti-soros e antígenos, os quais foram diluídos em salina tamponada por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5). As reações entre antígenos e anti-soros foram determinadas para os diferentes isolados, comparando-se com os soros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de *Streptomyces* spp. de tubérculos de batata

Os números de colônias de microorganismos isolados por placa, para as diferentes metodologias testadas estão expressos na Tabela 1.

O meio de cultura AA pH 10 foi o que propiciou maior número de isolados de *Streptomyces* spp., com média de 129 colônias/placa, permitindo fácil observação da morfologia das colônias com o auxílio da microscopia óptica, apresentando ainda as vantagens da praticidade e baixo custo de preparo e isolamento. As colônias crescidas sobre o meio AA pH 10 apresentaram reduzido desenvolvimento e baixa esporulação, o que dificultou a observação da coloração das colônias, as quais caracterizaram-se por uma tonalidade cinza.

O meio de antibiótico também foi eficiente no isolamento de *Streptomyces* spp., alcançando uma média de 2,7 colônias/placa, o que, apesar de ser bem inferior ao número obtido com

TABELA 1 - Eficácia de diferentes metodologias de isolamento de microrganismos (bactérias do gênero *Streptomyces*, bactérias não filamentosas e fungos) de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*)

Cultivar	N° de colônias */placa nos meios de											
	AA pH 10			Antibiótico			Asparagina			Quitina		
	Strept.	Bactéria	Fungo	Strept.	Bactéria	Fungo	Strept.	Bactéria	Fungo	Strept.	Bactéria	Fungo
Monalisa 1	061,4	069,7	2,9	3,6	5,0	0,0	6,2	227,2	0,9	25,0	483,1	08,6
Bintje	033,0	085,0	1,7	2,6	5,0	0,0	0,4	005,8	0,1	35,7	560,2	51,3
Monalisa 2	114,0	142,3	3,4	2,0	5,0	0,3	0,2	007,2	0,2	34,4	533,0	13,2
Atlantic	145,7	535,8	0,1	2,7	5,0	0,6	1,7	001,8	0,1	58,9	783,7	20,5
Monalisa 3	290,2	210,4	4,8	2,8	5,0	0,6	4,0	034,7	2,3	27,6	965,2	06,4
Média Geral	128,9	208,6	2,6	2,7	5,0	0,3	2,5	055,3	0,7	36,3	665,0	20,0

*Média de duas repetições de cinco placas cada.

o meio AA pH 10, ocorreu devido a metodologia utilizada. No meio de antibiótico, foram plaqueados fragmentos de tubérculo, ao contrário do AA pH 10 onde se plaqueou a suspensão de tubérculos macerados por toda a placa. O meio de antibiótico permitiu a visualização da coloração das colônias de *Streptomyces* spp. sobre os fragmentos de tubérculos; apresentou, porém, contaminação de bactérias não filamentosas na base desses fragmentos e dificuldade para a observação da morfologia das colônias com microscopia, pois as colônias não haviam se desenvolvido, até os dez dias, sobre o meio de cultura, iniciando-se ao redor dos quinze dias. Além disso, o preparo do meio era de alto custo e trabalhoso.

O número de colônias de *Streptomyces* spp. obtidas por placa em meio de glicose-asparagina-ágar, apesar de ter sido semelhante ao observado no meio de antibiótico, pode ser considerado inferior a este, pois mais de 50% das colônias de microrganismos apresentaram um crescimento interno no meio de cultura, dificultando a identificação dos mesmos.

O meio de quitina coloidal foi menos eficaz em relação ao número de isolados de *Streptomyces* spp. obtidos, quando comparado ao meio AA pH 10, mas as colônias apresentaram desenvolvimento e características semelhantes às crescidas no mesmo meio.

A elevação do pH do meio de cultura e o tratamento dos fragmentos de tubérculo de batata infetados, com fenol, favoreceram o isolamento de *Streptomyces* spp., conforme já descrito na literatura (Lawrence, 1956; Tsao *et al.*, 1960; Hsu & Lockwood, 1975; Ho & Ko, 1979).

Análise morfológica

De acordo com a caracterização morfológica e cultural dos isolados (Tabela 2), as colônias apresentaram crescimento radial em todos os meios de cultura avaliados.

Os diferentes isolados de *Streptomyces* encontrados foram correlacionados com suas respectivas amostras de tubérculos de batata (Tabela 3).

Confrontando-se a morfologia das colônias de *Streptomyces* spp. obtidas, com as encontradas na literatura, sugere-se que as colônias *a, b, d, e, f, g, h* e *i*, de cadeias de esporos espiraladas e coloração cinza, correspondem a *S.*

scabies, conforme citado por Lambert & Loria's (1989).

As colônias *j, n* e *o* apresentaram cadeias de esporos flexuosos e coloração cinza, características descritas para *S. turgidiscabies* (Miyajima *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998).

Encontraram-se colônias flexuosas brancas a avermelhadas (*l, p, q* e *r*), que não produziram pigmentos difusíveis no meio de cultura, conforme descrito para *S. acidiscabies*. Também se encontrou uma colônia com cadeias de esporos flexuosos de coloração cinza escuro, que liberou pigmento violeta no meio de cultura (*m*), não sendo possível relacioná-la a uma espécie definida.

Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade, seguidos do reisolamento e comparação morfológica dos isolados, evidenciaram a capacidade dos isolados de *Streptomyces* spp. *b₂* e *b₃* de causar a sarna comum profunda e os isolados *b, e, h, m, o* e *p* de causar a sarna comum superficial. Sugere-se, portanto, a existência, no Brasil, das espécies *S. scabies* (isolados *b, b₂, b₃, e* e *h*), *S. acidiscabies* (isolado *p*), e *S. turgidiscabies* (isolado *o*).

A confirmação da patogenicidade dos isolados de *Streptomyces* spp. obtidos de tubérculos de batata torna-se sempre necessária, pois há semelhanças morfológicas e culturais entre isolados saprofitos e patogênicos (Lambert & Loria, 1989).

Análise sorológica

Os anti-soros que resultaram em reação sorológica foram obtidos após a sétima semana do início das injeções para o isolado *b* e após a quinta semana para os isolados *b₃* e *o*. Houve reação com os antígenos homólogos até a diluição 1:2 para o anti-soro *b* e 1:4 para os anti-soros *o* e *b₃*. Em relação aos antígenos houve reação até a diluição de 1:4 para o antígeno *b* e 1:2 para os antígenos *o* e *b₃*, também com seus respectivos anti-soros.

O anti-soro *b* reagiu fortemente com seu antígeno homólogo, evidenciando-se duas linhas de precipitação quando não diluídos, sendo uma linha pouco evidente, que desapareceu quando o antígeno ou anti-soro foram diluídos.

Avaliou-se a especificidade dos anti-soros aos isolados

TABELA 2 - Caracterização morfológica e cultural de isolados de *Streptomyces* spp. obtidos de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*)

Cadeia de esporos		Micélio aéreo	Cor da colônia	Produção de pigmentos ¹	Tipo morfológico
Formato	Comprimento				
Espiralada	longa	presente	cinza escuro	ausente	<i>a</i>
			cinza claro	ausente	<i>b</i>
		branco amarronzado	ausente	<i>c</i>	
		cinza claro	ausente	<i>d</i>	
	curta	ausente	cinza escuro	ausente	<i>e</i>
		presente	cinza claro	ausente	<i>f</i>
		ausente	marrom acinzentado	marrom	<i>g</i>
			marrom acinzentado	marrom	<i>h</i>
Espiralada e flexuosa	curta	presente	cinza escuro	ausente	<i>i</i>
		ausente	cinza claro	ausente	<i>j</i>
Flexuosa	longa	ausente	branco	ausente	<i>l</i>
			cinza escuro	violeta	<i>m</i>
		ausente	cinza escuro	ausente	<i>n</i>
			marrom acinzentado	ausente	<i>o</i>
	curta	ausente	creme	ausente	<i>p</i>
			branco avermelhado ²	ausente	<i>q</i>
		ausente	branco avermelhado ³	ausente	<i>r</i>

¹Liberção de pigmentos no meio de cultura YME.

² e ³Alta e baixa produção de filamentos sob o meio de cultura, respectivamente.

TABELA 3 - Amostras de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) e seus respectivos isolados de *Streptomyces* spp.

Cultivar	Tipo de sintoma	Isolado
Monalisa 1	superficial	<i>b, g, h, i, m, n, p</i>
Binje	superficial	<i>c, d, g₂, j, m₂, o</i>
Monalisa 2	superficial	<i>a, c₂, e, f, l, p₂</i>
Atlantic	superficial	<i>e₂, n₂, p₃, q, r</i>
Monalisa 3	profunda	<i>b₂, h₂, p₄</i>
Monalisa 4	profunda	<i>b₃</i>

^{2, 3} e ⁴Índices atribuídos a isolados de *Streptomyces* spp. semelhantes morfológicamente, porém obtidos de amostras diferentes de batata (*Solanum tuberosum*).

de *Streptomyces* spp. utilizados nos testes de patogenicidade (Tabela 4), observando-se que o anti-soro *b* reagiu com os antígenos *b, f e q*, o anti-soro *o* reagiu com os antígenos *f, i e o*, e o anti-soro *b₃* reagiu com os antígenos *b₃ e f*. Há ocorrência de antígenos comuns entre poucos isolados de *Streptomyces*. Observou-se reação sorológica positiva para os antígenos homólogos.

Comparando-se os dados obtidos nas análises sorológicas com os dos testes de patogenicidade, observou-se que os isolados de *Streptomyces* spp. com patogenicidade confirmada não apresentaram antígenos em comum. Dentre os poucos isolados que apresentaram antígenos em comum, apenas os isolados correspondentes aos antígenos homólogos foram patogênicos em tubérculos de batata.

Outras ferramentas disponíveis para a identificação das espécies, tais como a hibridização de DNA e atributos fisiológicos (utilização de açúcares, faixa de temperatura e pH para o crescimento, etc.), juntamente com características

morfológicas e culturais analisadas no presente trabalho, não permitem até o momento distinguir alguns isolados saprofíticos dos patogênicos à batata (Lambert & Loria, 1989; Bouček *et al.*, 2000; Loria *et al.*, 2001).

TABELA 4 - Reação dos anti-soros *b, b₃ e o* com os antígenos (isolados) de *Streptomyces* spp. oriundos de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*)

Antígeno	Anti-soros*		
	<i>b</i>	<i>b₃</i>	<i>o</i>
<i>a</i>	-	-	-
<i>b</i>	++	-	-
<i>b₂</i>	-	-	-
<i>b₃</i>	-	+	-
<i>c</i>	-	-	-
<i>d</i>	-	-	-
<i>e</i>	-	-	-
<i>f</i>	+	+	+
<i>g</i>	-	-	-
<i>h</i>	-	-	-
<i>i</i>	-	-	+
<i>j</i>	-	-	-
<i>l</i>	-	-	-
<i>m</i>	-	-	-
<i>n</i>	-	-	-
<i>o</i>	-	-	+
<i>p</i>	-	-	-
<i>q</i>	+	-	-
<i>r</i>	-	-	-

* Reação antígeno – anti-soro: - Ausência de linha de precipitação; + uma linha de precipitação; ++ duas linhas de precipitação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à bióloga Sílvia de Afonseca Lourenço pelo auxílio na condução do experimento e ao Engenheiro Agrônomo Natalino Y. Shimoyama pelo fornecimento dos tubérculos de batata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUCHEK, M.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., *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:91-99. 2000.
- FAUCHER, E., SAVARD, T. & BEAULIEU, C. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14:197-202. 1992.
- 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* 45:222-225. 1995.
- GOYER, C., FAUCHER, E. & BEAULIEU, C. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:635-639. 1996a.
- GOYER, C., OTRYSKO, B. & BEAULIEU, C. Taxonomic studies on streptomycetes causing potato common scab: a review. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18:107-201. 1996b.
- HEALY, F.C., 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* 38:794-804. 2000.
- HO, W.C. & KO, W.H.; Alkalized water agar as a selective medium for enumerating soil actinomycetes. *Phytopathology* 69:1031. 1979.
- HSU, S.C. & LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *American Society for Microbiology* 29:422-426. 1975.
- KIM, J.S., PARK, D.H., LIM, C.K., CHOI, Y.C., HANHM, H.I. & CHO, W.D. Potato common scab by *Streptomyces turgidiscabies*. *Korean Journal of Plant Pathology* 14:551-554. 1998.
- KING, R.R., LAWRENCE, C.H. & CLARK, M.C. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infect tubers. *Journal of American Potato Association* 68:675-680. 1991.
- LABRUYÈRE, R.E. Common scab and its control in seed potato crops. *Centre for Agricultural Publishing and Documentation* 767:1-72. 1971.
- LAMBERT, D.H. & LORIA, R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:387-392. 1989.
- LAWRENCE, C.H. A method of isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Canadian Journal of Botany* 34:44-47. 1956.
- LINGAPPA, Y. & LOCKWOOD, J.L. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology* 52:317-323. 1962.
- LOPES, C.A. Doenças causadas por bactérias em batata. *Informe Agropecuário* 18:36-53. 1996.
- LORANG, J.M., LIU, D., ANDERSON, N.A. & SCHOTTEL, J.L. Identification of potato scab inducing and suppressive species of *Streptomyces*. *Phytopathology* 85:261-268. 1995.
- LORIA, R., CLARK, C.A. BUKHALID, R.A. & FRY, B. A. *Streptomyces* spp. In: Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. (Eds). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd ed. St. Paul, American Phytopathological Society. 2001. pp.236-249.
- MIYAJIMA, K., TANAKA, F., TAKEUCHI, T. & KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:495-502. 1998.
- MOYER, J.W. & ECHANDI, E. Serological detection and identification of *Streptomyces ipomoea*. *Plant Disease* 70:516-518. 1986.
- SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16:313-340. 1966.
- 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* 46:476-479. 1996.
- TASHIRO, N., MIYASHITA, K. & SUZUI, T. Taxonomic studies on the *Streptomyces* species isolated as causal organisms of potato common scab. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56:73-82. 1990.
- 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* 48:575-585. 2001.
- TSAO, P.H., LEBEN, C. & KEITT, G.W. An enrichment method for isolating actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. *Phytopathology* 50:88-89. 1960.
- WATERER, D. Impact of high soil pH on potato yields and grade losses to common scab. *Canadian Journal of Plant Science* 82:585-586. 2002.