**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

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

Ely Oliveira Garcia

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2008**

Ely Oliveira Garcia
Engenheiro Agrônomo

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

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Garcia, Ely Oliveira

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 / Ely Oliveira Garcia. -- Piracicaba, 2008.
92 p. : il.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Batata 2. Bioquímica vegetal 3. Fitopatógenos 4. Microscopia eletrônica 5. Sorgo
6. Streptomyces 7. Toxinas I. I. Título

CDD 633.491
G216r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus, por sua fidelidade nas realizações.

*Aos meus pais **Luiz e Joselina**, e meus irmãos **Eliseu e Elias**.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores **Dr. Russel King** (Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch, Fredericton Research Center - Canada), professor **Dr. Keijji Hasumi** (Tokio Noko University - Japão), **Dr. Carlos Roberto Casela** (Embrapa Milho e Sorgo), **Dra. Suzete L. Destéfano**, **Dr. Júlio Rodrigues Neto**, **Dr. Luis Otávio S. Beriam e Msc. Irene Gatti de Almeida** (Instituto Biológico de São Paulo – Setor de Bacteriologia) pelo apoio e fornecimento de material para o desenvolvimento desta obra.

Ao professor Dr. **Sérgio F. Pascholati**, não apenas pela orientação, mas pela grande amizade e apoio para o desenvolvimento desta obra.

A todos os professores do setor de Fitopatologia da Esalq, que souberam ensinar muito mais do que apenas técnicas, mas também respeito e humildade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica, Fitopatológica, Silvia Blumer, Leonardo Toffano, André Boldrin Beltrame, Marizete de Fátima Pimentel Godoy, Patrícia Cia, Dirceu Macagnan, Maria Cristina Canale Rappussi da Silva, Odair José Kuhn, Marisa Silveira Almeida Renaud Faulin, Nívea Maria Tonucci Zanardo, Ricardo Ferrari Silva, Maurício Batista Fialho e Ariana Elisei Vilela pelo convívio alegre e descontraído.

Aos amigos Ivan Fisher, Fabrício, Davi, Ana Carolina Alves, Bárbara, Isolda, Alessandra, Vanessa, Raphaele, Érika, Renata Gomes e Eliane pelos bons momentos compartilhados.

Aos funcionários do setor de Fitopatologia da Esalq, em especial a Carmem, Heloísa, Fernanda, Rodolfo, Pedro, Liliane, Márcia, e Sylvia, que participaram de alguma forma em atividades referentes a esta tese.

A todos que de uma forma ou de outra participaram da realização desta obra.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** pela concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências.....	15
 2 RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE BATATA A ISOLADOS DE <i>Streptomyces</i> spp. EXIBINDO DIFERENTES NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE CONCANAMICINAS, E SENSIBILIDADE DE TUBÉRCULOS À FITOTOXINA TAXTOMINA A.....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19
2.1 Introdução	19
2.2 Desenvolvimento	21
2.2.1 Revisão bibliográfica	21
2.2.1.1 Importância econômica da cultura da batata	21
2.2.1.2 Sarna comum da batata e espécies de <i>Streptomyces</i> relacionadas	21
2.2.1.3 Fitotoxinas de <i>Streptomyces</i> spp.	23
2.2.2 Material e métodos	33
2.2.2.1 Resistência de cultivares de batata à sarna comum	33
2.2.2.1.1 Planta teste	33
2.2.2.1.2 Isolados de <i>Streptomyces</i> spp.	33
2.2.2.1.3 Produção e extração das fitotoxinas	34
2.2.2.1.4 Identificação da fitotoxina taxtomina A	35
2.2.2.1.5 Quantificação da concentração de concanamidas A e B e taxtomina A nos extratos	36
2.2.2.1.6 Reação de cultivares comerciais ao patógeno.....	37
2.2.2.1.7 Plantio dos tubérculos e condução do ensaio	37
2.2.2.1.8 Avaliação dos resultados	38
2.2.2.2 Sensibilidade de tubérculos de cultivares de batata a taxtomina A	40
2.2.3 Resultados e discussão	41

2.2.3.1	Resistência de cultivares de batata à sarna comum	41
2.2.3.1.1	Identificação e quantificação da produção de fitotoxinas pelos isolados de <i>Streptomyces</i> spp.	41
2.2.3.1.2	Reação dos cultivares de batata ao patógeno	46
2.2.3.2	Sensibilidade de cultivares de batata a taxtomina A	52
2.3	Conclusões	54
	Referências	54

3	ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS CAUSADAS PELA TAXTOMINA A, PRODUZIDA por <i>Streptomyces</i> spp., SOBRE PLÂNTULAS DE SORGO (<i>Sorghum bicolor</i>)	60
	Resumo	60
	Abstract	60
3.1	Introdução	61
3.2	Desenvolvimento	63
3.2.1	Revisão bibliográfica	63
3.2.2	Material e métodos	71
3.2.2.1	Obtenção e purificação da taxtomina A	71
3.2.2.2	Alterações ultraestruturais causados pela taxtomina A	73
3.2.2.2.1	Bioensaio com a fitotoxina	73
3.2.2.2.2	Preparação de amostras para MET	73
3.2.2.2.3	Ultramicrotomia	74
3.2.2.3	Alterações bioquímicas causados pela taxtomina A	74
3.2.2.3.1	Bioensaio com a fitotoxina	74
3.2.2.3.2	Avaliação da redução do crescimento	75
3.2.2.3.3	Quantificação de clorofilas A e B	75
3.2.2.3.4	Permeabilidade seletiva da membrana plasmática	75
3.2.2.3.5	Bioensaio de fitoalexinas	76
3.2.3	Resultados e discussão	76

3.2.3.1	Alterações ultraestruturais causados pela taxtomina A	76
3.2.3.2	Alterações bioquímicas causados pela taxtomina A	80
3.2.3.3	Correlações entre as análises ultraestruturais e bioquímicas	84
3.3	Conclusões	86
	Referências	86
	ANEXO	91

RESUMO

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

O gênero *Streptomyces* constitui-se em um grupo diferenciado de procariotos fitopatogênicos, por serem morfologicamente similares aos fungos e produzirem diversos importantes metabólitos secundários. A sarna comum da batata é principal doença causada pelo gênero. O principal agente causal da doença, *Streptomyces scabies*, produz fitotoxinas denominadas concanamicinas, porém, não foi comprovada a importância da produção das mesmas na agressividade dos isolados de *S. scabies*. Dessa forma, neste trabalho procurou-se avaliar a reação dos cultivares mais plantados no Brasil a isolados de *S. scabies* exibindo diferentes níveis de produção de concanamicinas. O nível de produção de concanamicinas A e B de dez isolados de *Streptomyces* spp. foi avaliado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e dois isolados (produtor de alto nível da toxina; baixo produtor) foram selecionados e utilizados na avaliação da resistência de seis cultivares de batata em casa de vegetação. Vasos contendo o substrato esterilizado receberam a suspensão de esporos bacterianos junto com os tubérculos sadios no momento do plantio e após quatro meses, a severidade da doença foi avaliada. Os resultados demonstraram aumento na agressividade do isolado produtor de elevadas quantidades de concanamicinas apenas sobre os cultivares Mondial, Monalisa e Asterix. Por sua vez, os resultados da avaliação do nível de resistência ao patógeno demonstraram que os cultivares Monalisa, Ágata, Asterix e Cupido são suscetíveis e os cultivares Atlantic e Mondial mostraram-se resistentes aos dois isolados de *Streptomyces* spp. avaliados. Por outro lado, a fitotoxina taxtomina A é a toxina mais frequentemente produzida pelas espécies fitopatogênicas de *Streptomyces* spp. O estudo do mecanismo de ação desta fitotoxina poderá auxiliar no entendimento de sua contribuição no desenvolvimento da doença. A taxtomina A é uma fitotoxina não específica e causa efeitos semelhantes em plantas de diferentes famílias botânicas. Desta forma, modificações citológicas, ultraestruturais e bioquímicas induzidas pela taxtomina A foram analisadas em plântulas de sorgo. Os tecidos foram tratados com taxtomina A e avaliados após sete dias do tratamento. Observou-se desorganização em todas as células dos tecidos tratados com a taxtomina A. A membrana plasmática das células do mesofilo foliar foi retraída e destacada da parede celular em diversos pontos. Entretanto, o plasmalema não pareceu rompido. O efeito sobre a permeabilidade seletiva da membrana plasmática também foi avaliado bioquimicamente, onde foi observado aumentos na saída de eletrólitos. Os cloroplastos apresentaram deformações na superfície e perda de turgidez. Estas deformações provavelmente contribuíram para a redução do teor de clorofilas A e B. As plântulas também apresentaram elevado acúmulo

de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas. Desta forma, conclui-se que a taxtomina A age principalmente sobre a membrana plasmática e organelas membranosas. Em contrapartida, o acúmulo de fitoalexinas evidencia que concentrações mínimas desta toxina podem ser exploradas como eliciador da resposta de defesa em plantas.

Palavras-chave: *Streptomyces* spp.; *Solanum tuberosum*; *Sorghum bicolor*; Taxtomina A; Concanamicinas; Sarna comum da batata; Microscopia eletrônica de transmissão

ABSTRACT

Resistance of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) to common scabies (*Streptomyces* spp.) and action mechanism of the phytotoxin thaxtomin A in sorghum (*Sorghum bicolor*): biochemical and ultrastructural aspects

The genus *Streptomyces* is a different prokaryote phytopathogen group, being morphologically similar to fungi and able to produce several important secondary metabolites. The potato common scabies is the main plant disease caused by the members of the genus. The main causal agent of the plant disease, *Streptomyces scabies*, is able to produce the phytoxins concanamycins. However, the importance of these toxins in the aggressiveness of *S. scabies* strains was not proven. This research aimed to evaluate the reaction of main potato cultivars used in Brazil to *Streptomyces* spp. strains, exhibiting different levels of concanamycins production. The toxin production by several strains was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) and two strains (higher and lower producers) were chosen and used for resistance evaluation of six potato cultivars under greenhouse. Pots containing sterile substratum received a suspension of bacterial spores and the healthy seed tubers at the same time. After four months, the level of disease was evaluated and the results showed increasing in aggressiveness for the higher concanamycins producer only in the Mondial, Monalisa and Asterix cultivars. For the two strains, the cultivars Atlantic and Mondial were resistant and the cultivars Monalisa, Cupido, Ágata and Asterix were susceptible. On the other hand, the thaxtomin A is the main phytotoxin of plant pathogenic *Streptomyces* spp. Therefore, the study of the thaxtomin A action mechanism is important to explain its contribution to disease development. The thaxtomin A is not a specific toxin and causes similar effect in several plants of different botanical families. Thus, the cytological, ultrastructural and biochemical modifications induced by thaxtomin A were evaluated in sorghum seedlings. Leaf tissues of seedlings were treated with high levels of thaxtomin A and evaluated 7 days after treatment. Cytological disorganization was observed in all treated cells. The plasmma membrane of the cells of immature leaves was detached from the wall in several places. However, plasmmalema did not seem degraded. The chloroplasts had showed significant deformations in the surface and volume reduction. Theses changes in chloroplasts probably contributed for the reduction of chlorophylls A and B levels. The sorghum seedlings also showed high phytoalexin accumulation (deoxiantocianydins) in response to thaxtomin A treatment. Thus, the thaxtomin A acts mainly on plasmma membrane and membranous organelles, causing plasmolises, cell disorganization, deformations in chloroplasts and chlorophyll reduction in sorghum seedlings. Finally, the accumulation of phytoalexins in response to thaxtomin A treatment points out it potential to induce resistance in plants.

Keywords: *Streptomyces* spp.; *Solanum tuberosum*; *Sorghum bicolor*; Concanamycins; Thaxtomin A; Potato common scab; Electron transmission microscopy

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Streptomyces* constitui-se em um grupo diferenciado de fitopatógenos se distinguindo dos demais procariotos por serem filamentosos, não septados, como os fungos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; LORIA et al., 2008). O gênero é conhecido pela capacidade de produção de metabólitos secundários, destacando-se diversos antibióticos, como a estreptomicina (GOODFELLOW; WILLIAMS; MORDARSKI, 1988; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Estes compostos auxiliam na sobrevivência destas bactérias e garantem a competitividade com a microbiota no solo. Outro metabólito conhecido como abamectina, princípio ativo do Vertimec[®], foi isolado de *Streptomyces avermectilis*, sendo amplamente utilizado como acaricida e inseticida na agricultura. Os genes que codificam estes compostos já foram clonados e caracterizados (MURACAMI et al., 1986).

Fitotoxinas são compostos secundários de baixa massa molecular produzidos por fitopatógenos com a capacidade de afetar o metabolismo da célula da hospedeira e/ou sua estrutura, a ponto de causar a sua morte. As fitotoxinas não têm ação enzimática ou hormonal, mas interferem com a seletividade e/ou a estrutura das membranas plasmática, do retículo endoplasmático e das organelas, como mitocôndrias e cloroplastos. Podem ainda agir como inibidores enzimáticos ou funcionar como antimetabólitos, provocando deficiências nutricionais (DURBIN, 1981).

As espécies fitopatogênicas do gênero *Streptomyces*, possuem seu mecanismo de patogenicidade ligado a produção de fitotoxinas, dentre as quais se destacam as concanamicinas e a taxtamina A. As concanamicinas são toxinas que se classificam como não-seletiva ou não-específica capaz de causar danos em diferentes culturas de diferentes famílias botânicas. Bioensaios com esta fitotoxina purificada mostraram drástica redução de crescimento em plântulas de alfafa, arroz e rabanete (NATSUNAME et al. 2005). As concanamicinas são inibidores da ATPase, não só de plantas, mas também de vários microrganismos (HUSS et al., 2002) e sua produção foi relatada apenas para *S. scabies*., principal agente causal da sarna comum da batata. Em contrapartida, as taxtominas foram relatadas para

maioria das espécies fitopatogênicas. Apesar de sua importância, o mecanismo de ação da taxtomina A, ainda não é perfeitamente conhecido. Esta atua principalmente sobre a deposição de celulose na parede de células vegetais e altera a permeabilidade seletiva da membrana plasmática (LORIA; KERS; JOSHI, 2006; LORIA et al., 2008). Secções transversais das raízes e dos caules de plantas tratadas com taxtomina A revelaram que o tecido sofre deformações devido à hipertrofia celular, mas, não ocorrendo aumento no número de células (LEINER et al., 1996). Células meristemáticas de raízes de batata tratadas com taxtomina A apresentaram a atividade mitótica reduzida, bem como a desorganização dos cromossomos condensados (LORIA et al., 1997). Em contrapartida, a fitotoxina taxtomina A tem demonstrado propriedades eliciadoras, provocando acúmulo de fitoalexinas em sorgo (*Sorghum bicolor*) e induzindo resistência em plantas (GARCIA; PASCHOLATI; ALMEIDA, 2007). Por se tratar de um dipeptídeo, sua absorção e translocação nas plantas é facilitada, além disso, a taxtomina A em baixas concentrações pode causar hipertrofia em tecidos vegetais (FRY; LORIA, 2002).

Durante os últimos 20 anos, diversas revisões abordaram a seleção *in vitro* de genótipos de plantas resistentes a doenças (HELGESON ; DEVERALL, 1983; WENZEL, 1985; DAUB, 1986) e a utilização de fitotoxinas na seleção de plantas resistentes a fitopatógenos (DURBIN, 1981; HENSEL; HOLDEN, 1996; WALTON, 1996; HUANG, 2001). O avanço da biotecnologia e a utilização destes compostos fitotóxicos poderão auxiliar na seleção de plantas resistentes ao patógeno. Assim, uma direção interessante para estes estudos é a seleção de material vegetal resistente em sistemas *in vitro* e a conseqüente aplicação no controle genético da doença (LEBEDA et al., 2001).

A resistência varietal representa uma das principais formas de controle de doenças. O controle genético proporciona redução no uso de defensivos e o conseqüente aumento de lucro para o produtor. A sarna comum da batata era uma doença considerada por muitos anos sem importância no Brasil, mas recentemente, a sua importância vem crescendo. A literatura descreve perdas de até 83% para alguns dos cultivares de batata mais plantados no Brasil (NUNES,

2002). O histórico da cultura da batata no Brasil indica um aumento no número de reclamações sobre a ocorrência da sarna comum nestes últimos anos (FISCHER et al., 2005), a qual constitui-se em doença de elevada gravidade seja pelos prejuízos causados ou pela dificuldade de seu controle. Adicionalmente, no Brasil, não se conhece o grau de resistência das cultivares de batata mais importantes à sarna comum.

Neste trabalho foram conduzidos experimentos objetivando verificar a resistência de cultivares de batata a isolados de *Streptomyces* spp. exibindo diferentes níveis de produção de concanamidas, o desenvolvimento de um método *in vitro* utilizando a taxtomina A para seleção de genótipos resistentes ao patógeno e o estudo do mecanismo de ação da taxtomina A, avaliando-se alterações bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais em tecidos de sorgo.

Referências

- DAUB, M.E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p.159–186, 1986.
- DURBIN, R.D. (Ed.). **Toxins in plant diseases**. New York: Academic Press, 1981. 536 p.
- FISCHER, I.H.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; KIMATI, H. Efeito de fertilizantes e fungicidas no controle de *Streptomyces scabies* em batata. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, p.236-240, 2005.
- FRY, B.A.; LORIA, R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.60, p.1-8, 2002.
- GARCIA, E.O.; PASCHOLATI, S.F.; ALMEIDA, M. Potencial eliciador de fitoalexinas e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 32, p. 246, 2007. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., 2007, Maringá.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in biotechnology**. London: Academic Press, 1988. 501 p.

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

HUANG J.S. **Plant pathogenesis and resistance**: biochemistry and physiology of plant–microbe interactions. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 285 p.

HUSS, M.; INGENHORS, G.; KÖNIG, S.; GAßEL, M.; DRÖSE, S.; ZEECK, A.; ALTENDORF, K.; WIECZOREK, H. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 40544–40548, 2002.

LEBEDA, A.; LUHOVA, L.; SEDLA, R.M.; JANCOVA, D. The role of enzymes in plant–fungal pathogens interactions. **Journal of Plant Disease Protection**, London, v. 108, p. 89–111, 2001.

LEINER, R.H.; FRY, B.A.; CARLING, D.E.; LORIA, R. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 709-713, 1996.

LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A.; KING, R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Plant Disease**, St Paul, v. 81, p. 836-846, 1997.

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

LORIA, R.; BIGNELL, D.R.D.; MOLL, SIMON.; HUGUET-TAPIA, J.C.; JOSHI, M.V.; JOHNSON, E.G.; SEIPKE, R.F.; GIBSON, D.G. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 93, p. 3-10, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10th ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MURAKAMI, T.; ANZAI, H.; IMAI, S.; SATOH, A.; NAGAOKA, K.; THOMPSON, C.J. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 205, p. 42-50, 1986.

NATSUNAME, M.; KOMIYA, M.; KOYANAGI, F.; TASHIRO, N.; KAWAIDE, H.; ABE, H. Phytotoxin produced by *Streptomyces* spp. causing potato russet scab in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Berlin, v. 71, p. 364-369, 2005.

NUNES, M.U.C. Produtividade e principais problemas fitossanitários de cultivares de batata em Sergipe. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 20, p. 424-427, 2002.

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

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

2 RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE BATATA À ISOLADOS DE *Streptomyces* spp. EXIBINDO DIFERENTES NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE CONCANAMICINAS, E SENSIBILIDADE DE TUBÉRCULOS À FITOTOXINA TAXTOMINA A

Resumo

A sarna comum da batata é causada por diferentes espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Os prejuízos causados pela doença em nosso país são pouco conhecidos em função da ausência de levantamentos. Porém, recentemente a ocorrência desta doença começou a crescer e consideráveis perdas foram relatadas. A avaliação do nível de resistência dos principais cultivares de batata plantados no Brasil é necessário para o controle genético da doença. O principal agente causal da doença, *Streptomyces scabies*, produz um tipo de fitotoxina, denominada concanamicanas, isolada de lesões de sarna comum. Porém, até o momento não foi comprovada a importância da produção das concanamicanas na agressividade dos isolados de *S. scabies*. Dessa forma, neste trabalho procurou-se avaliar a reação dos cultivares de batata mais plantados no Brasil a isolados de *Streptomyces* spp. com diferentes níveis de produção de fitotoxinas. O nível de produção de concanamicina A e B de dez isolados de *Streptomyces* spp. foi avaliado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Dois isolados foram selecionados, sendo o primeiro produtor de alta quantidade de concanamicanas e o segundo baixo produtor. Estes isolados foram utilizados para avaliação da resistência dos seis cultivares de batata, sendo que após quatro meses, os resultados demonstraram aumento na agressividade do isolado produtor de altos níveis de concanamicanas apenas sobre os cultivares Mondial, Monalisa e Asterix. Os cultivares Monalisa, Ágata, Asterix e Cupido mostraram-se suscetíveis e os cultivares Atlantic e Mondial mostraram-se resistentes aos dois isolados avaliados. Foram também realizados ensaios visando avaliar a sensibilidade de tubérculos dos cultivares de batata à fitotoxina taxtomina A. Os resultados demonstraram similaridade da reação ao patógeno e a sensibilidade à taxtomina A. Desta forma, se conclui que outros fatores podem estar envolvidos, além da produção de fitotoxinas na agressividade dos isolados de *Streptomyces* spp.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*; Taxtomina A; Concanamicinas; Sarna comum da batata; *Streptomyces* spp.

RESISTANCE OF POTATO CULTIVARS TO *Streptomyces* spp. EXHIBTING DIFFERENT LEVELS OF CONCANAMYNS PRODUCTION, AND SENSIBILITY OF POTATO TUBERS TO THAXTOMIN A

Abstract

Potato common scab is caused by different bacterial species from the genus *Streptomyces*. In Brazil, the losses caused by this disease are unknown yet. However, recently the occurrence of the disease started to increase. The evaluation of the resistance levels of the main potato cultivars grown in Brazil is necessary to disease control. The main causal agent of the plant disease, *Streptomyces scabies*, produces the phytotoxins concanamycins. However, the importance of this phytotoxin production in the aggressiveness is not proven yet. Thus, this work evaluated the reaction of potato cultivars planted in Brazil against *Streptomyces* spp. strains with different levels of phytotoxin production. The production level of concanamycins A and B from ten *Streptomyces* spp. strains was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). Two strains were selected, the first a higher producer and the second one a lower concanamycins producer. The same strains were used to evaluate the resistance of six potato cultivar under green house. After four months, the results showed increased aggressiveness for the higher concanamycins producer only in the Mondial, Monalisa and Asterix cultivars. For the two strains, the cultivars Atlantic and Mondial were resistant and cultivars Monalisa, Cupido, Ágata and Asterix were susceptible. An assay for thaxtomin A sensibility was also carried out with sections of potato tubers. The results were similar to these seen for the pathogen aggressiveness and the potato thaxtomin sensibility. Thus, it is concluded that other factors can be involved in aggressiveness, besides the phytotoxins production in *Streptomyces* spp. strains.

Keywords: Potato common scab; *Streptomyces* spp.; *Solanum tuberosum*; Concanamycins; Thaxtomin A

2.1 Introdução

O principal objetivo da fitopatologia é o controle de doenças de plantas, o que gera grande investimento em pesquisa. Portanto, o controle e a prevenção das doenças devem ser considerados no uso de medidas que reduzam o impacto ambiental. O uso de cultivares resistentes proporciona redução no uso de

defensivos e o conseqüente aumento de lucros para o produtor e a redução no impacto ambiental (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995).

O histórico da cultura da batata no Brasil indica um aumento no número de reclamações sobre a ocorrência da sarna comum nestes últimos anos (FISCHER et al., 2005), a qual constitui-se em doença de elevada gravidade seja pelos prejuízos causados ou pela dificuldade de seu controle. Adicionalmente, não se conhece em nosso meio, o grau de resistência dos cultivares de batata à sarna comum.

A sarna comum é uma doença relatada em todas as áreas produtoras de batata do mundo (LORIA et al., 1997). Visto que a cultura da batata ocupa lugar de destaque na economia mundial entre as demais culturas destinadas a alimentação, a sarna comum se constitui em fator de perdas econômicas.

Os mecanismos de defesa das plantas envolvem barreiras químicas pré e pós-formadas que conferem resistência a uma variedade de patógenos. Os mecanismos de ataque dos patógenos envolvem um arsenal bioquímico, onde se podem destacar as toxinas. Porém, as toxinas produzidas por bactérias fitopatogênicas possuem papel potencial na seleção *in vitro* de genótipos de plantas resistentes a doenças (LEBEDA et al., 2001).

S. scabies, principal agente causal da sarna comum da batata, produz dois tipos de fitotoxinas, denominadas concanamícinas e taxtominas (NATSUNAME et al., 2005). A literatura descreve uma correlação entre os níveis de produção de taxtamina A e a capacidade de causar doença pelos isolados do patógeno (KING et al., 1996). Porém, recentemente, alguns trabalhos científicos evidenciaram a possível participação de outros fatores, como a produção de concanamícinas, enzimas, entre outros, na agressividade dos isolados. Desta forma, é necessário se avaliar a influência de outros fatores na agressividade dos isolados de *Streptomyces* spp (PARK et al., 2003).

Este trabalho avaliou o nível de resistência à sarna comum dos principais cultivares de batata plantados no Brasil, utilizando-se isolados de *Streptomyces* spp. com diferentes níveis de produção de concanamícinas, avaliando-se a participação desta toxina na agressividade dos mesmos. Procurou-se também

desenvolver um teste *in vitro* utilizando a taxtomina A, como ferramenta auxiliar na seleção de cultivares de batata resistentes á sarna comum.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

2.2.1.1 Importância econômica da cultura da batata

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) atualmente ocupa o quarto lugar em importância mundial entre as culturas destinadas à alimentação (FIGUEIRA, 2003). A produção brasileira de tubérculos é de aproximadamente 2,9 milhões de toneladas provenientes de uma superfície cultivada de 135.000 hectares (FAO, 2008). O Estado de São Paulo contribui com aproximadamente 780.000 ton distribuídas em 32.000 ha (BRASIL, 2008). A cadeia produtiva envolve considerável volume de recursos e significativa mão-de-obra, estimando-se que 25.000 famílias ocupam-se diretamente na produção (PEREIRA; DANIELS, 2003). Em relação ao custo de produção da cultura, os principais componentes são: sementes (35 %), fertilizantes (15 %), defensivos (15 %) e mão-de-obra (10 %) (EMBRAPA, 1999). Neste cenário, a preocupação em melhorar a qualidade fitossanitária e reduzir os custos de produção é uma constante dos pesquisadores (FAVORETTO, 1990).

2.2.1.2 Sarna comum da batata e espécies de *Streptomyces* relacionadas

A sarna comum da batata se caracteriza pela formação de lesões corticosas, superficiais ou profundas, as quais causam depreciação dos tubérculos, especialmente aqueles destinados ao comércio *in natura* (SOUZA DIAS; IMAUTI, 2005). Esta doença é causada por bactérias pertencentes a diferentes espécies do gênero *Streptomyces*, as quais são Gram positivas, formadoras de esporos em cadeias e pseudomicélio filamentoso, estruturas estas normalmente encontradas em fungos. As cadeias de esporos originam-se a partir

da fragmentação de hifas aéreas que se formam acima do substrato. A forma da cadeia de esporos, espiralada ou retilínea, é uma importante característica taxonômica (SHIRLING; GOTTIEB, 1966; LORIA et al., 2001). A espécie mais comum, relatada em diferentes regiões onde a batata é cultivada, é *Streptomyces scabies* (Thaxt.) Lambert & Loria (LORIA et al., 1997). No Brasil, acredita-se que está espécie também seja a mais freqüente, porém demanda-se de levantamentos que confirmem essa informação.

Espécies de *Streptomyces* constituem-se em grupo distinto de fitopatógenos, possuindo características similares as dos fungos. Seus filamentos penetram e colonizam a matéria orgânica presente no solo. A nutrição se dá pela secreção de enzimas hidrolíticas, que degradam o substrato orgânico quebrando-o em moléculas assimiláveis (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Estas bactérias são gram positivas e possuem alta proporção de guanina e citosina no DNA, e muitas espécies possuem apenas um único cromossomo linear (LIN et al., 1993).

Mais de 500 espécies de *Streptomyces* já foram descritas, sendo a grande maioria representada por saprófitas. Com comentado, apenas uma pequena parte destas espécies são fitopatogênicas, sendo as infecções limitadas aos órgãos subterrâneos e os primeiros sintomas que aparecem são do tipo necrótico (LORIA et al., 1997).

Outras espécies do gênero *Streptomyces* podem atacar a batata, causando sintomas do tipo sarna comum ou lesões superficiais. Ao todo pelo menos 13 espécies distintas de *Streptomyces* incidem sobre a cultura: *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. caviscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. euroeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. reticuliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. niveiscabiei*, *S. aureofaciens*, *S. setonii* e *S. sampsonii*. Destaca-se também *Streptomyces ipomoeae* que ataca a batata-doce (DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2006). As espécies de *Streptomyces* que infectam a batata podem também atacar outras culturas como beterraba, rabanete, repolho, nabo amendoim, salsa e cucurbitáceas (JONES, 1931; LORIA et al., 1997).

As interações entre as diferentes espécies de *Streptomyces* exibindo distintos graus de agressividade e variabilidade fisiológica, com as diferentes

variedades de batata exibindo diferentes níveis de resistência ao patógeno, podem dar origem a diferentes sintomas, além da sarna comum. Um deles é a sarna reticulada caracterizada por lesões superficiais necróticas e ásperas limitadas à periderme do tubérculo, as quais assumem aspecto de rede (BANG, 1979; SCHOLTE; LABRUYERE, 1985). Porém, estas nunca ocorrem em elevação ou profundidade como a sarna comum. Uma variante da sarna reticulada é a sarna ferruginosa, que adicionalmente às lesões com aspecto de rede, apresenta coloração avermelhada nas regiões sintomáticas (HARRISON, 1962). Adicionalmente à *S. scabies*, as espécies *S. aureofacies* e *S. griseus* são listadas como responsáveis pela sarna reticulada e ferruginosa (FAUCHER et al., 1993).

No Brasil, a sarna comum e a reticulada podem causar significativas perdas econômicas, porém relatos a respeito da ocorrência desses patógenos em nosso meio são escassos. Estudos envolvendo a identificação de isolados nacionais são de extrema importância para o conhecimento das populações que ocorrem em nosso meio, sendo indispensáveis para estudos epidemiológicos, bem como para a elaboração de estratégias de controle da doença (DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2006).

2.2.1.3 Fitotoxinas de *Streptomyces* spp.

Fitotoxinas são moléculas de baixo peso molecular (<1000 daltons), e ativas em baixas concentrações fisiológicas (10^{-6} – 10^{-8} M) (GOODMAN; KIRALY; WOOD, 1986). Estas podem interferir em passos metabólicos essenciais a planta e/ou desencadear mecanismos de defesa da mesma (PASCHOLATI, 1995).

Fitobactérias sintetizam toxinas por uma questão de sobrevivência (JENNINGS et al., 1998). Uma vez que as plantas são reservatórios abundantes de nutrientes, a produção de fitotoxinas é um das muitas e sofisticadas ferramentas de que o patógeno dispõe para combater os mecanismos de defesa da planta e poder utilizar esses nutrientes. Do ponto de vista do fitopatógeno, se é que ele tem um, a planta é apenas mais um habitat ou um nicho repleto de nutrientes que ele pode utilizar se conseguir (ABRAMOVITCH; MARTIN, 2004).

As fitotoxinas bacterianas são compostos de classificação química variada, sendo que todas as fitotoxinas são não seletivas, sendo ativas a diversas famílias botânicas (JENNINGS et al., 1998).

Especulações a respeito da possível produção de fitotoxinas como mecanismo de patogenicidade de *Streptomyces* datam do início do século passado (FELLOWS, 1926). Porém, a confirmação dessa hipótese somente concretizou-se com o trabalho de Russel King e colaboradores (KING et al., 1989), que isolaram e caracterizaram uma fitotoxina responsável pela necrose de tecidos de tubérculos de batata. A fitotoxina teve a sua estrutura definida e caracterizada como sendo uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina, um dipeptídeo (Figura 1 A), derivado da fenilalanina e um aminoácido triptofano com radical nitrato (KING et al., 1989) (Figuras 1 B e C). A biosíntese da taxtomina, um dipeptídeo, ocorre por via não-ribossomal (LORIA et al., 2008). Esta fitotoxina passou a ser chamada de “Taxtomina” em homenagem ao pesquisador Roland Thaxter, o qual foi o primeiro a estabelecer a relação entre *S. scabies* e a sarna da batata (KING; LAWRENCE, 1996).

Figura 1 - Estruturas da taxtomina (A), principal fitotoxina de *Streptomyces* spp., e dos aminoácido que a compõem: aminoácido triptofano com um radical nitrato (B) e a fenilalanina (C)

A hipótese que sustenta a taxtomina como sendo uma das principais características responsáveis pela patogenicidade de *Streptomyces* é a correlação existente entre a produção da toxina e a agressividade do respectivo isolado

(KING et al., 1991). Mutantes de *S. scabies*, com reduzida produção da fitotoxina, mostraram-se também menos agressivos ou mesmo não patogênicos (GOYER et al., 1998). Taxtominas são fitotoxinas do tipo não seletivas uma vez que em baixas concentrações (0,1 μ M) interferem no crescimento de plantas de diferentes famílias botânicas, sejam estas mono ou dicotiledôneas (LEINER et al., 1996).

Healy et al. (2000) compararam os sintomas obtidos pelo tratamento de tubérculos de batata imaturos, utilizando o extrato do filtrado do meio cultivo de isolados de *S. acidiscabies* em meio líquido, reproduziram sintomas análogos aos da inoculação do patógeno. Os mesmos autores justificam a reprodução destes sintomas pelo fato da bactéria produzir taxtamina A no meio de cultivo.

A análise molecular de genes ligados a patogenicidade em *S. scabies* esclareceu a base genética das doenças classificadas como sarna comum e sarna profunda (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Com base no conhecimento atual do mecanismo da ação e da sintomatologia proporcionada pelas taxtominas, pode-se afirmar que a grande maioria das espécies de *Streptomyces* que induzem estes sintomas possui a capacidade de sintetizar taxtominas confirmada. As espécies de *Streptomyces* que produzem somente sintomas de sarna reticulada ou de sarna ferruginosa são excluídas desta generalização. Dessa maneira, essas doenças são causadas por outras espécies de *Streptomyces*, com exceção daquelas que causam a sarna comum, e a produção de taxtominas não está envolvida na patogenicidade. A presença de infecções na raiz parece ser importante para o aparecimento da doença ocasionada pelos agentes causais da sarna reticulada ou ferruginosa.

Atualmente, é conhecida mais de uma dezena de diferentes análogos de taxtominas (Figura 2) (LORIA et al., 1997). Um mesmo isolado de *Streptomyces* spp. pode produzir diferentes análogos, porém, a taxtamina A é encontrada em maior proporção em tecidos sintomáticos de batata. Segundo King et al. (1991), a proporção de taxtamina A em relação a taxtamina B, o segundo análogo mais abundante, é de 20:1.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₂	R ₄	R ₅
1	Me	OH	Me	H	OH	H
2	Me	OH	Me	OH	H	H
3	Me	H	H	H	H	H
4	Me	OH	Me	H	H	H
5	Me	H	Me	H	H	H
6	Me	OH	H	H	H	H
7	Me	OH	Me	H	H	OH
8	Me	OH	Me	H	OH	OH
9	Me	OH	H	H	OH	H
10	H	OH	Me	H	OH	H
11	H	H	H	H	H	H

Figura 2 - Estruturas das taxotominas produzidas por espécies fitopatogênicas de *Streptomyces*. Taxotomina A (composto n°1) é a mais abundante destas fitotoxinas produzidas por *S. scabies* em tecidos de batata. Por sua vez, a taxotomina C (composto n°3) é produzida por *S. ipomeae*, agente causal da sarna em batata doce.
(Adaptado de LORIA et al., 1997)

As lesões de sarna em batata-doce são causadas por *S. ipomoeae*, que produz principalmente as taxtomina C e A. As diferenças na regulação da produção da toxina, dos locais de infecção e da gama de hospedeiros tornam esse sistema interessante para a análise comparativa entre os agentes causais da sarna da batata. Entretanto, a análise genética das características patogênicas em *S. ipomoeae* ainda está incompleta (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Segundo Loria et al. (1995), as taxtominas podem ser produzidas tanto em secções de tubérculos de batata quanto em meio de cultivo *in vitro*. Estes autores quantificaram a produção de taxtomina A produzida pelo patógeno, a partir do seu cultivo em diferentes meios de cultura e observaram que o caldo obtido a partir da cocção de grãos de aveia em água, proporcionaram os resultados mais reprodutíveis para diferentes isolados do patógeno.

Além das taxtominas identificadas por King et al. (1992), *S. scabies*, principal agente causal da sarna comum da batata, também produz um segundo tipo de toxinas chamadas de concanamicinas (NATSUNAME et al., 1996, 1998, 2001, 2005). A função das concanamicinas na agressividade dos isolados ainda não foi completamente esclarecida. Os análogos mais comuns são concanamicinas A e B (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura moleculares das fitotoxinas concanamicina A e B, produzidas por *Streptomyces scabies*.

As concanamicinas são toxinas que se classifica como não-seletiva ou não-específicas capazes de causar danos em diferentes culturas de diferentes famílias botânicas. Bioensaios com esta fitotoxina purificada mostraram redução de crescimento em plântulas de alfafa, arroz e rabanete. Sabe-se que o principal mecanismo de ação das concanamicinas é a inibição da ATPase em estruturas ou organelas membranosas, como os vacúolos (HUSS et al., 2002). Porém este e outros mecanismos de ação, bem como o efeito sobre plântulas de diferentes famílias botânicas, ainda não foram completamente esclarecidos (HUSS et al., 2002; NATSUNAME et al., 2005).

Em vistas dos resultados obtidos para os vários agentes causais da sarna comum, nos quais se observou a capacidade de produção de fitotoxinas e o envolvimento destas no mecanismo de agressividade/patogenicidade, Natsunome et al. (2005), isolaram uma nova toxina presente em lesões de sarna ferruginosa em tubérculos de batata no Japão, as toxinas FD-891 (Figura 4).

FD-891

Figura 4 - Estrutura da fitotoxina FD-891 produzida por *Streptomyces chelonimii* e *Streptomyces* sp, agentes causais da sarna ferruginosa da batata

Foi constatado que isolados de *Streptomyces* spp. e *S. chelonimii*, agentes causais da sarna ferruginosa produziam a fitotoxina FD-891 também *in vitro* em condições análogas das de produção de taxtominas e concanamicinas (Tabela 1). Esta toxina também pertence a família das macrolinas, como as concanamicinas. Constatou-se que a capacidade de causar lesões em secções de tubérculos de

batata do cultivar Irish Cobbler é 100 vezes menor do que a da taxtomina A (Figura 5) (NATSUNAME et al., 2005).

Apesar de possuírem estrutura molecular diferentes, ambas as toxinas produzidas por espécies fitopatogênicas de *Streptomyces* spp. possuem ação e sintomas destas toxinas sobre diferentes plântulas são semelhantes, provocando redução de crescimento em plântulas tratadas com as mesmas (Figura 6).

Tabela 1 - Produção de fitotoxinas por espécies de *Streptomyces*, agentes causais da sarna comum e da sarna ferruginosa.
(Adaptado de NATSUNAME et al., 2005)

Isolado	Origem geográfica	Produção de fitotoxina (µg/mL de meio)		
		Taxtomina A	Concanamicina A + B	FD-891
Agentes causais da sarna comum				
S. scabies JCM 7914T	EUA	2,50	0,086	Nd ^a
S. acidiscabies JCM 7913T	EUA	5,31	Nd	Nd
S. turgidiscabies IFO 16080T	Japão-Hokkaido	2,37	Nd	Nd
Agentes causais da sarna ferruginosa				
S. cheloniumii MAFF 304020	Japão-Chiba	Nd	Nd	1,7
Streptomyces sp.				
MAFF 225003	Japão-Chiba	Nd	Nd	12,5
MAFF 225004	Japão-Chiba	Nd	Nd	0,1
MAFF 225005	Japão-Hokkaido	Nd	Nd	0,7
MAFF 225006	Japão-Ibaraki	Nd	Nd	6,1

^aNd - Não detectado. Limite de detecção de 0,003 ug/mL para taxtomina A; 0,002 ug/mL para concanamicina A + B; 0,004 ug/mL para FD-891.

As condições favoráveis para a produção de toxinas pelos isolados de *Streptomyces* spp. muitas vezes podem ser similares as do crescimento, produção de hifas aéreas ou esporulação favoráveis no solo. As condições do solo adequadas para a ocorrência da sarna da batata têm sido por muito tempo um tópico de estudo (KEINATH; LORIA, 1989; LORIA et al., 2001). Horsfall e colaboradores relataram que a severidade da sarna da batata é inversamente proporcional ao pH do solo e relacionada ao índice do cálcio solúvel nos solos (HORSFALL et al., 1954). Goto (1985) também descreveu que a severidade desta doença é afetada pelo pH do solo e pelo teor de cálcio solúvel. Outros autores discordaram, afirmando que a incidência de sarna está correlacionada com o solo pH mas não com a concentração do cálcio. Davis et al. (1976) relataram que o tratamento do solo com fosfato reduziu a porcentagem de sarna, além de mudar a morfologia das lesões. As diferenças nos resultados obtidos sobre o relacionamento entre as condições do solo e o aparecimento da sarna da batata podem ser atribuídas à diversidade do patógeno. A diferenciação das hifas aéreas dos actinomicetos, geralmente está relacionada à produção de metabólitos secundários, bem como a esporulação responsável para a propagação da doença no solo.

Natsunome et al. (2001) avaliaram a influencia do pH, fonte de fósforo, cálcio e temperatura sobre a produção das toxinas por *S. scabies* e *S. acidiscabies*. Para tanto, avalio-se a produção de taxtomina A e concanamicinas em meio de aveia-ágar. Os resultados demonstraram a influência destes fatores na produção de toxinas e que a variabilidade genética dos isolados proporcionaram níveis de influência distintos destes fatores na produção das toxinas (Figura 7).

Figura 7 - Crescimento bacteriano e produção de taxtomina A e concanamicina por quatro isolados de *Streptomyces* spp., causadores da sarna da batata. Os isolados foram pré-incubados em meio de aveia líquido e crescidos em 28°C por 3 dias em agitador orbital (150 rpm). Uma alíquota de 0,5 mL foi adicionada a 10 placas (9 cm diâmetro) contendo 10 mL de meio de aveia-ágar (pH 6.5) (meio basal) ou meio modificado. As placas foram incubadas a 28°C por 14 dias. A massa micelial foi separada do meio em água quente (70°C), filtrado e avaliada através de pesagem. A produção de fitotoxinas foi determinada por cromatografia líquida (HPLC) usando culturas provenientes de cinco placas de Petri. A produção de concanamicina está expressa pela somatória da quantidade total do concanamicina A e B.

Legendas: Controle (meio de aveia-ágar padrão); EGTA (etileno glicol tetraacético ácido, agente quelante de Ca²⁺); Fonte de fosfato (tampão KH₂PO₄ - Na₂HPO₄, pH 6.5).

*não detectado (aproximadamente 0.2 pg / placa para os valores de concentração de concanamicinas A + B)

(Adaptado de NATSUNAME et al., 2001).

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Resistência de cultivares de batata á sarna comum

2.2.2.1.1 Planta teste

Foram usados tubérculos sadios de batata (*Solanum tuberosum* L.) das cultivares Ágata, Asterix, Cupido, Monalisa, Mondial e Atlantic, por serem estas as mais plantas atualmente no país (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA - ABBA, 2006). Os tubérculos sadios dessas variedades foram fornecidos pela Associação Brasileira da Batata (ABBA), Itapetininga/SP.

2.2.2.1.2 Isolados de *Streptomyces* spp.

Nestes ensaios foram utilizados dez isolados de *Streptomyces* spp obtidos de diferentes cultivares de batata (Tabela 2), provenientes da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF), Campinas, SP.

Tabela 2 – Identificação e procedência dos isolados de *Streptomyces* spp. utilizados no ensaio de seleção com base no nível de produção de fitotoxinas.

Isolado (n° IBSBF)	Procedência	
	(País e/ou Estado)	(Cultivar)
2472	Holanda	Caesar
2499	Holanda	Baraka
2509	França	Eden
2147	Brasil, BA	Monalisa
2501	Brasil, SP	Monalisa
2502	Brasil, SP	Ágata
2524	Brasil, MG	Monalisa
2503	Brasil, BA	Monalisa
2500	Brasil, SP	Monalisa
2507	Brasil, BA	Ágata

IBSBF - Instituto Biológico de São Paulo, Bactérias Fitopatogênicas

2.2.2.1.3 Produção e extração das fitotoxinas

Para a produção e extração das fitotoxinas concanamícinas (A e B) e taxtomina A, foi adotada a metodologia de Loria et al. (2001). Os isolados, preservados por liofilização, foram resuspensores em solução salina (NaCl 0,85 %), previamente esterilizada por autoclavagem, e semeados na superfície de meio extrato de aveia ágar, sendo mantidos por 20 dias em temperatura de 28 °C.

Para a caracterização da produção de fitotoxinas dos isolados, os mesmos foram cultivados em meio de cultura de extrato de aveia líquido contido em erlenmeyers de 250 mL. O referido meio foi obtido pela cocção de 40 g de aveia por 20 min em água, sendo posteriormente filtrado em gaze, sendo o volume completado para 1000 mL e o pH ajustado em 7,2, através da adição de solução

de NaOH 1 M. Cada erlenmeyer recebeu 100 ml de meio de aveia líquido e 3 discos de micélio, obtidos com furador de rolha, de regiões uniformes e intensamente esporuladas das respectivas colônias de cada isolado de *Streptomyces* spp., e cultivadas em placas de Petri, com meio sólido de extrato de aveia ágar (28 °C; 20 dias).

Cada isolado foi cultivado em triplicata sob agitação orbital (150 rpm) em temperatura de 28 °C por 4 dias, quando o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel de filtro Whatmann nº 1. De cada repetição, 15 mL do filtrado foi transferido para um funil de separação, onde se procedeu a extração da toxina com 25 mL de acetato de etila. A seguir, foi coletada a fração referente ao acetato de etila e o filtrado submetido novamente à extração em mais 25 mL do solvente. As duas fases de acetato de etila, contendo a taxtomina A, foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro, e o solvente evaporado sob vácuo. O pó resultante foi resuspenso em 2 mL de metanol e armazenado para a realização dos ensaios e posterior comparação do nível de produção de fitotoxinas entre os 10 isolados.

2.2.2.1.4 Identificação da fitotoxina taxtomina A

A taxtomina A foi identificada por cromatografia de camada delgada -TLC (TLC= *Thin layer chromatography*), conforme a técnica usada por Goyer et al. (1998). Para tanto, os extratos provenientes dos diferentes isolados foram aplicados em placas de TLC, contendo sílica gel 60 em espessura de 250 µm. O solvente utilizado foi clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 (v/v). A taxtomina A foi identificada com base no coeficiente relativo de retenção - R_f (R_f = *Retention factor*) das amostras e da taxtomina A purificada fornecida pelo Dr. Russel R. King (Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch, Fredericton Research Center – Fredericton, Canadá). Considerou-se produtor de taxtomina A, o isolado em cujo extrato foram detectadas bandas com o mesmo R_f da taxtomina A purificada.

2.2.2.1.5 Quantificação da concentração de concanamicinas A e B e taxtomina A nos extratos

Para a quantificação da concentração de concanamicinas A e B e taxtomina A presentes nos extratos adotou-se a técnica de Goyer et al. (1998), com algumas modificações. A concentração de fitotoxinas foi determinada por Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- *High performance liquid chromatography*). Para a quantificação da concentração de concanamicinas A e B, foi utilizada coluna C18 medindo 3,9 mm x 125 mm, contendo partículas de sílica de 10 µm. As amostras foram eluídas isocraticamente em acetonitrila e água Mili-Q (60:40; v/v) por 30 min em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, sendo, as mesmas monitoradas em 280 nm, usando-se detector acoplado com luz ultravioleta. Uma curva padrão foi estabelecida usando-se concentrações conhecidas de concanamicinas A e B purificadas (Anexo – Figuras 1 e 2) fornecidas pelo Dr. Keiiji Hasumi (Department of Applied Biological Science - Tokyo Noko University – Tokio, Japão), sendo os resultados expressos em microgramas de toxina por mililitro de metanol. Os teores de concanamicinas A e B em cada extrato, correspondente a cada isolado, foram somados e expressos em microgramas de concanamicinas A + B por mililitro de metanol, conforme descrito por Natsunome et al. (2005).

Seguindo os mesmos passos da quantificação das concanamicinas A e B, a concentração de taxtomina A foi determinada em HPLC utilizando-se a mesma coluna. As amostras foram eluídas isocraticamente em acetonitrila e água Mili-Q (25:75; v/v) por 30 min em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, sendo monitorada a 380 nm, usando-se detector equipado com luz ultravioleta. Uma curva padrão foi estabelecida usando-se concentrações conhecidas de taxtomina A purificada (Anexo – Figura 3). Os resultados foram expressos em microgramas de taxtomina A por mililitro de metanol. Os dados foram analisados em esquema inteiramente casualizado, e havendo diferença significativa entre as médias, estas foram comparadas pelo teste de Tukey (5 % de probabilidade).

2.2.2.1.6 Reação de cultivares comerciais ao patógeno

Nesta etapa foi estudada, em condições de casa-de-vegetação, a susceptibilidade dos seis cultivares de batata mais plantadas no País a dois isolados de *Streptomyces* spp. A escolha desses dois isolados foi feita com base nos resultados da etapa anterior, sendo selecionado um isolado produtor de alta quantidade de concanamicina A + B e um isolado produtor de baixa quantidade das mesmas, visando-se avaliar a participação desta toxina na agressividade dos isolados. Os mesmos dois isolados possuíam o nível de produção de taxtomina A estatisticamente idêntico, a fim de se avaliar apenas o efeito das concanamicinas na agressividade dos isolados (isolados com níveis de produção de concanamicinas distintos, mas com o mesmo nível de produção de taxtomina A).

O solo utilizado foi previamente esterilizado, sendo composto de terra, esterco bovino curtido e areia, na proporção de 2:2:1 (v/v/v), acrescido de três gramas/vaso da formulação química 4-14-8 (FISCHER et al., 2005). O pH do substrato foi mantido em torno de 6,3, pela adição de CaCO_3 , por ser apropriado à infecção pelo patógeno (LAPWOOD; HERING, 1970). O substrato foi distribuído em vasos com capacidade para 2 Kg e os primeiros 10 cm de solo foram inoculados com 20 mL de suspensão de esporos de *Streptomyces* spp., cuja concentração foi previamente ajustada para $A_{540} = 0,1$ (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000).

2.2.2.1.7 Plantio dos tubérculos e condução do ensaio

Os tubérculos dos diferentes cultivares foram previamente desinfestados em hipoclorito de sódio (0,5 %), por 15 min, enxaguados em água destilada por mais 15 min e plantados no dia posterior a infestação do solo em número de um tubérculo/vaso. Cada combinação cultivar/isolado teve quatro repetições. Como controle, tubérculos de batata foram plantados em solo não infestado com o patógeno. Foi realizada uma adubação de cobertura com nitrato de cálcio na proporção de seis gramas por vaso, quando as plantas apresentavam cerca de 20 cm de altura, aproximadamente aos 25 dias do plantio, visto o aumento da relação Ca/P favorecer à infecção dos tubérculos pela bactéria *Streptomyces* (DAVIS et

al., 1972). Cada vaso foi regado individualmente procurando-se manter a umidade do solo baixa, principalmente durante a fase de tuberização, também como forma de favorecer a infecção dos tubérculos (LAPWOOD; HERING, 1970; RISTAINO; AVERRE, 1992).

O monitoramento de pragas e doenças foi realizado diariamente, efetuando-se o controle do ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*) com acaricida a base de Abamectina (Vertimec®) e o controle da traça da batata (*Phthorimaea operculella*) com inseticida a base de Spinosad (Tracer®), que embora não tenham registro para a cultura da batata são os mais efetivos e disponíveis. Efetuou-se o tutoramento das plantas para um melhor desenvolvimento destas.

2.2.2.1.8 Avaliação dos resultados

Com a senescência de 50 % das plantas, em torno de 120 dias após o plantio, foi avaliada a severidade da sarna comum em cada um dos oito maiores tubérculos de batata em cada repetição, por meio da escala diagramática proposta por James (1971) (Figura 8). Onde, nota 1= 0 % da superfície do tubérculo recoberta por sarna; nota 2= 0,1 a 1,0 %; nota 3= 1,1 a 10 %; nota 4= 10,1 a 25 % e nota 5= 25,1 a 50 %. A severidade da doença, de cada uma das seis repetições, foi obtida pela média aritmética da severidade dos nove tubérculos avaliados.

Os dados foram analisados em esquema fatorial, tendo dois fatores (cultivar X isolado). O fator cultivar teve seis níveis constituídos pelos seis diferentes cultivares, enquanto o fator isolado teve três níveis (dois isolados + controle). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5 %), e sendo observada interação isolado/cultivar foram realizados os desdobramentos necessários. Para a análise estatística dos resultados, os dados originais foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, onde x = % de área do tubérculo doente, sendo em seguida submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias.

Figura 8 - Escala diagramática desenvolvida para a avaliação da severidade de sarna comum (*Streptomyces* spp.) em tubérculos de batata (Adaptado de James, 1971)

2.2.2.2 Sensibilidade de tubérculos de cultivares de batata a taxtomina A

Neste ensaio foram utilizada taxtomina A proveniente do isolado 2147 e purificada por TLC. A produção e extração da toxina foram realizadas utilizando-se à mesma metodologia descrita no item 2.2.2.1.3, sendo a mesma purificada de acordo com a técnica de Leiner et al. (1996). Para tanto, o extrato metanólico contendo a fitotoxina foi aplicado em placas de TLC Whatmann LKC-18F, medindo 20x20 cm, com 250 μm , de espessura, usando como solvente clorofórmio e metanol 9:1 (v/v). Bandas de coloração amarela que co-migraram com a fitotoxina purificada foram removidas e eluídas em metanol. A quantificação da taxtomina A foi determinada em HPLC aplicando-se as amostras em coluna C18, as quais foram eluídas em metanol (Item 2.2.2.1.4).

O teste de sensibilidade de tubérculos de batata a taxtomina A foi executado seguindo a metodologia desenvolvida por Loria et al. (1995). Para tanto, minitubérculos de batata dos cultivares Ágata, Asterix, Cupido, Monalisa, Mondial e Atlantic, produzidos em casa-de-vegetação a partir de plantas com 2 meses de idade, foram lavados com água e sabão, descascados e desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 2%. Discos de porções centrais dos tubérculos, medindo 1,5 cm de diâmetro e 5 mm de espessura, foram obtidos com o auxílio de um furador de rolha. Os fragmentos de tubérculos foram distribuídos em placas de Petri, sendo que cada placa recebeu cinco discos acondicionados sobre um disco de papel de filtro umedecido. Sobre os discos de tubérculos de cada variedade foram depositados 10 μL de solução de taxtomina A purificada em diferentes concentrações. Para se evitar o escorrimento da solução de taxtomina A sobre os discos de tubérculos, os mesmos receberam discos de papel de filtro autoclavado (0,4 cm de diâmetro) na região onde se depositou a solução de taxtomina A. As concentrações utilizadas foram de 25, 50 e 100 μg taxtomina A / mL de metanol, o que correspondia a deposição de 0,25; 0,5 e 1 μg de taxtomina A por disco de tubérculo de batata. Para cada concentração foram feitas seis placas contendo cinco discos cada. Como controle, na superfície dos fragmentos de tubérculos de batata foi depositado apenas o extrato do meio em metanol. As placas contendo os diferentes tratamentos foram vedadas com filme de polietileno

e foram mantidas em temperatura de 28 °C por 24 h, quando se efetuou a avaliação quanto à presença ou não de manchas necróticas na região do tubérculo, onde foi depositada a fitotoxina.

Os dados, referentes à dose mínima necessária de taxtomina A para induzir necrose nos discos de tubérculos de batata dos diferentes cultivares foram analisados em esquema fatorial composto por dois fatores (dose x cultivares). O fator dose foi composto por três níveis, representados pelas três doses (25, 50, 100 µg taxtomina A/ mL) e o fator cultivar pelos seis cultivares. Havendo diferença entre as médias estas foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade), sendo que, para todas as análises utilizou-se o software SAS para Windows.

Todos os ensaios foram repetidos duas vezes no tempo em um intervalo de 20 dias e constatado a equivalência estatística entre ambos, foi apresentada apenas a primeira repetição.

2.2.3 Resultados e Discussão

2.2.3.1 Resistência de cultivares de batata à sarna comum

2.2.3.1.1 Identificação e quantificação da produção de fitotoxinas pelos isolados de *Streptomyces* spp.

A produção de taxtomina A por parte de cada um dos 10 isolados de *Streptomyces* spp., identificada por cromatografia de camada delgada (TLC) (Figura 9), revelou que todos os isolados produziram a taxtomina A, exceto o isolado IBSBF 2509 (Tabela 3).

Figura 9 - Cromatografia de camada delgada (TLC) aplicada aos produtos das extrações em acetato de etila de isolados de *Streptomyces* spp., cultivados em meio de aveia líquido, evidenciam do a produção de taxtomina A. Em A observa-se a placa de TLC sob luz visível e em B sob luz ultravioleta (UV - 254 nm). Na extremidade inferior de cada uma das duas placas de TLC está a legenda discriminando o número do isolado bacteriano, a taxtomina A purificada (T) e o meio controle (C). A seta indica a banda relativa a taxtomina A

Tabela 3 - Produção de taxtomina A por isolados de *Streptomyces* spp., utilizados no ensaio de seleção dos isolados com base no nível de produção de fitotoxinas

Isolado (nº IBSBF)	Produção de taxtomina A:
2472	+
2499	+
2509	-
2147	+
2501	+
2502	+
2524	+
2503	+
2500	+
2507	+

* +) produz; -) não produz

I IBSBF- Instituto Biológico de São Paulo, Bactérias Fitopatogênicas

A quantificação das concanamicinas A e B e da taxtomina A, efetuada por cromatografia líquida (HPLC), foi realizada comparando-se o perfil (área) destas fitotoxinas com a curva padrão. O tempo de retenção médio obtido foi de 22,8 min para a taxtomina A, 20,7 min para a concanamicina A e 15,2 min para a concanamicina B.

Para a comparação da capacidade de produção de concanamicinas A e B dos isolados, avaliou-se inicialmente individualmente (Tabela 4). Posteriormente, conforme descrito por Natsunome, Ryu e Abe, (1996) e Natsunome et al. (2008), foi considerado o somatório dos dois análogos da toxina, concanamicina A + B, em vista das mesmas exibirem o mesmo mecanismo de ação, que envolve a inibição da ATPase, não só de plantas, mas também de vários microrganismos (HUSS et al., 2002).

Tabela 4 - Produção de concanamicinas A e B e taxtomina A *in vitro* pelos 10 isolados de *Streptomyces* spp., provenientes de batatas. Avaliação realizada após 4 dias de cultivo em meio líquido de aveia (28°C) sob agitação orbital (150 rpm).

Isolado de <i>Streptomyces</i> spp. (IBSBF)	µg toxina / mL meio			
	Concanamicinas			Taxtomina A
	A	B	A + B	
2501	5,3	9,1	14,4 a*	17,7 a
2502	1,0	4,9	5,88 c	18,4 a
2124	1,1	4,1	5,2 cd	14,5 b
2172	0,6	1,3	1,9 de	13,8 b
2503	0,3	1,9	2,2 de	12,1 bc
2147	1,1	2,3	3,4 d	7,5 c
2507	0,1	0,3	0,4 e	18,1 a
2500	2,6	5,9	8,5 b	4,7 d
2499	1,1	1,6	2,7 de	2,3 de
2159	Nd **	Nd	Nd	Nd
C.V. (%)			13,17	12,5

* Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Nd : não detectado.

IBSBF - Instituto Biológico de São Paulo, Bactérias Fitopatogênicas

Para igualar o efeito da produção de taxtomina A na análise da agressividade dos isolados exibindo níveis distintos de produção de concanamicinas, no decorrer da seleção, buscou-se selecionar isolados com mesma capacidade de produção de taxtomina A, sendo mais freqüentemente observados altos níveis de produção de taxtomina A, como os isolados IBSBF 2501, 2502 e 2507 (Tabela 4).

Quanto aos níveis de produção de concanamicina, quando comparados individualmente à produção de concanamicinas A e B, se nota um maior nível de produção de concanamicina B do que A. Estes resultados foram similares aos obtidos por Natsuname et al. (1996), onde muitos isolados japoneses da bactéria também produziam mais concanamicina B do que A.

Quando se analisou o somatório concanamicina A + B, apenas o isolado IBSBF 2501, destacou-se pelo alto nível de produção das toxinas (Tabela 4) e, de forma geral, os níveis de produção de concanamicinas foram relativamente inferiores aos de taxtomina A (Tabela 4). Em contrapartida, outros trabalhos demonstram que a produção de concanamicinas por isolados *S. scabies* pode ser maior que a produção de taxtomina A (NATSUNAME et al., 1996; 2001).

Através destes resultados foi possível selecionar dois isolados para a condução dos ensaios em casa-de-vegetação, um isolado produtor de alta quantidade concanamicinas A e B (IBSBF 2501) e um segundo produtor da mesma quantidade de taxtomina A e pouco produtor concanamicinas A e B (IBSBF 2507). A figura 10 mostra a coloração do meio de cultivo dos isolados selecionados. Pode-se observar que os dois isolados produzem mesmo nível de taxtomina A, sendo estatisticamente semelhantes, desta forma igualando o efeito da taxtomina A para os dois isolados (Tabela 4).

Figura 10 - Aspecto do meio de cultivo dos dois isolados selecionados de *Streptomyces* spp., provenientes de batatas, crescidos por 4 dias (28°C) sob agitação orbital (150 rpm). Isolados IBSBF 2501 (produtor de altos níveis de concanaminas), IBSBF 2507 (produtor baixos níveis de concanaminas) e o controle (meio de aveia). Ambos os isolados apresentam níveis estatisticamente equivalentes de produção de taxtomina A (cor amarela).

2.2.3.1.2 Reação dos cultivares de batata ao patógeno

A severidade da sarna comum nas diferentes cultivares de batata, e a agressividade dos isolados de *Streptomyces* spp. em função das cultivares e isolados variaram significativamente ($p < 0,05$) (Tabela 5). Os resultados da avaliação da reação dos cultivares aos dois isolados, realizada em casa de vegetação, revelou o nível de resistência dos seis cultivares e a agressividade dos isolados sobre cada cultivar.

Tabela 5 - Porcentagem de sarna comum em tubérculos de cultivares de batata, em relação aos isolados de *Streptomyces* spp. IBSBF 2501 (produtor de altos níveis de concanaminas) e IBSBF 2507 (produtor de baixos níveis de concanaminas)

Cultivar	Isolado	
	2501	2507
Cupido	24,75* b**A***	25,03 a A
Asterix	26,98 b A	17,73 b B
Monalisa	36,19 a A	26,18 a B
Ágata	27,20 b A	26,02 a AB
Mondial	5,21 cd A	1,38 c B
Atlantic	3,87 d A	2,19 c AB
C.V. (%)	20,31	

* Severidade avaliada com base em porcentagem (%) de área lesionada.

** Avaliação de **resistência de cultivares**: letra minúscula - Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*** Avaliação de **agressividade de isolados**: letra maiúscula - Médias seguidas da mesma letra na mesma linha, não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação cultivar/isolado foi comprovada, visto que cada isolado produziu níveis de doença com severidade diferencial em cada cultivar. Como exemplo, para o isolado IBSBF 2501, proveniente do cultivar Monalisa (Brasil, BA), do mais suscetível para o mais resistente, temos os cultivares Monalisa, Asterix, Cupido, Ágata, Mondial e Atlantic. Em termos de resistência dos cultivares, conclui-se que os cultivares Atlantic e Mondial mostraram-se mais resistentes e, quando apresentavam lesões, estas eram superficiais e pequenas. Desta forma, esses cultivares de batata são mais apropriados para o plantio em regiões com histórico da doença.

Em termos de agressividade dos isolados, conclui-se que o isolado IBSBF 2507 proveniente do cultivar Ágata (Brasil, MG), é mais agressivo aos cultivares

Ágata, Cupido e Monalisa, enquanto que o isolado IBSBF 2501 (Monalisa – Brasil, Bahia) é mais agressivo ao cultivar Monalisa, onde os níveis de severidade da doença se destacaram em comparação aos demais cultivares e em relação ao isolado IBSBF 2507.

No tocante a participação das concanamicinas A e B na agressividade dos isolados IBSBF 2501 (produtor de altos níveis) e IBSBF 2507 (produtor de baixos níveis) (Figura 11), se evidenciou a maior agressividade do isolado IBSBF 2501, apenas quando comparados nos cultivares Mondial, Monalisa e Asterix, onde se obteve maior severidade da doença quando comparado à severidade produzida pelo isolado IBSBF 2507. Isto se deve ao fato a sensibilidade dos genótipos avaliados á concanamicinas ser diferente. Desta forma, aparentemente as concanamicinas possuem caráter secundário na determinação da doença.

No tocante a participação da taxtomina A, na agressividade dos isolados IBSBF 2501 e IBSBF 2507 (produtores de altos níveis de taxtomina A) (Tabela 4), observou-se que os cultivares classificados como suscetíveis realmente exibiram altos níveis de sintomas em resposta aos isolados produtores de taxtomina A.

A literatura já havia demonstrado a participação da taxtomina A na capacidade de causar doença pelos isolados de *Streptomyces* (KING et al., 1991; GOYER et al., 1998; LORIA et al., 2006). Mutantes de *S. scabies*, com reduzida produção da fitotoxina, mostraram-se também menos agressivos ou mesmo não patogênicos (GOYER et al., 1998).

Em contrapartida, Park et al. (2003), utilizando a mesma técnica de identificação e quantificação da taxtomina A por HPLC, observaram que alguns isolados patogênicos de *Streptomyces* spp. não produziam taxtomina A em meio de aveia líquido e em secções de tubérculos. Os mesmos autores deixaram claro que são poucos os trabalhos descrevendo outros fatores de patogenicidade, além da produção de taxtomina A. Faucher et al. (1995) descreveram a produção de enzimas hidrolíticas como um fator importante na patogenicidade, e envolvidas na formação das lesões da sarna comum profunda.

Os resultados deste presente trabalho mostraram também a importância do uso de diferentes isolados para a discriminação da reação dos genótipos de

batata, em função da interação diferencial entre cultivar/isolado. Apesar da resistência dos cultivares ser do tipo horizontal, esta se mostrou ser influenciada também pela variabilidade do patógeno.

A Figura 11 mostra os sintomas de sarna comum profunda provocados pelo isolado IBSBF 2501 proveniente do cultivar Monalisa (Brasil, BA). Comparando-se os sintomas ocasionados pelo isolado nos diferentes cultivares de batata, percebe-se que nos cultivares Monalisa, Cupido, Asterix e Ágata as lesões são do tipo sarna comum profunda e, nos cultivares Atlantic e Mondial as lesões são semelhantes às de sarna comum superficial, visto que são mais resistentes.

As lesões de sarna comum profunda causadas pelo isolado IBSBF 2501 sobre o cultivar Monalisa se destacaram dos demais cultivares, sendo possível encontrar tubérculos totalmente mumificados pelo patógeno, fato incomum para esta doença, visto que o patógeno ataca as camadas mais superficiais dos tubérculos.

Figura 11 - Sintomas de sarna comum, provocados pelo isolado IBSBF 2501 proveniente do cultivar Monalisa (Brasil, BA) de *Streptomyces* spp., em tubérculos de batata. A primeira coluna representa o controle e a segunda coluna representa os sintomas apresentados, após 4 meses do plantio e infestação do substrato autoclavado. Os cultivares estão apresentados em ordem de resistência para este isolado: de cima para baixo estão os cultivares Monalisa, Cupido, Asterix, Ágata (mais suscetíveis), Mondial e Atlantic (mais resistentes). Barra = 1 cm

A variabilidade nos níveis de resistência das cultivares de batata à sarna comum e na agressividade dos isolados de *S. scabies* observados neste trabalho, assemelham-se aos descritos na literatura para outras cultivares e isolados da bactéria, em que a resistência é quantitativa e a grande maioria das cultivares são suscetíveis (PASCO et al., 2005, HULTUNEN et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2005).

O nível de inóculo empregado neste trabalho foi preciso (20 mL de suspensão de esporos $A_{540} = 0,1$ / vaso, aproximadamente 10^2 ufc / g solo (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000), podendo ser considerado elevado quando comparado aos níveis que ocorrem naturalmente no campo. Segundo Kobayashi et al. (2005), a severidade apresentou crescimento linear com o aumento logarítmico ($\log_{10}$) da densidade de inóculo. Entretanto, segundo o mesmo autor, as concentrações maiores de inóculo (10^5 - 10^7 ufc/g solo) permitiram a obtenção de resultados mais consistentes, sem a ocorrência de escapes, em relação à resistência de cultivares de batata. A avaliação preliminar de cultivares de batata para resistência a sarna comum em menor escala (vasos), sob condições controladas de inóculo do patógeno, tipo de solo e umidade, caracteriza-se em passo importante para estudos subseqüentes em condições de campo. Nessas condições, a resposta à sarna é frequentemente variável em função das variações climáticas anuais durante o período crítico de desenvolvimento da doença e variações na infestação do solo, razão pela qual são necessários ensaios de vários anos para se obter resultados confiáveis (PASCO et al., 2005).

A classificação de cultivares quanto à resistência à sarna comum deverá oferecer uma importante ferramenta no controle integrado da doença. Outros estudos são requeridos para se padronizar a metodologia, especialmente com referência ao nível de inóculo e composição do substrato. A caracterização dos isolados de *Streptomyces* nacionais seria de extrema importância, pois a suscetibilidade das cultivares pode variar com a espécie/raça da bactéria (BOUCHEK-MECHICHE et al., 2000; PASCO et al., 2005).

2.2.3.2 Sensibilidade de cultivares de batata à taxtomina A

A sensibilidade dos cultivares á diferentes doses de taxtomina A, também possibilitou discriminar a sensibilidade dos mesmos á fitotoxina (tabela 6), sendo os mesmos foram similares aos exibidos pelos isolados IBSBF 2501 e IBSBF 2507 do patógeno. Os cultivares Cupido, Ágata e Monalisa, Asterix, suscetíveis aos dois isolados, mostraram-se mais sensíveis à fitotoxina taxtomina A, onde as secções de tubérculos de batata dos cultivares suscetíveis apresentaram lesões necróticas de coloração marrom escuras na região onde se depositava a fitotoxina e escurecimento do tecido em geral (Figura 12). Os cultivars Mondial e Atlantic, resistentes ao patógeno, se demonstraram menos sensíveis á fitotoxina, apresentando menor número de lesões.

Tabela 6 – Avaliação da sensibilidade de discos de minitubérculos de batata de diferentes cultivares á concentrações crescentes de taxtomina A (0,25; 0,50; 1,00 µg de taxtomina A / disco de tubérculo). Os dados estão expressos em número médio de discos com lesões necróticas

Cultivar	Concentração (µg / ml)		
	0,25	0,50	1,00
Cupido	1,33 b*	1,33 b	4,00 b
Ágata	3,33 a	4,00 a	8,00 a
Monalisa	0,67 c	0,67 bc	3,33 c
Asterix	0,00 d	0,33 cd	3,33 c
Mondial	0,00 d	0,00 d	0,00 d
Atlantic	0,00 d	0,33 cd	0,00 d
C.V. (%)	22,66		

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 12 - Reação de discos de minitubérculos de batata do cultivar Monalisa, a fitotoxina taxtomina A purificada (1 μg / disco) após 24 horas da aplicação. Em A, observa-se a disposição dos discos em placa de Petri e em B, observa-se um disco tratado apresentando lesão necrótica no centro, escurecimento do tecido e no lado direito o controle com o meio. Barra = 1 cm

A taxtomina A é classificada como uma fitotoxina não-seletiva (não-específica), sendo fator de agressividade ou determinante secundário de patogenicidade, visto que contribui para a severidade da doença. As fitotoxinas não-seletivas são tóxicas a várias espécies de plantas, independentemente das mesmas serem ou não hospedeiras do microrganismo toxigênico (PASCHOLATI, 1995). Este fato foi demonstrado para a taxtomina A, visto que a mesma se mostra tóxica tanto a plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas (LORIA et al., 1997; FRY; LORIA, 2002; SCHEIBLE et al., 2003; TEGG et al., 2005). A sensibilidade dos cultivares de batata a taxtomina A não é o único fator ligado à resistência ao patógeno, visto que o mesmo produz outras toxinas, como as concanamidas (NATSUNAME et al., 2005), proteínas nec1 (LORIA et al., 2008), enzimas hidrolíticas (FAUCHER et al., 1995), além de outros mecanismos bioquímicos de ataque que ainda não avaliados.

2.3 Conclusões

Os cultivares Atlantic e Mondial mostraram-se resistentes aos dois isolados de *Streptomyces scabies* avaliados. Os demais cultivares comportaram-se como suscetíveis, mas os níveis de suscetibilidade foram influenciados pela agressividade/especificidade dos isolados. Desta forma, a grande maioria dos cultivares de batata plantadas no Brasil, mostrou-se suscetível à sarna comum.

Foi possível comprovar a influência da produção de concanamidas na agressividade dos isolados de *Streptomyces* spp. apenas quando avaliada sobre os cultivares Mondial, Monalisa e Asterix. Aparentemente, estes cultivares são mais sensíveis a esta toxina.

Os cultivares de batata com maiores níveis de resistência à sarna comum apresentaram menor sensibilidade à fitotoxina taxtomina A. Porém, esta fitotoxina possui aparentemente caráter secundário na determinação dos sintomas da doença.

Referências

ABRAMOVITCH R.B.; MARTIN, G.B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, Berlin, v. 7, p. 356-364. 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. **Variedades de batata mais plantadas atualmente no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

BANG, H. Studies on potato russet scab. I. A characterization of different isolates from northern Sweden. **Academic Agriculture Technicae Olstensis, Agriculture**, Montreal, v. 29, p. 145-150, 1979.

BOUCHEK-MECHICHE, K.; PASCO, C.; ANDRIVON, D.; JOUAN, B. Differences in host range, pathogenicity to potato cultivars and response to soil temperature among *Streptomyces* species causing common and netted scab in France. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 3-10, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **A agricultura brasileira em números**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 729-760.

DAVIS, J.R.; GARDNER, J.G.; CALLIHAN, R.H.; MCDOLE, R.E. Fertilizer effects on potato scab and a correlation with nutrients in tuber peelings. **American Potato Journal**, Orono, v. 49, p. 361, 1972.

DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES NETO, J. **Streptomyces**: causadores da sarna da batata. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br>>. Acesso em: 30 jul. 2006.

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

EMBRAPA. **A cultura da batata**. Brasília: EMBRAPA SNH, 1999. 184 p.

FAO. The statistics division. <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

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

FAVORETTO, P. **Parâmetros de crescimento e marcha de absorção de nutrientes na produção de minitubérculos de batata cv Atlantic**. 1990. 152 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

FELLOWS, H. Relation of growth in the potato tuber to the potato scab disease. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 32, p. 757-781, 1926.

FIGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Ed. UFV, 2003. 412 p.

FISCHER, I.H.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; KIMATI, H. Efeito de fertilizantes e fungicidas no controle de *Streptomyces scabies* em batata. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p. 236-240, 2005.

FRY, B.A.; LORIA, R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.60, p.1-8, 2002.

GOODMAN, R.D.; KIRALY, A.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

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

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

HARRISON, M.D. Potato russet scab, its cause and factors affecting its development. **American Potato Journal**, Orono, v. 39, p. 368-387, 1962.

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**, Salem, v. 38, p. 794-804, 2000.

HOOKE, W.J. Common scab. In: AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul: 1981. p. 33-34.

HORSFALL, J.G.; HOLLIS, J.P.; JACOBSON, H.G.M. Calcium and potato scab. **Phytopathology**, Lancaster, v. 44, p. 19-24, 1954.

HUNTUNEN, L.H.; WECKMAN, A.; YLHÄINEN, A.; RITA, H.; RICHTER, E.; VALKONEN, J.P.T. Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 146, p. 395-403. 2005.

HUSS, M.; INGENHORS, G.; KÖNIG, S.; GAßEL, M.; DRÖSE, S.; ZEECK, A.; ALTENDORF, K.; WIECZOREK, H. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 40544-40548, 2002.

JAMES, W.C. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. **Canadian Plant Disease**, Ottawa v. 51, p. 39-65, 1971.

JENNINGS, D.B.; EHRENSHAFT, M.; PHARR, D.M.; WILLIAMSON, J.D. Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen mediated plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 15129-15133. 1998.

JONES, A.P. Parsnip canker. **Nature**, London, v. 171, p. 574, 1953.

KEINATH, A.P.; LORIA, R. Management of common scab of potato with plant nutrients. In: ENGLEHARD, A.W. (Ed.). **Management of diseases with macro- and microelements**. St. Paul: American Phytopathology Society, 1989. p. 152-166.

- KING, R.R.; LAWRENCE, C.H. Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 44, p. 1108-1110, 1996.
- KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CALHOUN, L.A. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, causal organism of potato common scab. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 13, p. 849-850, 1992.
- KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. **American Potato Journal**, Orono, v. 68, p. 675-680, 1991.
- KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C.; CALHOUN, L.A. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. **Chemical Community**, Ottawa, v. 13, p. 849-850, 1989.
- KOBAYASHI, A.; NALTO, S.; KOBAYASHI, Y.O.; TSUDA, S.; OHARA-TAKADA, A.; MORI, M. Precise, simple screening for resistance in potato varieties to common scab using paper pots. **Journal of General Plant Pathology**. London, v. 71, p. 139-143. 2005.
- LAMBERT, D.H.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames v. 39, p. 387-392. 1989.
- LAPWOOD, D.H.; HERING, T.F. Soil moisture and the infection of young potato tubers by *Streptomyces scabies* (common scab). **Potato Research**, Wageningen, v. 13, p. 96-304, 1970.
- LEBEDA, A.; LUHOVA, L.; SEDLA ROVA, M.; JANCOVA D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. **Journal of Plant Disease Protection**, London, v.108, p.89-111, 2001.
- LEINER, R.H.; FRY, B.A.; CARLING, D.E.; LORIA, R. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. **Phytopathology**, St Paul, v. 86, p. 709-713, 1996.
- LIN, Y.-S.; KIESER, H.M.; HOPWOOD, D.A.; CHEN, C.W. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Molecular Microbiology**, Salem, v.10, p.923-933, 1993.
- LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M. Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces* **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, p.469-87, 2006.
- LORIA, R.; BIGNELL, D.R.D.; MOLL, SIMON.; HUGUET-TAPIA, J.C.; JOSHI, M.V.; JOHNSON, E.G.; SEIPKE, R.F.; GIBSON, D.G. Thaxtomin biosynthesis: the

path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 93, p. 3-10, 2008.

LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A.; KING, R.R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Plant Disease**, St Paul, v. 81, p. 836-846, 1997.

LORIA, R.; CLARK, C.A.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A. Gram-positive bacteria: *Streptomyces*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2001. p. 236-249.

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*. **Phytopathology**, St Paul, v. 85, p. 537-541, 1995.

NATSUNAME, M.; RYU, R.; ABE, H. Production of phytotoxins, concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 62, p. 411-413, 1996.

NATSUNAME, M.; TAKI, M.; TASHIRO, N.; ABE, H. Phytotoxin production and aerial mycelium formation by *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies* *in vitro*. **Journal of General Plant Pathology**. Berlin, v. 67, p. 299-302, 2001.

NATSUNAME, M.; YAMADA, A.; TASHIRO, N.; ABE, H. Differential production of the phytotoxins thaxtomin A and concanamycins A and B by potato common scab-causing *Streptomyces* spp. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 64, p. 202-2004, 1998.

NATSUNAME, M.; KOMIYA, M.; KOYANAGI, F.; TASHIRO, N.; KAWAIDE, H.; ABE, H. Phytotoxin produced by *Streptomyces* spp. causing potato russet scab in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Berlin, v. 71, p. 364-369, 2005.

NUNES, M.U.C. Produtividade e principais problemas fitossanitários de cultivares de batata em Sergipe. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 20, p. 424-427, 2002.

PARK, D.H.; YU, Y.A.; KIM, J.S.; CHO, J.M.; HUR, J.H.; LIN, R.C.K. Characterization of Streptomyces causing potato common scab in Korea. **Plant Disease**, St Paul, v.87, p.1290-1296, 2003.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 365-392.

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

PEREIRA, A.S.; DANIELS, J.E. **O cultivo da batata na Região Sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2003. 419 p.

RISTAINO, J.B.; AVERRE, C.W. Effects of irrigation, sulfur, and fumigation on *Streptomyces* soil rot and yield components. **Plant Disease**, St Paul, v. 82, p. 670-677, 1992.

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

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

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 16, p. 313-340, 1966.

SOUZA DIAS, J.A.C.; IMAUTI, M.T. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 119-142.

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

3 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS CAUSADAS PELA TAXTOMINA A, PRODUZIDA por *Streptomyces* spp., SOBRE PLÂNTULAS DE SORGO (*Sorghum bicolor*)

Resumo

As modificações citológicas, ultraestruturais e bioquímicas induzidas pela taxtomina A, fitotoxina produzida por *Streptomyces* spp., foram analisadas em plântulas de sorgo visando à compreensão do mecanismo de ação desta toxina. Os tecidos foram tratados com taxtomina A e avaliados após 7 dias do tratamento. Observou-se desorganização em todas as células dos tecidos tratados com a taxtomina A. A membrana plasmática das células do mesófilo foliar mostrou-se retraída e destacada da parede celular em diversos pontos. Entretanto, o plasmalema não pareceu rompido. O efeito sobre a permeabilidade seletiva da membrana plasmática também foi avaliado bioquimicamente, onde foi observado aumento da saída de eletrólitos no meio. Os cloroplastos apresentaram deformações na superfície e perda de turgidez. Estas deformações provavelmente contribuíram para a redução do teor de clorofilas A e B, no tecido avaliado. As plântulas também apresentaram elevado acúmulo de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas. Desta forma, conclui-se que a taxtomina A age principalmente sobre a membrana plasmática, provocando alterações na permeabilidade seletiva, plasmólise, desorganização celular e atuando sobre cloroplastos, provocando deformações e redução no teor de clorofila dos tecidos de plântulas de sorgo. Em contrapartida, o acúmulo de fitoalexinas evidencia que concentrações mínimas desta toxina podem ser exploradas para utilização como eliciador da resposta de defesa em plantas.

Palavras-chave: *Streptomyces* spp.; Taxtomina A; *Sorghum bicolor* L; Fitotoxinas; Mecanismo de ação; Efeitos ultraestruturais; Patogenicidade

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS CAUSED BY THE THAXTOMIN A, PRODUCED BY *Streptomyces* spp., IN SORGHUM SEEDLINGS (*Sorghum bicolor*).

Abstract

The cytological, ultrastructural and biochemical changes induced by the thaxtomin A, phytotoxin produced by plant pathogenic species of *Streptomyces* spp., was evaluated in sorghum seedlings to understand the phytotoxin action mechanism. Health leaf tissue of sorghum (*Sorghum bicolor*) seedlings was treated

with high levels of thaxtomin A and evaluated after seven days of the treatment. In all treated cells with thaxtomin A it was observed significant cytological disorganization. The plasmma membrane of immature leaf cells was detached from the cell wall in several places. However, the plasmalemma did not seen disorganized. In addition, it was observed increases in the permeability of plasmma membrane. The chloroplasts showed deformations in surface and volume reduction. These deformations in chloroplasts probably contributed for the reduction of chlorophyll A and B levels. The sorghum seedlings also showed high phytoalexins accumulation (deoxiantocyanidins). Thus, it can concluded that the thaxtomin acts mainly on the plasmma membrane and membranous organelles, causing changes in permeability, plasmolyses, cell disorganization, deformation in chloroplasts and chlorophylls reduction in treated sorghum seedlings. In fact, the accumulation of phytoalexins evidenced that minimum concentrations of this toxin can be exploited as elicitor in resistance induction by stimulating the plant defense mechanisms against pathogens.

Keywords: *Streptomyces* spp.; Thaxtomin A; *Sorghum bicolor* L.; Phytotoxins; Action mechanism; Ultrastructural effects; Pathogenicity

3.1 Introdução

Fitotoxinas estão envolvidas na agressividade de diversos patógenos bacterianos. Em 1989, um novo grupo de fitotoxinas associado à fitopatógenos do gênero *Streptomyces* foi descoberto e nomeado de taxtominas (KING et al., 1989). Este grupo de fitotoxinas consiste basicamente em uma molécula de 4-nitroindol-3-il contendo 2,5-dioxopiperazina. A taxtamina A, a principal toxina produzida por *Streptomyces scabies*, é um dipeptídeo composto pelo aminoácido alanina com um radical fenil e um aminoácido triptofano nitrado (KING et al., 1992). *S. scabies* é o principal agente causal da sarna comum, uma doença caracterizada por lesões corticosas superficiais, elevadas ou profundas em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) (GOYER et al., 1996) e raízes de outras plantas, tais como a beterraba (*Beta vulgaris* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), e de nabo (*Brassica rapa* L.) (GOYER; BEAULIEU, 1997). *S. scabies* inibe também o crescimento de plântulas de rabanete (*Raphanus sativus* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), couve-flor (*Brassica oleracea* L.), couve-nabiça (*Brassica napus* L.) e nabo (LEINER et al., 1996).

A taxtomina A possui papel importante na agressividade de isolados de *S. scabies*. Mutantes de *S. scabies*, com reduzida produção da fitotoxina, mostraram-se também menos agressivos ou mesmo não patogênicos (GOYER et al., 1998). Como a maioria de fitotoxinas bacterianas (MITCHELL, 1984; PATIL, 1974), a taxtomina A não é uma toxina específica e, certamente, induz deformações em caules e nas raízes de diversas plantas do grupo das monocotiledôneas e dicotiledôneas. As taxtominas, em baixas concentrações (0,1 μ M), interferem no crescimento de plantas de diferentes famílias botânicas (LEINER et al., 1996).

A aplicação da taxtomina A em tubérculos imaturos da batata induz sintomas diferentes. Em baixas concentrações provoca sintomas como a proliferação e a expansão celular e em altas concentrações causa erupções, rachaduras e escurecimento do tecido ao redor da zona da aplicação (LAWRENCE; CLARK; KING, 1990). Secções transversais das raízes e dos caules de plantas tratadas revelaram que o tecido sofre deformações devido à hipertrofia celular e não ocorre o aumento do número de células (LEINER et al., 1996). Células meristemáticas de raízes de batata tratadas com taxtomina A apresentaram a atividade mitótica reduzida, bem como a desorganização dos cromossomos condensados (LORIA et al., 1997). Posteriormente, Fry e Loria (2002), estudando células de fumo tratadas com a fitotoxina, observaram que células do tecido tratado apresentavam grande aumento no número de células binucleadas. A aplicação da taxtomina A em folhas maduras de batata, rabanete, tomate, e beterraba resultou em necrose nas áreas tratadas (GOYER et al., 1997). Os estudos ultraestruturais do efeito da taxtomina A na integridade de células de tubérculos imaturos de batata já foram relatados previamente (STEIN et al., 1994). Este trabalho teve como objetivo descrever as mudanças morfológicas, ultraestruturais e bioquímicas em tecidos de sorgo (*Sorghum bicolor*) induzidas pela aplicação da fitotoxina taxtomina A.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

As bactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas principalmente pela sua capacidade de produzir metabólitos secundários importantes, como antibióticos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A produção de taxtominas, entre outras fitotoxinas, é uma característica importante entre as poucas espécies do gênero que são fitopatogênicas.

Através dos esforços do pesquisador canadense Russel King e colaboradores (KING et al., 1989) foi isolada e caracterizada uma fitotoxina de *Streptomyces scabies*, responsável pela necrose de tecidos de tubérculos de batata. Esta fitotoxina passou a ser chamada de “Taxtomina” em homenagem ao pesquisador Roland Thaxter, o qual foi o primeiro a estabelecer a relação entre *S. scabies* e a sarna da batata (KING; LAWRENCE, 1996).

A análise molecular de genes ligados a patogenicidade em *S. scabies* esclareceu a base genética das doenças classificadas como sarna comum e sarna comum profunda (LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Com base em nosso atual conhecimento do mecanismo da ação e da sintomatologia proporcionada pelas taxtominas, todas as espécies de *Streptomyces* que produzem estes sintomas de sarna podem sintetizar as taxtominas. As espécies de *Streptomyces* que produzem somente sintomas de sarna reticulada ou de sarna ferruginosa são excluídas desta generalização. Estas doenças são causadas por outras espécies de *Streptomyces*, à exceção daquelas que causam a sarna comum e a produção de taxtomina não está envolvida. As lesões de sarna em batata doce são causadas por *Streptomyces ipomoeae*, que produz também um outro membro da família das taxtominas, a taxtomina B. As diferenças na regulação da produção de toxina, dos locais da infecção, e gama de hospedeiros torna-se um sistema intrigante para a análise comparativa entre os agentes causais da sarna da batata. Entretanto, a análise genética de características patogênicas em *S. ipomoeae* está ainda incompleta (LORIA; KERS; JOSHI, 2006).

Atualmente foram identificados vários análogos da taxtomina A (LORIA et al., 1997). Um mesmo isolado de *Streptomyces* spp. pode produzir diferentes

análogos, porém, a taxtomina A é encontrada em maior proporção em tecidos sintomáticos de batata. Segundo King et al. (1991), a proporção de taxtomina A em relação a taxtomina B, o segundo análogo mais abundante, é de 20:1.

A taxtomina A e outros membros da família das taxtominas induzem necroses em tecidos expostos de tubérculos da batata e produzem sintomas similares aos de sarna em tubérculos imaturos da batata (RISTAINO; AVERRE, 1992, LORIA; KERS; JOSHI, 2006). Estas atividades biológicas sugerem que as taxtominas possuem um papel importante na patogenicidade e produção de lesões em tecidos de plantas hospedeiras. A concomitância da produção de taxtominas em espécies causadoras de sarna em muitos isolados de diversas regiões geográficas e do relacionamento quantitativo entre a produção da toxina e a agressividade, além da ausência da produção por espécies saprofíticas suporta a hipótese de que esta toxina está relacionada à agressividade ou mesmo a patogenicidade em tubérculos da batata (CLARK; LAWRENCE, 1981; HOOKER, 1981; LORIA et al., 1997).

A via de biosíntese da taxtomina A é não-ribossomal e envolve sintetases de peptideos, uma P450 monooxigenases, e uma sintetase do óxido nítrico, a qual está ligada a nitratação da toxina (Figura 1 a). Esta sintetase do óxido nítrico é igualmente responsável pela produção de óxido nítrico por estreptomicetos durante a relação do hospedeiro com o microrganismo fitopatogênico, sugerindo que o óxido nítrico possa ter papel adicional durante o processo da infecção (LORIA et al., 2008).

Os genes biossintéticos de taxtominas são regulados transcricionalmente por um regulador da família de AraC/XylS, TxtR, o qual é conservado em estreptomicetos patogênicos e codificado dentro do conjunto de genes de biossíntese da taxtomina. A proteína TxtR liga-se especificamente a celobiose, um indutor conhecido da biossíntese do taxtomina, sendo a mesma essencial para a expressão dos genes biossintéticos (Figura 1 b). Um segundo gene da virulência em espécies fitopatogênicas de *Streptomyces*, *nec1*, codifica uma nova proteína secretada que possui função de suprimir respostas da defesa da planta. Os genes da taxtomina e os *nec1* biossintéticos são contido em um

grande conjunto de genes de patogenicidade, sendo que a transferência deste conjunto aos estreptomicetos explica provavelmente a emergência rápida de novas espécies fitopatogênicas. A seqüência recentemente disponibilizada do genoma de *S. scabies* fornecerá informações adicionais sobre os mecanismos utilizados por espécies de *Streptomyces* nas interações planta-patógeno (LORIA et al., 2008).

Figura 1 - (a) A biosíntese da taxtomina A é não ribossomal e envolve as enzimas de síntese de peptídeo (TxtA e B), uma monooxigenase P450 (TxC), e uma sintetase do óxido nítrico (NOS). As etapas da via de biosíntese que não foram completamente elucidadas são indicadas por (??). (b) Os genes conhecidos na biosíntese da taxtomina A são agregados junto ao cromossomo e conservados nas espécies produtoras de taxtomina. Os genes biossintéticos estão mostrados em cinza e os genes reguladores em preto.
(Adaptado de LORIA et al., 2008)

A hipótese principal que sustenta a taxtamina como sendo uma das principais características responsáveis pela patogenicidade de *Streptomyces* é a correlação existente entre a produção da toxina e a agressividade do respectivo isolado (KING et al., 1991). Mutantes de *S. scabies*, com reduzida produção da fitotoxina, se mostraram também menos agressivos ou mesmo não patogênicos (GOYER et al., 1998). Healy et al. (2000) compararam os sintomas obtidos pelo tratamento de tubérculos de batata jovens utilizando o filtrado do cultivo de isolados de *S. acidiscabies* em meio líquido, e reproduziram sintomas análogos aos resultantes quando da inoculação do patógeno.

As taxtominas são fitotoxinas do tipo não seletivas ou inespecíficas, uma vez que em baixas concentrações (0,1 μM) interferem no crescimento de plantas de diferentes famílias botânicas, sejam estas mono ou dicotiledôneas (LEINER et al., 1996).

A sintomatologia produzida pela taxtamina A sugere que esta toxina possui diversos alvos potenciais nas células vegetais, incluindo a membrana plasmática, organelas, os vários componentes do citoesqueleto e a parede celular (FRY; LORIA, 2002; TEGG et al., 2005). Aumentos no volume celular em hipocótilos de plântulas de cebola e rabanete e em culturas da suspensão de fumo, em resposta ao tratamento com 0.05-1.0 μM de taxtamina A, como já comentado sugerem que esta fitotoxina interage com um ou mais alvos conservados de células vegetais (Figura 2).

As células da coifa de raízes de cebola tratadas com taxtamina A, nas concentrações 0,0-10,0 μM , apresentaram inibição do crescimento da raiz. Além disso, houve um aumento do número de células binucleadas ou com formato irregular. Por sua vez, a taxtamina A nas concentrações de 1.0-3.0 μM inibiu a elongação normal de protoplastos de fumo, demonstrando um possível efeito no desenvolvimento da parede da célula (Fry; Loria, 2002).

Figura 2 - Cortes transversais de hypocótilos de plântulas de cebola (b) e rabanete (d) apresentando hipertrofia celular em resposta a taxtomin A. As plântulas de cebola ou rabanete foram crescidas em meio ágar-água contendo taxtomin A (cebola - 0,05 μM ; rabanete - 0,075 μM). Compare os resultados do material tratado com os dos tecidos controle: a) cebola; c) rabanete. Barra = 200 μm (Adaptado de Fry; Loria, 2002).

As células da coifa de raízes de cebola tratadas com taxtamina A, nas concentrações 0,0-10,0 μ M, apresentaram inibição do crescimento da raiz. Além disso, houve um aumento do número de células binucleadas ou com formato irregular (FRY; LORIA, 2002). Por sua vez, a taxtamina A nas concentrações de 1.0-3.0 μ M inibiu a elongação normal de protoplastos de fumo, demonstrando um possível efeito no desenvolvimento da parede da célula.

A taxtamina A já teve seus efeitos avaliados em várias plantas, como *Arabidopsis* (TEGG et al., 2005). Até o momento não é conhecida exatamente a maneira pela qual as taxtominas causam necrose em tubérculos de batata ou nanismo em plântulas de outras espécies vegetais, porém acredita-se que o alvo seja conservado em células vegetais e não conservado em fungos e bactérias, uma vez que estes últimos são insensíveis à toxina (LORIA et al., 1997). Ensaio iniciais demonstraram que as taxtominas causam alterações no fluxo de íons, como o Ca^{++} e H^{+} , através da membrana plasmática (TEGG et al., 2005) (Figura 3). A indução de morte celular programada por taxtominas foi observada por Duval et al. (2005). Em contrapartida, Scheible et al. (2003) acreditam que o sítio de ação da referida fitotoxina esteja ligado ao bloqueio da biossíntese de celulose.

Figura 3 - Um possível modelo da ação e sinalização da fitotoxina taxtomina A em células vegetais. A taxtomina A desencadeia um influxo de cátions Ca^{2+} , provocando um aumento principalmente na concentração de íons Ca^{2+} no citosol. Este processo é amplificado por um possível "feedback" [Ca^{2+} induzido Ca^{2+} liberado de organelas internas, como retículo endoplasmático (RE) ou vacúolo]. Elevadas concentrações de Ca^{2+} no citosol provocam aumento na atividade das bombas de H^+ da membrana plasmática (MP). A parede destas células ficam enfraquecidas, aumentando a habilidade do patógeno de penetrar através dos tecidos das plantas suscetíveis (Adaptado de FRY; LORIA, 2002)

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Obtenção e purificação da taxtomina A

A taxtomina A foi obtida e purificada da fase aquosa de uma cultura de *S. scabies* (IBSBF - 2147) crescida em meio líquido de aveia por 4 dias a 25 °C (LORIA et al., 2006). A cultura foi filtrada em papel Whatmann nº 2 e a fase aquosa foi extraída duas vezes em acetato de etila, sendo utilizado um volume de acetato de etila igual a 1,5 vezes maior que o volume da fase aquosa (LORIA et al., 2001). O extrato de taxtomina A em acetato de etila foi aplicado em placas de TLC (*Thin Layer Chromatography*); (sílica 60) juntamente com o padrão da taxtomina A purificada. Para separação em TLC se utilizou os solventes clorofórmio-metanol 9:1 (v/v). Sendo as bandas de coloração amarela, que exibiram o mesmo Rf (*Retention Factor*) que a taxtomina A purificada, foram recuperadas através da eluição com clorofórmio-metanol 7:3 (v/v). Este procedimento foi realizado uma segunda vez com o mesmo extrato, para se confirmar a pureza da amostra de taxtomina A (GOYER et al., 1996).

Para a quantificação da taxtomina A purificada, adotou-se a técnica de Goyer et al. (1998), na qual a concentração de taxtomina A é determinada com auxílio de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- *High performance liquid chromatography*). Foi utilizada coluna C18 medindo 3,9 mm x 125 mm, contendo resina com partículas de 10 µm e as amostras foram eluídas isocraticamente em acetonitrila e água ultra pura (25:75; v/v) por 30 min em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, sendo monitorada a 380 nm, usando-se um detector de ultravioleta. Uma curva padrão foi estabelecida usando-se concentrações conhecidas de taxtomina A purificada (Anexo – Figura 3). Os resultados foram expressos em microgramas de toxina por mililitro de metanol.

A figura 4 esquematiza as etapas de obtenção e purificação da taxtomina A, proveniente de *Streptomyces* spp.

Figura 4 - Esquema de obtenção e purificação da fitotoxina taxtomina A, a partir de um isolado de *Streptomyces* spp.

3.2.2.2 Alterações ultraestruturais provocadas pela taxtomina A

3.2.2.2.1 Bioensaio com a fitotoxina

Para o estudo do mecanismo de ação da taxtomina A e alterações ultraestruturais provocadas por esta toxina em células vegetais, sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], do cultivar BRS-501, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% (15 min), lavadas e embebidas em água, a temperatura ambiente por 12 h. Após este período foram enroladas em folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas no escuro a 28°C por 7 dias (NICHOLSON et al., 1988). As plântulas formadas foram individualmente medidas e cortadas, sendo utilizado apenas os 4 cm superiores dos mesocótilos contendo os coleóptilos, medindo-se a partir do ápice dos mesocótilos e descartando-se a parte inferior e raízes do mesmo. Estes mesocótilos foram colocados em tubos de ensaios de 1 cm de diâmetro contendo 300 µL de solução de taxtomina A, nas concentrações de 0 e 200 µg taxtomina A/ mL de água. Preparou-se também um controle com o extrato do meio de aveia, utilizado para o cultivo da bactéria. No interior de cada tubo foram colocados 3 mesocótilos, sendo utilizados 4 tubos para cada concentração de taxtomina A (cada tubo correspondendo a uma repetição). Posteriormente, os tubos foram fechados com filme plástico e incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. (28°C; 12 h de fotoperíodo) por 7 dias. Desta maneira, foram obtidas plântulas apresentando ou não sintomas e adequadas para as avaliações por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.2.2.2.2 Preparação de amostras para MET

As preparações e as observações das amostras para a MET foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP. Os coleóptilos de tecidos tratados com taxtomina A nas concentrações 0 e 200 µg foram coletados, cortados e imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 24 h, lavados em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados por duas vezes de 15 min em água destilada, transferidos para solução a 0,5 % de citrato de uranila durante 12h a

4°C e em seguida, lavados novamente em água destilada e desidratados em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes). Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30 % (8h), 70 % 12 h e 100 % duas vezes por 24 h cada, sendo os espécimes montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa a 70°C por 48 h (ALVES, 2003; BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

3.2.2.2.3 Ultramicrotomia

Os blocos obtidos foram levados a um aparelho de "Trimming" para a retirada dos excessos. Em seguida, secções semifinas (0,85 µm) e ultrafinas (100 nm) foram cortadas usando-se um Ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut E), com o auxílio de navalha de vidro. Os cortes ultrafinos (80-100 nm) foram coletados em telinhas de cobre ("copper slot grids") e secos em raques de alumínio cobertos com formvar (ROWLEY; MORAN, 1975; BOZZOLA; RUSSELL, 1999). As secções foram pós-contrastadas em citratato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 min cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 902A a 30 kv (ALVES, 2003; BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

3.2.2.3 Alterações bioquímicas provocadas pela taxtomina A

3.2.2.3.1 Bioensaio com a fitotoxina

Novamente, mesocótilos foram obtidos conforme descrito no item 3.2.2.2 e colocados em tubos de ensaios de 1 cm de diâmetro contendo solução de taxtomina A, nas concentrações 0, 25, 50, 100, 150, 200 µg toxina/ mL de água. Fez-se também um controle com o extrato do meio de aveia, utilizado para o cultivo da bactéria. No interior de cada tubo foram colocados 3 mesocótilos, sendo feitos 4 tubos para cada concentração de taxtomina A (cada tubo correspondendo a uma repetição). Posteriormente, os tubos foram fechados com filme plástico e incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. (28°C; 12 h de fotoperíodo) por 7 dias. Desta maneira, foram obtidas plântulas com diferentes níveis de sintomas e adequadas para os bioensaios de produção de fitoalexinas, crescimento e

quantificação de clorofilas A e B. Todos os ensaios foram repetidos 2 vezes em um intervalo de 20 dias para a confirmação dos resultados.

3.2.2.3.2 Avaliação da redução do crescimento

Após o período de incubação e antes das avaliações dos demais parâmetros, os mesocótilos de cada tratamento foram medidos, visando-se avaliar o efeito da taxtomina A no crescimento das plântulas.

3.2.2.3.3 Quantificação de clorofilas A e B

As porções superiores dos mesocótilos de sorgo (coleóptilos) foram cortadas e coletadas apenas 0,1 g por repetição. Estas amostras de tecido vegetal foram colocadas em tubos tipo eppendorf, contendo 2 mL de acetona 80 %, utilizada sempre a 4 °C, sendo todo o procedimento realizado protegendo-se as amostras da luz pelo uso de papel alumínio. Em seguida, estas foram maceradas em almofariz e filtradas através de papel de filtro Whatman nº 1, sendo o volume completado para 4 mL com acetona 80 %. Determinou-se a absorbância das amostras a 663 nm para a determinação da clorofila A e 645 nm para a clorofila B em espectrofotômetro, sendo o conteúdo de clorofilas de cada amostra expresso em mg de clorofila / grama de tecido fresco (g.t.f.) (ARNON, 1949; HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977).

3.2.2.3.4 Permeabilidade seletiva da membrana plasmática

Os mesocótilos foram previamente tratados com taxtomina A, conforme o item (Ítem 3.2.2.2.1) (15 mesocótilos por repetição e 5 repetições por tratamento) com o objetivo de se avaliar as alterações provocadas pela taxtomina A na condutividade elétrica da membrana plasmática de células vegetais. As secções de tubérculos foram previamente tratadas com 20 µL de solução de taxtomina A (0, 25, 50, 100 e 200 µg taxtomina A / mL água deionizada). Periodicamente, a condutividade elétrica da membrana foi avaliada com auxílio de um condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments) em solução de sacarose 0,1 M. Para isto, 1 g das amostras foram tratadas com 20 µL de solução de taxtomina A, incubadas por 12

horas e avaliadas após este período. O controle correspondeu aos mesocótilos tratados apenas com o produto de extração do meio de cultivo da bactéria, além da avaliação da condutividade elétrica da solução de sacarose, para se evitar as interferências provocadas pelas variações de temperatura no ambiente.

3.2.2.3.5 Bioensaio de fitoalexinas

No ensaio de produção de fitoalexinas, mesocótilos previamente tratados com taxtomina A, conforme o item 3.2.2.2.1 (3 mesocótilos por repetição e 5 repetições por tratamento), foram cortados e uma porção de 2,5 cm pesada, cortada em pequenos segmentos e colocadas em tubos tipo eppendorf, contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v). Os segmentos de mesocótilos foram mantidos a 4 °C no metanol por 96 h para extração dos pigmentos e a absorbância foi determinada a 480 nm (NICHOLSON et al., 1987, 1988; SNYDER; NICHOLSON, 1990). Os dados foram expressos em absorbância a 480 nm por grama de tecido fresco (Abs 480 nm/g.t.f.).

3.2.3 Resultados e Discussão

3.2.3.1 Alterações ultraestruturais provocadas pela taxtomina A

Para analisar os efeitos associados com a fitotoxina taxtomina A purificada, a principal toxina produzida pelo isolado de *Streptomyces* spp. IBSBF – 2147, a mesma foi aplicada em tecidos de sorgo e os tecidos foram avaliados após sete dias do tratamento. As imagens de MET trouxeram mais evidências da ação da fitotoxina taxtomina A sobre membranas de células vegetais de plantas de diferentes famílias botânicas, como o sorgo. Em cortes transversais do mesofilo foliar dos coleóptilos de sorgo, tratados com solução de taxtomina A (200 µg/mL), pode-se observar um grande número de células plasmolisadas, apresentando descolamento da membrana plasmática da parede celular em vários pontos ou totalmente, o que não ocorreu em plantas não tratadas, ou somente tratadas com o meio de cultivo da bateria (Figura 5). Neste tipo de corte foi possível observar deformação em cloroplastos. Em contraste com o controle, os cloroplastos

perderam sua forma túrgida e passaram a apresentar deformações na superfície (Figura 6).

De forma geral, observou-se uma desorganização no citoplasma e organelas de células tratadas com a taxtomina A, quando comparadas ao controle (Figuras 5 e 6). Os núcleos das células tratadas com taxtomina A apresentavam morfologia irregular, apresentando invaginações ou lóbulos na carioteca (Figura 5A e 6A). Além disso, observaram-se com maior frequência células binucleadas (Figura 6A), conforme já descrito na literatura por Fry e Loria (2002), por avaliação em microscopia de luz.

Conforme esperado, a fitotoxina não atuou sobre a morfologia das fibras presentes em vasos condutores no tecido foliar (resultados não apresentados). Isto se deve ao fato das fitotoxinas atuarem principalmente sobre estruturas membranosas, como organelas e membrana plasmática de células vegetais (PATIL, 1974). Em contrapartida, observou-se irregularidades na superfície das paredes internas e externas das células de tecidos tratados com taxtomina A (Figuras 5 e 6), isto deve ser devido a deposição irregular de celulose nas paredes, conforme descrito por Scheible et al. (2003).

Figura 5 – Eletromicrografias de transmissão de células do mesofilo foliar de coleóptilos de sorgo, tratados ou não com a fitotoxina taxtomina A. Em A e B observam-se células do tecido tratados com taxtomina A (200 µg / mL), apresentando plasmólise (setas) e ausência de cloroplastos. Em C e D observa –se células do tratamento controle, tratadas apenas com o meio de cultivo da bactéria, na ausência da toxina. Nota-se organização celular normal, ausência de plasmólise (setas) e presença de cloroplastos.

Figura 6 – Eletromicrografias de transmissão de células do mesofilo foliar de coleótilos de sorgo, tratados ou não com a fitotoxina taxtomin A. Em A e B observa-se células de tecidos tratados com taxtomin A (200 µg / mL) apresentando deformação nos cloroplastos (setas) e desorganização do citoplasma. Pode-se observar em A também uma célula binucleada apresentando invaginações nos núcleos. As imagens C e D representam células do tratamento controle, tratadas apenas com o meio de cultivo da bactéria, na ausência da toxina, apresentando cloroplastos com morfologia e turgidez normais.

3.2.3.2 Alterações bioquímicas provocadas pela taxtomina A

As diferentes concentrações de taxtomina A provocaram níveis de sintomas gradativos nas plântulas de sorgo tratadas (Figura 7). O bioensaio revelou a redução no teor de clorofilas A e B e no crescimento das plântulas em função das diferentes doses de taxtomina A (Figuras 7, 8 e 9). Estes resultados comprovam o uso da avaliação do teor de clorofilas A e B como parâmetros de avaliação de estresse causados por doenças e metabólitos de patógenos em plantas (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977).

Os resultados dos bioensaios com mesocótilos de sorgo demonstraram o claro efeito da fitotoxina na indução de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas (Figuras 7 e 10). Estas fitoalexinas servem como fatores bioquímicos de resistência pós-formados (PASCHOLATI, 1995). Nos dois ensaios observou-se um maior acúmulo de fitoalexinas na concentração 100 µg taxtomina A/ mL de água, conforme apresentado nas Figuras 7 e 10. Em concentrações acima de 150 µg taxtomina A/ mL observa-se a morte progressiva dos mesocótilos, o que justifica a redução na produção de fitoalexinas. Outras alterações morfológicas foram observadas, como: a formação de radículas apenas no controle e nos mesocótilos; o tratamento com 200µg taxtomina A ocorreu necroses no meristema apical após 1 dia, justificando o crescimento nulo obtido nesta dose, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Mesocótilos de sorgo com sete dias tratados com diferentes concentrações de taxtomina A proveniente de *Streptomyces* spp. As letras mostram as diferentes concentrações de taxtomina A.: “m” corresponde ao meio (controle) e as diferentes concentrações 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ taxtomina A. Observa-se redução de crescimento e acúmulo de fitoalexinas em função das concentrações de taxtomina A

Figura 8 – Alterações nas concentrações de clorofila A e B em plântulas de sorgo tratadas com diferentes concentrações de taxtomina A e com o extrato do meio de cultivo de *Streptomyces* spp. Avaliação após sete dias do tratamento. Média $\pm$ Desvio Padrão

Figura 9 – Alterações no crescimento em plântulas de sorgo tratadas com diferentes concentrações de taxtomina A. Avaliação após sete dias do tratamento. Média $\pm$ Desvio Padrão

Figura 10 – Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo tratados com diferentes concentrações de taxtomina A e incubados (25°C e fotoperíodo de 12 h.). Os dados estão expressos em Abs 480 nm / grama de tecido fresco (g.t.f.). Avaliação após sete dias do tratamento. Média $\pm$ Desvio Padrão

Os bioensaios envolvendo a permeabilidade seletiva das membranas, realizados com mesocótilos de sorgo tratados com taxtomina A, comprovam o efeito da toxina na membrana plasmática (Figura 11). Observou-se o aumento significativo da condutividade elétrica dos tecidos de sorgo, o que comprova a alteração da permeabilidade seletiva das membranas celulares.

Figura 11 – Alterações na permeabilidade seletiva da membrana plasmática de tecidos das plântulas de sorgo tratados com diferentes concentrações de taxtomina A. Os dados estão expressos em micro-Simens (mS) em função da diferenças na condutividade da membrana na solução de sacarose onde o tecido foi imerso. Avaliação após sete dias do tratamento. Média $\pm$ Desvio Padrão

Conforme comentado, o aumento na condutividade elétrica (Figura 11) demonstra que esta toxina altera a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, o que pode ser reforçado pelo fato da taxtomina A alterar o fluxo de íons, como Ca^{++} e H^+ (TEGG et al., 2005). Estes resultados podem ser somados a hipótese de Scheible et al. (2003), os quais acreditam que o principal sítio de ação da fitotoxina taxtomina A, seja o bloqueio da biossíntese de celulose.

3.2.3.3 Correlações entre as análises ultraestruturais e bioquímicas

Para analisar especificamente os efeitos associados à fitotoxina taxtomina A purificada, a principal toxina produzida pelo isolado de *S. scabies* IBSBF – 2147, a mesma foi aplicada em tecidos de sorgo e os tecidos foram avaliados após sete dias do tratamento. Os resultados das análises de MET e os resultados das análises bioquímicas dos tecidos tratados com taxtomina A foram complementares e em alguns casos similares. A membrana plasmática das células do mesofilo foliar mostrou-se retraída e destacada da parede celular em diversos pontos, sem o rompimento da mesma. Aparentemente, em todas as células dos tecidos do mesofilo foliar tratadas com a taxtomina A se observou desorganização significativa e deformações dos cloroplastos e perda de turgidez. Estas deformações nos cloroplastos foram seguidas pela redução do teor de clorofilas A e B no tecido avaliado. As plântulas também apresentaram um elevado acúmulo de fitoalexinas, de forma semelhante à presença do patógeno. Desta forma, doses mínimas da toxina poderiam ser exploradas devido a sua capacidade eliciadora, induzindo os mecanismos de defesa da planta.

A taxtomina A induziu alterações ultraestruturais, fisiológicas e bioquímicas nas células de sorgo similares aquelas causadas por outras fitotoxinas em outras plantas. Por exemplo, *Alternaria* spp. produz AM-toxina e AK-toxina que induzem invaginações da membrana plasmática (KOHMOTO et al., 1976; PARK et al., 1976; PARK 1978). Além disso, a taxtomina A afeta a forma do núcleo induzindo a formação de lóbulos (FRY; LORIA, 2002). Os núcleos no tecido de beterraba tratado com cercosporina apresentaram também lóbulos (STEINKAMP et al., 1981). A taxtomina A induz a deposição de material elétron-denso amorfo nas paredes de células de tubérculos da batata (STEIN et al., 1994). A justaposição da parede celular foi relatada também em muitos estudos ultraestruturais que envolvem toxinas, como por exemplo, vitorina (HANCHEY, 1981), AM-toxina I, e AK-toxina (PARK, 1978). Stein et al. (1994) estudaram aspectos citológicos de lesões de sarna da batata e relataram à presença de células com paredes grossas e amarronzadas. Estes autores mostraram também a ação da taxtomina A na

formação de depósitos de um material denso em ambos os lados das paredes celulares.

O efeito da fitotoxina taxtomina A sobre a redução do teor de clorofilas descrito neste trabalho, foi descrito também para outras toxinas bacterianas, como a tabtoxina de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em folhas de fumo. A tabtoxina provocou nas primeiras 16 horas redução da atividade fotossintética e nos teores das clorofilas A e B (TURNER; DEBBAGE, 1982).

Certamente, a taxtomina A, como diversas outras fitotoxinas, como a amilovorina (GOODMAN, 1972; HUANG; GOODMAN, 1976; GOODMAN; KIRALY; WOOD, 1986), fusicoccina (HANCHEY, 1981), e a vitorina (HANCHEY; WEELER; LUKE, 1968), induzem a plasmólise. (WALTON, 1996; WENZEL, 1985). Entretanto, o mecanismo pelo qual a taxtomina A é envolvida na alteração da integridade de células vegetais é ainda desconhecido. Stein et al. (1994) mostraram que as células de tecido de tubérculos de batata tratadas com a taxtomina apresentaram desorganização muito similar às células do tecido infectado por *S. scabies*. As plântulas tratadas com taxtomina A exibiram hipertrofia e não apresentaram aumento do número de células (LEINER et al., 1996), e em seus sistemas radiculares as células meristemáticas exibiram drástica redução da atividade mitótica (LORIA et al. 1997). Loria et al. (2001) sugeriram que a taxtomina A pode afetar a estrutura citoesquelética na divisão celular da planta. Neste trabalho, as células de sorgo tratadas com a taxtomina A não mostraram nenhuma hipertrofia; o que pode ser devido a alta concentração da toxina aplicada no tecido (200 µg) ou à natureza da espécie vegetal avaliada. Porém, o efeito da taxtomina A observado mais freqüentemente foi à ação sobre a membrana plasmática de células de sorgo, com a conseqüente indução de plasmólise.

3.3 Conclusões

A taxtomina A atua principalmente sobre a membrana plasmática de células vegetais, provocando alterações na permeabilidade seletiva da membrana, plasmólises, invaginações no núcleo, desorganização celular e atuando sobre cloroplastos, provocando deformações e redução no teor de clorofilas dos tecidos de plântulas de sorgo. Em contrapartida, o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo evidencia que concentrações mínimas desta toxina podem atuar como eliciadores da resposta de defesa em plantas.

Referências

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa* - Adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras; e formação de película sobre superfície de poliestireno.** 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.24, p.1-15, 1949.

BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron microscopy.** 2nd ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publ., 1999. 670 p.

CLARK, C. A.; LAWRENCE, A. Morphology of spore-bearing structures in *Streptomyces ipomoea*. **Canadian Journal of Microbiology**, Burnaby, v. 27, p.575- 579, 1981.

GOODMAN, R.D.; KIRALY, A.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease.** Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

GOODMAN, R.N. Phytotoxin-induced ultrastructural modifications of plant cells. In: WOOD, R.K.; BALLIO, A.; GRANITI, A. **Phytotoxins in plant disease.** New York: Academic Press, 1972. p. 211–328.

GOYER, C.; BEAULIEU, C. Host range of streptomycetes causing common scab. **Plant Disease**, St Paul, v. 81, p. 901–904, 1997.

GOYER, C.; OTRYSKO, B.; BEAULIEU, C. Taxonomic studies on Streptomycetes causing potato common scab: A review. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v.18, p.107-201, 1996.

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

FRY, B.A.; LORIA, R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.60, p.1-8, 2002.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose. Changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p. 251-258, 1977.

HANCHEY, P. Ultrastructural effects. In: DURBIN, R.E. (Ed.). **Toxins in plant disease**. New York: Academic Press, 1981. p. 449-475.

HANCHEY, P.; WEELER, H.; LUKE, H.H. Pathological changes in ultrastructure: effects of victorin on oat roots. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 53-61, 1968.

HOOKE, W.J. Common scab. In: AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul, 1981. p. 33-34.

HUANG, P.; GOODMAN, R.N. Ultrastructural modifications in apple stems induced by *Erwinia amylovora* and the fire blight toxin. **Phytopathology**, Lancaster, v.66, p. 269-276, 1976.

KING, R.R.; LAWRENCE, C.H. Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 1108-1110, 1996.

KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CALHOUN, L.A. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, p. 834-837, 1992.

KING, R.R.; LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. **American Potato Journal**, Orono, v. 68, p. 675-680, 1991.

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

KOHMOTO, K.; HAN, I.D.; RENBUTSU, Y.; TANIGUCHI, T.; NISHIMURA, S. Multiple host-specific toxins of *Alternaria mali* and their affect on the permeability of host cells. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 8, p. 141–153, 1976.

LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C.; KING, R.R. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, p. 606–608, 1990.

LEINER, R.H.; FRY, B.A.; CARLING, D.E.; LORIA, R. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 709-713, 1996.

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

LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A.; KING, R.R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Plant Disease**, St Paul, v. 81, p. 836-846, 1997.

LORIA, R.; CLARK, C.A.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A. Gram-positive bacteria: *Streptomyces*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2001. p. 236-249.

LORIA, R.; BIGNELL, D.R.D.; MOLL, SIMON.; HUGUET-TAPIA, J.C.; JOSHI, M.V.; JOHNSON, E.G.; SEIPKE, R.F.; GIBSON, D.G. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 93, p. 3-10, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MITCHELL, R.E. The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 22, p. 215–245, 1984.

NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HISPkind, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.33, p.271-278, 1988.

NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; L YONS, P.C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, Washington, v. 84, p. 5520-5524, 1987.

PARK, P. Origin of inclusive material between cell walls and invaginated plasma membranes in cells of susceptible leaves of Japanese pear treated with host-

specific toxin from *Alternaria kikuchiana* Tanka. **Physiological Plant Pathology**, Rockville, v. 11, p. 39–42, 1978.

PARK, P.; FUKUTOMI, M.; AKAI, S.; NISHIMURA, S. Effect of the host-specific toxin from *Alternaria kikuchiana* on the ultrastructure of plasma membranes of cells in leaves of Japanese pear. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 9, p. 167–174, 1976.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 365-392.

PATIL, S.S. Toxins produced by phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 259–279, 1974.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wrinkle-free sections on formvar-coated slot grids. **Ultramicroscopy**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 151-155. 1975.

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

SNYDER, B.; NICHOLSON, R.I. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site response to fungal ingress. **Science**, Washington, v. 248, p. 1637-1639, 1990

STEIN, B.; KING, R.; HAMMERSCHMIDT, R. Ultrastructure of *in vitro* cultured potato tubers inoculated with thaxtomin A. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, p. 1112, 1994.

STEINKAMP, M.P.; MARTIN, S.S.; HOEFERT, L.L.; RUPPEL, E.G. Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 71, p. 1272–1281, 1981.

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

TURNER, J.G.; DEBBAGE, J.M. Tabtoxin-induced symptoms are associated with accumulation of ammonia formed during photorespiration. **Physiological Plant Pathology**, Rockville, v. 20, p. 223–233, 1982.

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

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

ANEXO

Figura 1 - Curva padrão da concentração de concanamicina A por unidades de área determinada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Figura 2 - Curva padrão da concentração de concanamicina B por unidades de área determinada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Figura 3 - Curva padrão da concentração de taxtomina A por unidades de área determinada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).