

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

**Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango
(*Fragaria x ananassa*) por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp. nov.**

Leonardo José da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2013**

Leonardo José da Silva
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*)
por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp. nov.**

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Silva, Leonardo José da
Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*)
por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp. nov. / Leonardo José da Silva. - - Piracicaba,
2013.
97 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Quitinases 3. Ionóforos 4. Abordagem polifásica I. Título

CDD 632.96
S586c

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

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, exemplo de superação
e a minha mãe, exemplo de resistência:*

Ofereço

*A todos aqueles que acreditaram
no que parecia ser impossível:*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato a Deus. Palavras seriam insuficientes para descrever tamanho amor e poder;

Aos esforços de meus pais, que abdicaram totalmente de conforto e regalias, para oferecerem educação aos filhos. Serão para sempre, exemplos de superação, força e perseverança;

A minha mulher, Adriana Ferreira, que sempre apoiou, compreendeu e trouxe-me esperança nos momentos de instabilidade;

Aos grandes amigos, que participam dos momentos difíceis: Felipe Nogueira, Daniel Franco, Luiz Vicente, Sérgio Rosa, Gustavo Pan, Carlos Cassiano, Eliseu Correa, Ederaldo Bueno, Flavio Dias, Felipe Cucchi, José Romoaldo, Samir Zauk, Eduardo Garcia, Henrique Cesar e Marcos Galo;

Aos amigos de trabalho: Fábio Soares, Suikinai Nobre, Wallace Souza, Joelma Marcon, Rafael Vasconcellos, Eduardo Crevelin, Rodrigo Taketani, Natália Taketani, Rodrigo Mendes, Vanessa Nesser, Rafael Eduardo, Fábio Paulino, Danilo Tosta, Oswaldo Ferreira, Michelli Santos, Mirian Saber, Milena Lançoni, Rute Mendes, Jayme Pierone, Cassiano Forner, Tatiane Rigamonte, João Luiz, Roseli Nascimento e Marcia Parma;

Aos orientadores e responsáveis pelo desenvolvimento acadêmico-científico: Dr. Itamar Soares de Melo e Dr. Tiago Domingues Zucchi;

Ao suporte acadêmico oferecido pelo Programa de Microbiologia Agrícola (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP), em especial ao Dr. Fernando Dini Andreote;

Ao suporte técnico concedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio Ambiente – CNPMA) e pela Universidade de São Paulo (Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Química de Produtos Naturais – FFCLRP/USP);

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo e pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela contribuição financeira realizada, por meio dos projetos (11/14333-6 e 11/50234-1).

EPÍGRAFE

"Nunca é tarde demais para começar tudo de novo"

Raul Seixas

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 O desenvolvimento e a condição atual do agronegócio no Brasil.....	17
2.2 A fruticultura no Brasil.....	18
2.3 A produção de morangos	19
2.3.1 Doenças em pós-colheita à cultura do morangueiro.....	20
2.3.2 <i>Botrytis cinerea</i> – Fungo fitopatogênico causador de perdas agrícolas	21
2.4 Problemas fitossanitários derivados da aplicação excessiva de agroquímicos.....	22
2.5 Controle biológico – Uma alternativa à agricultura sustentável.....	23
2.5.1 Avanços biotecnológicos - Quitinases.....	24
2.5.2 Avanços biotecnológicos – Metabólitos secundários de origem microbiana.....	25
2.5.2.1 O gênero <i>Streptomyces</i>	26
2.5.3 Abordagem taxonômica polifásica	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Ativação das linhagens de trabalho – <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T e <i>Botrytis cinerea</i>	31
4.2 Potencial quitinolítico “in vitro” da linhagem <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T	31
4.2.1 Curva de produção enzimática, influência de pH e temperatura à atividade relativa do complexo quitinolítico.....	31
4.2.2 Influência de sais inorgânicos à atividade relativa do complexo quitinolítico.....	32
4.2.3 Potencial bioativo do complexo quitinolítico produzido pela linhagem ASBV-1 ^T , frente a germinação conidial de <i>Botrytis cinerea</i>	32
4.3 Potencial bioativo “in vitro” da linhagem <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T , contra o crescimento de <i>Botrytis cinerea</i>	32
4.3.1 Produção e extração de metabólitos secundários	33
4.3.1.1 Atividade dos biocompostos “in vitro” e “in vivo”.....	33
4.3.1.2 Caracterização química dos compostos bioativos presentes no extrato bruto de <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T	34

4.3.1.3 Compostos bioativos – Curva de produção, influência de sais inorgânicos e geração de biomassa.....	35
4.4 Taxonomia polifásica da linhagem ASBV-1 ^T	35
4.4.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA.....	35
4.4.2 Hibridização.....	36
4.4.3 Quimiotaxonomia.....	36
4.4.4 Características culturais, morfológicas, fenotípicas e bioquímicas.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Potencial quitinolítico da linhagem <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T	39
5.2 Curva de produção enzimática, influência de pH e temperatura à atividade relativa do complexo quitinolítico.....	39
5.2.1 Influência da adição de sais inorgânicos sob o complexo quitinolítico produzido pela linhagem <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T	41
5.2.2 Potencial bioativo do complexo quitinolítico produzido pela linhagem ASBV-1 ^T , frente a germinação conidial de <i>Botrytis cinerea</i>	41
5.3 Potencial bioativo “in vitro” da linhagem <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T , contra o crescimento de <i>Botrytis cinerea</i>	42
5.3.1 Atividade dos biocompostos “in vitro” e “in vivo”.....	44
5.3.2 Caracterização química dos compostos bioativos presentes no extrato bruto de <i>Streptomyces</i> ASBV-1 ^T	46
5.3.3 Compostos bioativos – Curva de produção, influência de sais inorgânicos e geração de biomassa.....	50
5.4 Taxonomia polifásica da linhagem ASBV-1 ^T	52
5.4.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA e hibridização.....	52
5.4.2 Quimiotaxonomia.....	54
5.4.3 Características culturais, morfológicas, fenotípicas e bioquímicas.....	56
6 DISCUSSÃO.....	61
6.1 Linhagem ASBV-1 ^T – Complexo enzimático quitinolítico.....	61
6.2 Linhagem ASBV-1 ^T . – Metabólitos secundários e biocontrole de <i>Botrytis cinerea</i>	62
6.3 <i>Streptomyces araujoniae</i> sp. nov. – Taxonomia polifásica.....	64
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	81

RESUMO

Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*) por *Streptomyces araujoniae* sp. nov.

A produção brasileira de alimentos cresce em ritmo vertiginoso, havendo previsão de expansão nos próximos anos. Nota-se, porém, que o modelo atual empregado ao controle de doenças e pragas agrícolas, tem causado diversos problemas de ordem ambiental, social e econômica. Uma alternativa à redução de tais impactos, tem sido a implementação do controle biológico no modelo de manejo. Neste trabalho, avaliou-se o controle biológico do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* por compostos produzidos pela linhagem ASBV-1^T. Os *screenings* “in vitro” demonstraram que a linhagem produz quitinases e metabólitos secundários ativos, conhecidamente descritos como fatores importantes ao controle de fitopatógenos. A caracterização parcial do complexo enzimático, indicou que as quitinases produzidas pela linhagem ASBV-1^T apresentam maior atividade em meio alcalino (pH 6.8-10.0), temperatura de 30°C e possuem estimativa de peso molecular superior a 100 kDa. Os ensaios “in vivo”, realizados em morangos comerciais (cv. Oso Grande) demonstraram a efetividade dos subprodutos bioativos de caráter ionóforos (monactina, dinactina, trinactina, tetranactina e valinomicina) em controlar a infestação de *B. cinerea*, durante a fase de pós-colheita, em condições de armazenamento. Por meio da suplementação do meio de cultivo por sais inorgânicos, a via biossintética responsável pela expressão dos compostos de interesse pode ser ativada. A adição de MgSO₄ resultou em um aumento de 400% na produção de macrotetralídeos e 20% de valinomicina. Contudo, a expressão dos macrotetralídeos foi completamente inibida pela adição de ZnSO₄, dobrando a produção de valinomicina. De acordo com os estudos de taxonomia polifásica, o isolado ASBV-1^T, apresenta características quimiotaxonômicas e moleculares pertinentes ao gênero *Streptomyces*, formando uma nova linha filética, no subclado das espécies *S. albolongus*, *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* e *S. celluloflavus*. Diante do supra citado, propõem-se que o isolado seja reconhecido como a linhagem tipo de *Streptomyces araujoniae* sp. nov. Os resultados obtidos neste trabalho, permitem afirmar que a linhagem *S. araujoniae* sp. nov. apresenta potencial de ação contra o fitopatógeno *B. cinerea*, podendo auxiliar no controle desta doença durante a fase de pós-colheita da cultura de morangos. Ainda resta, para estudos futuros, o desenvolvimento de formulação específica para o emprego destes compostos no manejo da cultura, bem como ensaios toxicológicos, assegurando a viabilidade de aplicação de tais compostos.

Palavras-chave: Controle biológico; Quitinases; Ionóforos; Abordagem polifásica

ABSTRACT

Biological control of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry (*Fragaria x ananassa*) by *Streptomyces araujoniae* sp. nov.

The Brazilian food production has been growing fast in recent years and is expected to expand even more. However, the models used for the control of pests and diseases in agriculture has been widely questioned because they cause problems of environmental, social and economic. To reducing the use of chemical agents, has been the implementation of biological control to the management model to reduce this problematic. In this study, we evaluated the biological control of fungal pathogen *Botrytis cinera* of active compounds produced by strain ASBV-1^T. In vitro assays indicated the presence of chitinase and antifungal metabolites in compounds produced by strain ASBV-1^T and may been contributed to the antagonistic activity againts the fungal pathogenic. Partial characterization of the enzymatic complex showed the highest production of chitinase under alkalines conditions at pH (6.8-10.0), 30°C and has estimated molecular weight above 100 kDa. The test in vivo, preformed in commercial strawberries (cv. Oso Grande) demonstrated the effectiveness of bioactive products of character ionophores (monoactin, dinactin, trinactin, tetranactin and valinomycin) controlling the infestation of *B. cinerea* during the post-harvest, in store conditions. The biosynthetic pathway responsible for the expression of the compounds of interest can be activated by supplementations of the culture medium by inorganic salts mainly with MgSO₄ resulted in increse of 400% in the production of macrotetralides and 20% valinomycin. However, the expression of the macrotetralides was inhibited when added ZnSO₄, bending the production of valinomycin. According to polyphasic taxonomic studies, the isolated ASBV-1^T has chemotaxonomic and molecular characteristics of the genus *Streptomyces*, which formed a new phyletic line, in subcalde of the *S. albolongus*, *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* e *S. celluloflavus* species. Then propose that the isolate is recognized as the type strain of *Streptomyces araujoniae* sp. nov. The results obtained in this study revealed that *S. araujoniae* sp. nov. has action potential against the pathogen *B. cinerea*, can help control this disease during the post-harvest strawberries. Remains for future studies, the development of specific formulation of the employment of such compounds to crop management and toxicological tests, ensuring the feasibility of using such compounds.

Keywords: Biological control; Chitinases; Ionophores; Polyphasic approach

1 INTRODUÇÃO

O setor agrícola desempenha um papel de extrema importância para o Brasil. O país desponta como o terceiro maior produtor mundial de alimentos, com destaque para a produção de soja, cana de açúcar, milho, café e laranja. Nos últimos anos, o agronegócio foi responsável pelo superávit comercial nacional, acumulando cerca de 40% do total de empregos, respondendo por quase metade das exportações e um terço do produto interno bruto.

Apesar do agronegócio brasileiro apresentar um crescimento vertiginoso, impactando positivamente na economia nacional, o atual modelo empregado na produção vem ocasionando inúmeros problemas de ordem ambiental e social. A aplicação ostensiva de agroquímicos para o controle de pragas e doenças agrícolas tem causado a contaminação de solos, rios e lençóis freáticos, seleção de estirpes resistentes a diversas moléculas químicas, supressão de organismos essenciais à ciclagem de nutrientes e intoxicação de trabalhadores e consumidores. .

O levantamento realizado em 2010 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstrou que 30% dos alimentos analisados continham elevado índice residual de agrotóxicos e/ou continham resíduos de compostos químicos não permitidos pela legislação atual. As culturas de pimentão, morango e pepino lideram o ranking dos alimentos com maior taxa agroquímica residual, devendo por tanto receber uma atenção especial, com relação a forma de manejo empregada atualmente.

Tais adversidades têm impulsionado inúmeras pesquisas para um novo modelo de agricultura sustentável, em que o manejo integrado e o controle biológico de doenças e pragas agrícolas apresentam-se como alternativas promissoras. Apesar de demandar um maior entendimento sobre a ecologia, a taxonomia, a fisiologia dos espécimes, bem como das interações biológicas da comunidade ambiental, o controle biológico possibilita reduzir a degradação do ambiente, permitindo a satisfação das necessidades humanas e ambientais das gerações atuais e futuras.

Neste contexto, o estreptomiceto ASBV-1^T – isolado de tubérculos de batata e ativo contra *Aspergillus parasiticus* (entre outros fungos fitopatogênicos) – foi avaliado com relação ao seu potencial bioativo, frente a infestação de *Botrytis cinerea*, em pós-colheita de morangos. O entendimento dos mecanismos de ação da linhagem ASBV-1^T, em controlar o desenvolvimento de *B. cinerea* poderá auxiliar a formulação de bioprodutos capazes de modificar o modelo atual empregado à produção, reduzir a necessidade de cargas químicas

excessivas, aumentar o tempo de viabilidade do produto e possibilitar a adequação deste produto aos mercados externos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O desenvolvimento e a condição atual do agronegócio no Brasil

Inúmeras ações adotadas por meio de políticas públicas possibilitaram a expansão agrícola do Brasil ao longo das últimas décadas. Considerando os últimos 50 anos, o agronegócio brasileiro apresentou um crescimento de aproximadamente 775% (AGRONEGÓCIO, 2011). Detentor de um território equivalente a 8.514.876 Km², com uma população estimada em mais de 190 milhões de habitantes (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010), o Brasil destaca-se entre os demais países da América do Sul por desempenhar um papel imprescindível ao cenário agrícola mundial.

O Brasil lidera o ranking produtivo de laranja, cana de açúcar e café, e está entre os maiores produtores mundiais de soja, milho e carne bovina (FAO, 2009). É considerado atualmente o terceiro maior produtor de alimentos, atrás apenas de Estados Unidos e China (BRASIL, 2011) e o quinto maior produtor de grãos, atrás de China, Estados Unidos, União Europeia e Índia (FAO, 2012). O país é atualmente o segundo maior produtor de soja e milho. Outra cultura que ocupa lugar de destaque, dentre o agronegócio brasileiro é a cana de açúcar. Recentemente, o Brasil se tornou o maior exportador de açúcar e álcool, e segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, metade do açúcar comercializado no mundo é proveniente do Brasil (BRASIL, 2012).

As culturas de soja, milho e cana de açúcar respondem por aproximadamente 70% do total de agrotóxicos utilizados no Brasil (IBAMA, 2010). A utilização destas cultivares na produção de combustíveis, bem como o sistema atual empregado de monocultura extensiva, contribuem para a utilização massiva de agrotóxicos, que impactam diretamente ao meio ambiente, através de contaminações em rios, lençóis freáticos, avifauna e acúmulo em solo.

A importância do agronegócio para o país, pode ser melhor compreendida por meio de sua representatividade econômica. O setor corresponde a 33% do produto interno bruto nacional, 37% dos empregos, 42% das exportações e a totalidade do superávit comercial nos últimos anos (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - CEPEA, 2011).

Fatores ambientais favoráveis à produção de alimentos, tais como, disponibilidade de terras aráveis, abundância de recursos hídricos e potencialidade ao uso e desenvolvimento de energia renovável fazem do Brasil um país de destaque no mercado global, possibilitando que nos próximos anos, o país se torne o maior fornecedor de alimentos do mundo.

Algumas projeções realizadas pelo Ministério da Agricultura indicam que as áreas plantadas deverão crescer aproximadamente 10 milhões de hectares nos próximos anos,

totalizando uma área equivalente a 70 milhões de hectares no ano de 2020. Esta expansão agrícola permitirá ao país um aumento de aproximadamente 40% da produção de grãos, dentre eles: soja, milho, trigo, arroz e feijão (BRASIL, 2010). Entretanto, esses incrementos à produtividade vêm sendo, nos últimos anos, conseguidos com o aumento desenfreado na utilização de defensivos agrícolas. Segundo o relatório de direitos humanos apresentado em 2012, o Brasil lidera o ranking de consumo de defensivos agrícolas desde 2009. A quantidade aplicada em solo nacional anualmente corresponde a 20% do total de agroquímicos produzidos no mundo.

Nos últimos cinco anos, o aumento do consumo destes compostos pelo país, esteve na ordem de 43%, totalizando aproximadamente 10 kg.ha⁻¹. Dentre os inúmeros problemas decorrentes do uso abusivo de agroquímicos destacam-se as intoxicações. No intervalo entre 1999 e 2009 foram relatados 62.000 casos, havendo 1.900 mortes (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS, 2010). Estimativas apontam uma subnotificação destes casos de intoxicações, na proporção de um para cada cinquenta casos, além dos estágios crônicos, decorrentes da exposição prolongada a pequenas quantidades destes compostos, que dificilmente são diagnosticados e conseqüentemente notificados (BOCHNER, 2007).

2.2 A fruticultura no Brasil

As dimensões territoriais apresentadas pelo Brasil, somadas as condições edafoclimáticas e sua posição geográfica privilegiada possibilitaram ao país a produção de frutas habituadas a clima tropical e temperado (ANDRIGUETO, 2004). A área utilizada pela fruticultura é de aproximadamente 2.000.000 ha, gerando anualmente 40 milhões de toneladas, concedendo ao Brasil o terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais de frutas (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2010).

O setor desempenha um importante papel econômico-social, responsável por 27% do total de empregos da área agrícola, gerando aproximadamente 5,5 milhões de empregos diretos. A fruticultura está presente em todos os estados do país, sendo muitas vezes uma fonte de renda exclusiva aos pequenos produtores, sendo considerada uma força motriz às economias locais estagnadas e com poucas alternativas ao desenvolvimento (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Apesar da alta produção de frutas pelo Brasil, as exportações compõem apenas 2% do mercado mundial do setor (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2010). Esta

condição é decorrente de legislações limitantes às importações e padrões fitossanitários rigorosos exigidos pelos países importadores entre outras barreiras internacionais.

Com o objetivo de expandir os domínios de exportação, o conceito de Sistema de Produção Integrada de Frutas – PIF, originário nos anos 70 na Europa – passou a ser aplicado por algumas regiões do Brasil a partir do final do século passado. Este sistema visa atender as necessidades de toda a cadeia produtiva, permitindo rentabilidade, certificação, qualidade adequada ao patamar exigido pelo mercado internacional e sustentabilidade ambiental.

2.3 A produção de morangos

A cultura do morango (*Fragaria vesca* L.) foi inicialmente valorizada pelos povos europeus, por apresentar um alto valor nutritivo, ornamental e medicinal. O desenvolvimento de cultivares adaptados, principalmente às variações climáticas, tem possibilitado o cultivo de morangueiros em diversas regiões do mundo (SILVA et al., 2007). O morangueiro trata-se de uma planta herbácea, rasteira e perene. Possui um sistema radicular fasciculado, concentrando a maior parte de suas raízes nos cinco primeiros centímetros de solo (FILGUEIRA, 2003). A principal cultivar comercial é a espécie *Fragaria x ananassa* Duch. Ex. Rozier, obtida por meio do híbrido entre as espécies *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. e *Fragaria virginiana* Duch (GALLETTA; BRINGHURST, 1990).

O desenvolvimento do receptáculo floral permite a formação da porção carnosa, denominada pseudofruto. O consumo “in natura” constitui a principal forma de comercialização, por conta da apreciação às peculiaridades apresentadas, tais como: sabor, coloração, aroma e ótimo valor nutricional (SANTOS et al., 2007).

Os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo correspondem aos principais produtores da cultura no país, com valores aproximados de 41,5%, 25,5% e 15,4%, respectivamente, compreendendo uma área estimada de 3,5 mil hectares (OLIVEIRA et al., 2008). A produção mundial no ano de 2010 correspondeu a 4.366.662 toneladas, sendo que os principais produtores foram Estados Unidos e Espanha (FAO, 2010).

Em relação a produção nacional, estima-se que no ano de 2010 foram produzidas aproximadamente 105 mil toneladas, dentro de um sistema classificado como agricultura familiar (BORTOLOZZO et al., 2007). Apesar deste sistema desempenhar um importante papel social, o mesmo dificulta a padronização de técnicas agrícolas, bem como as informações relacionadas à produção e qualidade das culturas (CARVALHO, 2006).

2.3.1 Doenças em pós-colheita à cultura do morangueiro

A cultura do morangueiro, assim como grande parte das culturas intensivas, encontra alguns fatores limitantes à produção, como por exemplo, mudas de baixa qualidade, pouca disponibilidade de cultivares resistentes, manejo inadequado, variações de temperatura, umidade do ar e de solo desfavoráveis, além da ação indesejada de patógenos e pragas (SILVA et al., 2007). Os dados literários assumem 51 espécies fúngicas, 3 espécies bacterianas, 8 espécies de nematoide e 26 espécies de vírus como causadores diretos de efeitos adversos à cultura do morangueiro (MAAS, 1998).

Os danos causados por tais fitopatógenos podem acometer todos os estágios da cultura do morangueiro, havendo pouca informação relacionada à possível redução de perdas durante o período de pós-colheita. As principais adversidades causadas durante o intervalo entre colheita e consumo estão relacionadas a ação de fungos, tais como: *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium digitatum* (BAUTISTA-BANOS et al., 2003).

O tempo de prateleira (*shelf life*) para os pseudofrutos de morangueiro é relativamente curto, podendo ser estimado em até uma semana. Injúrias ocasionadas durante o procedimento de colheita e/ou formas de acondicionamento favorecem o desenvolvimento do patógeno. A infestação por *B. cinerea*, nas condições de campo, pode reduzir em até 40% a comercialização de morangos. Nos casos de infestação severa, as perdas podem atingir 60-70%, resultando em uma perda total no lucro do produtor (CALIFORNIA STRAWBERRY COMMISSION; THE CALIFORNIA MINOR CROPS COUNCIL - CSC; CMCC, 2003). Um fator agravante para a infestação por *B. cinerea* é a capacidade de seus conídios e micélios se desenvolverem em temperaturas próximas a 0°C (DORBY; LICHTER, 2007; LAHLALI et al., 2007), tornando este fitopatógeno o principal causador de perdas da cultura.

As técnicas empregadas atualmente, como forma de controle do patógeno durante as fases de pré e pós-colheita constituem-se principalmente na aplicação de fungicidas, os quais reduzem a qualidade do produto, oferecem riscos à saúde, restringem o mercado consumidor e causam prejuízos ambientais (DOTTO et al., 2011). Alguns poucos produtos biológicos estão sob avaliação para mitigar os danos causados por esse fungo em câmaras de armazenamento. Estes produtos foram desenvolvidos para leguminosas e frutas e constituem-se de linhagens de *Candida oleophila* (ASPIRE – Isolado I-182), *Metschnikowia fruticola* (SHEMER) e *Trichoderma harzianum* (TRICODEX – Isolado T-39) (FRAVEL, 2005; BLACHINSKY et al., 2007) e geralmente competem por nutrientes e sítios de colonização, além da ação por micoparasitismo, produção de antibióticos, indução de resistência e supressão à esporulação

(SUTTON et al., 1997; FILONOW, 1998; JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998; PAULITZ; BÉLANGER, 2001; JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002).

2.3.2 *Botrytis cinerea* – Fungo fitopatogênico causador de perdas agrícolas

Conhecido popularmente como ‘mofo cinzento’, o fungo *Botrytis cinerea* - Pers. [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel], é um patógeno facultativo que vive saprofiticamente no solo, podendo permanecer dormente por longos períodos na forma de escleródios. Sua disseminação ocorre principalmente em decorrência do transporte de conídios por correntes de ar ou insetos (KRUGNER; AUER, 2005; FURTADO et al., 2000).

A doença causada por este fitopatógeno afeta todos os estágios do desenvolvimento vegetal, causando grandes prejuízos na produção de ornamentais, oleráceas, florestais e frutíferas. Apresenta uma maior incidência em sistemas protegidos, mas pode também, alcançar níveis consideráveis em campo aberto e câmaras de armazenamento, causando enormes prejuízos qualitativos e quantitativos (MORANDI, 2001).

Jarvis (1989) descreve o patógeno como um fungo necrótico que se estabelece e se multiplica inicialmente em tecidos vegetais mortos, colonizando posteriormente os tecidos vivos adjacentes. O fungo pode penetrar no tecido através de ferimentos, ocasionados durante o manejo e/ou colheita (BRAUN; SUTTON, 1987), ou pela ação direta do apressório, mediada pela secreção de enzimas degradadoras da parede celular, como por exemplo, as poli-galacturonase e cutinases (RHA et al., 2006; CHOQUER et al., 2007).

A doença acomete principalmente os tecidos jovens da parte aérea das mudas, atingindo posteriormente folhas e caules, causando a morte do ápice ou até mesmo da muda. O sintoma característico inicia-se com o enrolamento das folhas, seguido de seca e queda. Pode ocorrer sobre as partes afetadas o surgimento de tufos acinzentados, decorrente da massa de conídios fúngicos (KRUGNER; AUER, 2005).

No Brasil, a doença tem sido constatada principalmente nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Algumas condições são descritas como favoráveis ao desenvolvimento de *B. cinerea*, dentre elas destacam-se: i) condições precárias de higiene; ii) temperaturas entre 10 e 25°C; iii) umidade elevada e baixa luminosidade e iv) manejo inadequado (ALFENAS et al., 2004).

Em condições ambientais adversas ou em que o estado fisiológico do tecido do hospedeiro esteja favorável à penetração do patógeno, mas não ao crescimento ativo, o mesmo causará uma infecção latente. Transcorrida a fase adversa, o fungo colonizará os

tecidos adjacentes, produzirá esporos e reiniciará um novo ciclo de infecção (BENITO et al., 2000).

A aplicação intensiva de fungicidas, principal forma de controle deste patógeno, vem selecionando estirpes resistentes a inúmeros grupos químicos. Elad et al. (1994), constataram que a utilização de fungicidas dos grupos benzimidazóis (carbendazim, benomil e tiabendazol) e das dicarboximidas (iprodione, procimidone e vinclozolin) em culturas protegidas de tomate não foram capazes de erradicar a incidência de mofo cinzento.

2.4 Problemas fitossanitários derivados da aplicação excessiva de agroquímicos

A utilização irregular e descontrolada de agentes químicos agrícolas causou a morte de milhares de pessoas nas últimas décadas. Nos anos 2010 e 2011 foram registrados mais de 1.500 casos de intoxicações causadas por agrotóxicos. Os casos não se concentram apenas nos trabalhadores rurais, expostos a agentes nocivos, mas também nos moradores das proximidades agrícolas e nos consumidores de produtos contendo elevadas concentrações de resíduos químicos (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS, 2010).

O levantamento realizado em 2010, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstrou que 30% das amostras apresentavam qualidade insatisfatória ao Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA). A agência apontou o emprego de agentes químicos proibidos à cultura avaliada, como também a presença de resíduos químicos acima do limite permitido (ANVISA, 2011). Dentre as inúmeras informações apresentadas nesse levantamento, destaca-se a presença do composto químico organofosforado metamidofós. O mesmo foi evidenciado em amostras de alface, arroz, beterraba, cenoura, couve, mamão, morango, pepino, pimentão, repolho e tomate (ANVISA, 2011).

Os primeiros organofosforados foram inicialmente sintetizados por Gerhard Schraeder, no ano de 1930, em trabalhos voltados ao desenvolvimento de inseticidas. Posteriormente, tais moléculas foram modificadas e chegaram a ser aplicadas como armas de guerra. A molécula atua na diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase, considerada a principal responsável pelo controle de impulsos nervosos, sendo portanto, essencial ao bom funcionamento do organismo. A inibição enzimática acarreta ao organismo, o acúmulo de acetilcolina e conseqüentemente um colapso do sistema nervoso central por superestimulação, causando perda do controle muscular, convulsões e morte por parada cardiorrespiratória (DOMINGOS, 2003).

As culturas de pimentão, morango e pepino apresentam as maiores taxas residuais dentre os alimentos analisados no ano de 2010. Os valores insatisfatórios, referentes à taxa amostral foram de 90%, 63% e 58%, respectivamente (ANVISA, 2011). Tal situação reforça a urgência de medidas alternativas para o modelo atual. A produção de alimentos livres de agrotóxicos ou com certificação de qualidade permitirão a valorização destes produtos e a disponibilização dos mesmos para exportação.

2.5 Controle biológico – Uma alternativa à agricultura sustentável

A utilização intensiva de agentes químicos, com o objetivo de mitigar danos causados por doenças, plantas invasoras ou pragas na agricultura, tem resultado em diversos problemas de ordem ambiental, como por exemplo, o alto teor residual em alimentos, acúmulo de compostos químicos indesejáveis no solo e contaminações de bacias hidrográficas e lençóis freáticos. O uso indevido desses defensivos ainda pode levar à intoxicação de agricultores, surgimento de doenças carcinogênicas, desequilíbrio ecológico, redução da biodiversidade, além de patógenos, pragas e plantas resistentes (PAULA JÚNIOR et al., 2005).

Por conta desses riscos, nota-se uma alteração do cenário agrícola mundial, com o surgimento de um mercado voltado ao consumo de alimentos isentos, ou com certificação de aplicação de defensivos agrícolas dentro dos parâmetros estabelecidos. A pressão da sociedade tem incentivado diversos países se adequarem aos interesses de suas populações, exigindo uma diminuição na aplicação de pesticidas. Dentre as possibilidades à redução do uso de agrotóxicos, o controle biológico vem se tornando uma alternativa viável (ZUCCHI, et al., 2008).

Controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação de plantas e animais, por inimigos naturais. O controle de um micro-organismo pela ação direta de outro micro-organismo antagônico pode ser decorrente da antibiose, do parasitismo, da competição, da predação ou da hipovirulência (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000). Além disso, o controle biológico pode ser uma alternativa para os países em desenvolvimento, carentes de recursos financeiros e com grande potencial agrícola (MELO; AZEVEDO, 2000).

A evolução prática do controle biológico deu-se de forma diferenciada nas diversas regiões do mundo. Os primeiros bioinseticidas foram desenvolvidos por volta dos séculos XVIII e XIX. O estudo de antagonistas ao controle de doenças de plantas difundiu-se em 1920, porém somente nos anos 70 tornou possível obter uma base sólida com relação ao controle biológico de doenças e pragas por meio de agentes microbianos (LOPES, 2009).

A aplicação de micro-organismos como os vírus, as bactérias e os fungos, como agentes de biocontrole, tem se mostrado eficiente à redução de efeitos danosos causados por pragas e fitopatógenos. Atualmente, os micro-organismos utilizados como base de controle estão sendo adequados às particularidades de cada organismo alvo, por meio do melhoramento genético (MELO; AZEVEDO, 2000). Este procedimento possibilita uma maior efetividade e especificidade do produto, além de auxiliar nos processos de formulação.

Geralmente, os agentes de biocontrole apresentam vantagens sobre os pesticidas por serem considerados produtos ‘verdes’ e por apresentarem mais de um modo de ação para controlar os organismos-alvo. Dentre eles, destacam-se:

- Competição: Disputa por espaço e/ou nutrientes em um determinado nicho ecológico. Organismos descritos como estrategistas “r” são eficientes para este processo (DJONOVIC et al., 2007).
- Micoparasitismo: Degradação da parede celular fúngicas, por ação enzimática. O gênero *Trichoderma* apresenta diversos micro-organismos controladores para fungos fitopatogênicos (CHET; BENHAMOU, 1998).
- Indução de resistência: Leveduras e bactérias antagônicas aplicadas em superfície foliar têm sido relatadas como indutoras à resistência ao agente infeccioso *Botrytis cinerea* (ELAD et al., 1994; ZAHAVI et al., 2000; HELBING, 2001).
- Antibiose: Inibição do crescimento microbiano, por meio da produção de compostos bioativos, resultantes do metabolismo secundário. O gênero *Streptomyces* destaca-se entre os demais micro-organismos pela alta eficiência em metabolizar tais compostos (BERDY, 2005).

2.5.1 Avanços biotecnológicos - Quitinases

Dentre as inúmeras áreas tecnológicas em crescimento desde a década de 70 destaca-se a biotecnologia, capaz de gerar riqueza e influência direta aos setores de economia, saúde, processamento de alimentos, agricultura, proteção ambiental e desenvolvimento de materiais (GAVRILESCU; CHISTI, 2005).

Somente no ano de 2007 foram movimentados cerca de 2,3 bilhões de dólares no mercado mundial de enzimas, com estimativa de que nos próximos anos este valor possa alcançar 3,0 bilhões de dólares (THAKORE, 2008).

Reconhecida como o segundo polímero mais abundante do planeta, a quitina está presente na cutícula de artrópodes, exoesqueleto de crustáceos e parede celular da maioria dos fungos (YEN; YANG; MAU, 2009). Em fungos, protozoários e invertebrados a quitina desempenha papel determinante à morfogênese, sendo considerada uma importante molécula

de defesa em vertebrados e inúmeras espécies vegetais (PATIL; GHORMADA; DESHPANDE, 2000). Por meio da síntese de quitinases, espécies bacterianas empregam a quitina e *N*-acetilglicosamina em seus processos metabólicos como fonte de carbono e energia (SVITIL et al., 1997; WANG; CHANG, 1997; ZOBELL; RITTENBERG, 1938). A hidrólise da quitina acarreta uma desestruturação nos tecidos (insetos) e células (fungos e bactérias) dos organismos-alvos levando-os a morte. Essa característica viabiliza o emprego de micro-organismos produtores de quitinase, como agentes de biocontrole à fungos fitopatogênicos e insetos-pragas (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006), podendo assim, reduzir o emprego excessivo de moléculas químicas nocivas.

2.5.2 Avanços biotecnológicos – Metabólitos secundários de origem microbiana

De modo geral, as substâncias naturais isoladas de micro-organismos apresentam uma importância sem precedentes, não só como medicamento (antibióticos e imunossupressores), mas também relacionado aos agroquímicos, sendo estes menos danosos à saúde humana e ao meio ambiente (PINTO et al., 2002). Além disso, o biocontrole também é considerado um processo econômico compatível com as comunidades agrícolas de baixa renda (ROBBS, 1986).

Atualmente são conhecidos cerca de 10 milhões de produtos naturais derivados de fontes microbianas. A revolução da “Era Dourada“ dos antibióticos, entre as décadas de 40 e 50, foi iniciada pela descoberta da Penicilina por Alexander Fleming. O período foi compreendido também pela descoberta da grande maioria dos antibióticos antibacterianos (tetraciclina, cefalosporina, aminoglicosídeos, macrolídeos e estreptomicina).

Este período foi marcado também pela descoberta de compostos antitumorais, antivirais, antibióticos agrícolas e pelo início da utilização de metabólitos microbianos no campo da farmacologia (por exemplo, a ciclosporina). Na década de 40 foram descobertos cerca de 10 a 20 tipos de antibióticos, nas décadas seguintes, cerca de 300-400; em 1960, aproximadamente 800-1000 e em 1970, já se conheciam cerca de 2500 antibióticos (BÉRDY, 2005; COLWELL, 1997; NEWMAN et al., 2003).

Os antibióticos obtidos por meio do metabolismo microbiano formam o mais importante grupo de produtos naturais. Tais compostos podem ser derivados do metabolismo primário ou metabolismo secundário. Os metabólitos primários (polissacarídeos, proteínas, enzimas, ácidos graxos e ácidos nucleicos) são comuns a todos os sistemas biológicos (BÉRDY, 2005). Os metabólitos secundários possuem baixo peso molecular, apresentam

grande diversidade química, com funções muitas vezes ainda desconhecidas (BÉRDY, 2005; KURYLOWICZ, 1981).

Os micro-organismos podem ativar suas vias biossintéticas, responsivas a produção de compostos bioativos, quando estão submetidos à pressão da seleção. Esses compostos podem ser produzidos em resposta a mudanças nutricionais, infecção e/ou competição.

A descoberta e o estudo dos metabólicos secundários (biomoléculas ativas) possibilitaram a produção de novas drogas com características de alta especificidade, segurança e baixa toxicidade, que podem favorecer no combate de diversas doenças. Dentre todos os micro-organismos reconhecidamente produtores de compostos bioativos, os membros do gênero *Streptomyces* merecem uma posição de destaque.

2.5.2.1 O gênero *Streptomyces*

Micro-organismos pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentam distribuição mundial, com grande importância para a formação de matéria orgânica (CHRISTOVA; SHOLEVA; CHIPEVA, 1995), produção de antibióticos, e antitumorais (WATVE et al., 2001; FIEDLER et al., 2005; OLANO; MENDEZ; SALAS, 2009) de importância biotecnológica. Atualmente, *Streptomyces* compreende o maior número de espécies descritas para um único gênero (aproximadamente 630 espécies - EUZÉBY, 2013) a maioria habitante de solo e de característica saprofítica, podendo também ser encontrados em amostras de água, plantas e em associação com diversos organismos. O gênero *Streptomyces* foi definido por Waksman e Henrici em 1943 para alocar a linhagem tipo da espécie *Actinomyces albus* (Krainsky), primariamente descrito como *Streptothrix alba* (Rossi-Doria) (WAKSMAN; HENRICI, 1943).

Uma característica marcante entre os micro-organismos deste gênero é o alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) em seu DNA genômico. Tais micro-organismos mostram-se metabolicamente versáteis, podendo utilizar diversas fontes de carbono como fonte de energia. Apesar de apresentar um elevado número de micro-organismos, o gênero *Streptomyces* apresenta reduzido número de espécies patogênicas (CHATER, 2006).

Dentre as inúmeras formas de exploração biotecnológicas possíveis aos *Streptomyces*, a produção de compostos bioativos é seguramente a mais estudada. Presentes na agricultura, veterinária e medicina os compostos provenientes do metabolismo secundário de membros do gênero *Streptomyces* representam cerca de 40% do total de antibióticos conhecidos atualmente (BÉRDY, 2005). O emprego de inúmeros destes biocompostos pode

favorecer o controle de patógenos indesejáveis, tornando possível a redução da carga química nociva, aplicada atualmente, pelos métodos convencionais.

2.5.3 Abordagem taxonômica polifásica

O emprego de organismos como controladores de pragas e doenças agrícolas depende diretamente de um estudo taxonômico entre os organismos envolvidos. Muitos foram os programas de controle biológico que não obtiveram êxito por falta de entendimento e correta definição entre o organismo alvo e o organismo aplicado como controlador (PARRA, 2002).

Nas últimas décadas, a taxonomia de micro-organismos apresentou grandes modificações, incorporando tecnologias, novos modelos à identificação e critérios complementares para descrição de novas espécies. A definição atual para espécie procariótica é de um conjunto de linhagens que compartilham alto grau de similaridade em várias características independentes, conhecido como taxonomia filofenética (ROSELLO-MORA; AMANN, 2001). Sendo assim, a taxonomia moderna vale-se de dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos para alocar uma determinada espécie (GOODFELLOW et al., 2007; RONG; HUANG, 2010).

A taxonomia de actinomicetos tem sido elucidada utilizando uma abordagem polifásica, onde diversos métodos são utilizados para um correto posicionamento taxonômico da linhagem em estudo. Algumas dessas metodologias – características fisiológicas, bioquímicas, quimiotaxonômicas, fragmento do gene 16S rRNA com no mínimo 1300 bp – são consideradas clássicas e devem constar na descrição das espécies novas (STACKEBRANDT; FREDERIKSEN; GARRITY, 2002). Entretanto, por se tratar de uma ciência dinâmica, as classificações taxonômicas outrora baseadas em metodologias limitadas como critérios fenotípicos e morfológicos, vêm mudando radicalmente à medida que novas técnicas se tornam disponíveis (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000). Além disso, características específicas podem ser incorporadas como forma de evidenciar o grupo ao qual o isolado pertence. Um exemplo pode ser a determinação da sensibilidade à radiação ionizante de isolados pertencentes ao gênero *Deinococcus*, uma vez que membros desse grupo de actinomicetos são resistentes a altas doses dessa radiação (IM; JUNG; TEN, 2008). Ademais, características fisiológicas, como capacidade de crescimento em temperaturas elevadas, podem ser um indicativo para descrição de novos gêneros (ZUCCHI et al., 2012). Considerados atualmente como fatores determinantes ao agrupamento de espécies, a hibridização (DNA-DNA) e a proporção GC (%mol G+C) fornecem um índice bruto de

similaridade entre os genomas avaliados. Quando a hibridização entre dois micro-organismos é inferior a 70% ou a proporção GC apresenta diferença superior a 5%, tais organismos não devem ser considerados como membros de um mesmo táxon. (MADIGAN et al., 2010).

A definição de espécie, bem como o delineamento de suas habilidades, propriedades metabólicas, potencialidades de aplicação e adversidades são fundamentais aos processos biotecnológicos futuros de emprego de novas linhagens e/ou desenvolvimento de produtos biológicos ao mercado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial bioativo da linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T no controle de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morangos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o complexo quitinolítico e os metabólitos secundários produzidos pela linhagem ASBV-1^T;
- Realizar a elucidação estrutural dos compostos bioativos produzidos pela linhagem ASBV-1^T;
- Determinar o mecanismo de ação responsável pelo controle biológico de *Botrytis cinerea*;
- Melhorar o posicionamento taxonômico da linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ativação das linhagens de trabalho – *Streptomyces* ASBV-1^T e *Botrytis cinerea*

Os micro-organismos empregados nos experimentos foram cedidos pela Coleção de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental – CMAA (Laboratório de Microbiologia Ambiental/Embrapa Meio Ambiente). A linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T (CMAA 894), mantida sob criopreservação (-80°C) em solução de glicerol (20% v/v) foi reativada em meio de cultivo ISP 2 (*International Streptomyces Project* meio 2; SHIRLING; GOTTLIEB, 1966 [ANEXO A]), a 28°C, por 10 dias. O fitopatógeno *Botrytis cinera* (CMAA 1122) mantinha-se preservado em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e foi reativado primeiramente em meio de cultivo Ágar Água – AA (ANEXO A), a 16°C, por 10 dias. Em seguida, realizou-se a repicagem e incubação em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA; BEEVER; BOLLARD, 1970 [ANEXO A]), a 16°C, por 7 dias.

4.2 Potencial quitinolítico “in vitro” da linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T

A produção de quitinase pela linhagem ASBV-1^T foi avaliada inoculando-se 3,0 µL de suspensão celular (1×10^6 u.f.c.) no centro de uma placa de Petri, contendo meio de cultivo Glicose-Extrato de Levedura e Ágar (GYEA; GORDON; MIHM, 1962 [ANEXO A]), suplementado à 1% de quitina coloidal. As placas foram incubadas a 28°C, durante 15 dias, onde foi observado o potencial da linhagem à degradação do polímero. Os demais ensaios enzimáticos foram realizados inoculando-se a suspensão celular da linhagem ASBV-1^T (1×10^6 u.f.c.) em 300 ml de meio de cultivo Glicose-Extrato de Levedura (GYE [ANEXO A]), suplementado à 1% de quitina coloidal e incubado sob agitação constante (180 rpm), a 28°C. Aliquotas de 20,0 ml foram retiradas durante a incubação (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dias), centrifugadas (15.000xg; 10 min; 4°C) e utilizadas como extrato enzimático às demais análises de caracterização enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.2.1 Curva de produção enzimática, influência de pH e temperatura à atividade relativa do complexo quitinolítico

A quantificação relativa da atividade enzimática foi realizada utilizando quitina coloidal marcada *Chitin Remazole Blue* (Sigma) como substrato. O método foi modificado de Pisarzhevskii et al. (1997) em que a atividade da enzima é determinada medindo-se a alteração colorimétrica após a reação enzimática. Cada reação continha 300 µL de quitina coloidal marcada (0,3% p/v), incubados com 300 µL de extrato enzimático e 300 µL de solução tampão. A reação foi interrompida com 200 µL de HCl 6N e centrifugada (15.000xg;

3 min; 4°C). Os grupos redutores formados durante a reação de hidrólise da quitina foram quantificados por leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601 PC) no comprimento de onda (λ) igual a 550 nanômetros (nm). Para cada amostra foram realizadas 3 leituras.

4.2.2 Influência de sais inorgânicos à atividade relativa do complexo quitinolítico

As mesmas condições descritas no item 4.2.1 foram utilizadas nesta análise. Entretanto, acrescentou-se na solução tampão os sais inorgânicos (CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, NiSO₄, ZnSO₄) para uma concentração final de 1.0 mM, 2.0 mM e 5.0 mM. As leituras foram realizadas nos intervalos de incubação (0, 1, 2 e 4 horas) e a variação no valor da absorbância foi utilizada para quantificar a atividade enzimática. O controle negativo foi realizado com amostra inoculada e incubada sob as mesmas condições, sem a adição de sais na solução tampão.

4.2.3 Potencial bioativo do complexo quitinolítico produzido pela linhagem ASBV-1^T, frente a germinação conidial de *Botrytis cinerea*

O filtrado da cultura de ASBV-1^T, foi particionado por meio do *Kit Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filters for Protein Purification and Concentration* (Merck-Millipore), conforme descrições do fabricante. Foram utilizadas membranas seletoras às frações de tamanho ≥ 100 kDa, ≥ 50 kDa, ≥ 30 kDa e < 30 kDa. O extrato enzimático foi filtrado sequencialmente (100 kDa para 30 kDa) e as frações retidas foram armazenadas a -20°C. O ensaio bioativo foi realizado em meio BDA contendo 1×10^8 conídios.ml⁻¹ do fitopatógeno, acrescidos em meio de cultivo fundente (~ 45°C). Após solidificação do meio, papéis de filtro esterilizados (0,5 mm de diâmetro) foram colocados sobre o meio e utilizados como suporte à inoculação de 10 μ L do filtrado particionado. As placas foram incubadas por 10 dias, a 15°C. O potencial bioativo foi verificado por meio da formação de halo de inibição à germinação conidial.

4.3 Potencial bioativo “in vitro” da linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T, contra o crescimento de *Botrytis cinerea*

A linhagem ASBV-1^T foi estriada, em meio de cultivo BDA e incubada por 96 horas, a 28 °C. Em seguida, um plug (0,5 X 0,5 cm de diâmetro), retirado de placas de cultivo puro de *B. cinerea*, foi inoculado a 3 cm da borda da placa contendo a linhagem ASBV-1^T. As placas foram incubadas a 16°C e avaliadas visualmente após o crescimento micelial.

4.3.1 Produção e extração de metabólitos secundários

A linhagem ASBV-1^T (1×10^6 u.f.c.) foi inoculada em 10 L de caldo Batata Dextrose – BD (ANEXO A) e incubada sob agitação constante (180 rpm), a 28°C, por 10 dias. Os metabólitos secundários foram extraídos segundo Canova et al. (2010), a partir do filtrado da cultura (pH 3,0), utilizando acetato de etila como solvente extrator. O conteúdo foi reduzido em rota evaporador (R-250/B490, Buchi/Schweiz), 90 rpm, a 45°C. O extrato bruto (~320 mg) foi empregado nos ensaios de bioatividade e caracterização química, descritos posteriormente.

4.3.1.1 Atividade dos biocompostos “in vitro” e “in vivo”

Às avaliações “in vitro”, uma suspensão conidial de *B. cinerea* (1×10^8 conídios.ml⁻¹) foi inoculada em 10 ml de caldo BD, contendo extrato bruto da linhagem ASBV-1^T (0.1, 0.5 e 1.0 mg.ml⁻¹). O controle positivo foi realizado a partir da inoculação da suspensão conidial em caldo BD, contendo fungicida comercial Cercobin 500 SC (0.1, 1.0 e 5.0 mg.ml⁻¹). O controle negativo foi realizado a partir da inoculação da suspensão conidial em caldo BD. Todas as amostras foram incubadas sob agitação constante (180 rpm), a 16°C. Alíquotas de 100 µL foram retiradas de cada tratamento, nos intervalos (4, 8, 12, 16 horas) de incubação. O percentual de germinação foi determinado, a partir da observação do desenvolvimento do tubo germinativo, por microscopia ótica (aumento de 400x). Apenas os conídios apresentando tubos germinativos “verdadeiros” (o dobro do tamanho do conídio) foram considerados como germinação positiva. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística e avaliação de concentração de dose letal (LC₅₀), utilizando como suporte os softwares ASSISTAT versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002), e SAS, respectivamente.

As avaliações “in vivo” foram realizadas em condições de armazenamento (15°C), utilizando morangos comerciais frescos (cv. Oso Grande). Os pseudofrutos foram submetidos a prévia desinfestação superficial (ZUCCHI et al., 2008). O extrato bruto foi solubilizado em Dimetilsulfoxido (DMSO). Os tratamentos consistiram na imersão dos pseudofrutos em suspensão celular de ASBV-1^T (1×10^6 células.ml⁻¹) ou extrato bruto de ASBV-1^T (0.01, 0.1 e 1.0 mg.ml⁻¹), seguido da aspersão de suspensão conidial (1×10^8 conídios.ml⁻¹) de *B. cinerea*. Os tratamentos controles foram realizados mediante i) avaliação de pseudofrutos sem procedimento de desinfestação superficial; ii) eficiência do procedimento de desinfestação; iii) colonização do patógeno em pseudofrutos desinfestados; iv) efeito do solvente DMSO à

germinação conidial; v) efeitos da linhagem ASBV-1^T sob os pseudofrutos. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando 6 pseudofrutos para cada tratamento.

4.3.1.2 Caracterização química dos compostos bioativos presentes no extrato bruto de *Streptomyces* ASBV-1^T

As análises cromatográficas semipreparativas (HPLC/UV) foram conduzidas segundo Crevelin et al., (2013), por meio de coluna C₁₈ Shim-pack Shimadzu (250 x 4,6 mm, 5 µm). Os parâmetros de eluição seguiram: 30 minutos de gradiente 20-100% metanol/água, 10 minutos de 100% metanol, em fluxo contínuo de 0.8 ml.minuto⁻¹. O monitoramento dos compostos foi realizado nos λ 270 e 340 nm. Posteriormente, o extrato bruto foi fracionado em modo preparativo (HPLC/UV), por meio de coluna C₁₈ Shim-pack Shimadzu (250 x 20 mm, 5µm), em fluxo contínuo de 14.0 ml.minuto⁻¹, seguindo os mesmos parâmetros de eluição descritos anteriormente. O perfil químico das frações obtidas foi analisado por meio de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), em placas de alumínio pré-fabricadas (Merck), contendo como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄. A fase móvel foi composta por mistura de hexano/acetato de etila (2:8; v/v). As frações que apresentaram perfil químico semelhante foram agrupadas. Em seguida, o potencial bioativo das frações foi avaliado por meio de ensaio “in vitro” contra *B. cinerea*. As frações (10 µL) foram suportadas separadamente, por discos de papel de filtro esterilizados, em meio de cultivo BDA, contendo esporos do fitopatógeno (1x10⁸ conídios.ml⁻¹). A suspensão de esporos foi acrescida ao meio de cultivo fundente, para distribuição homogênea (BDA ~45°C). O controle negativo foi realizado por meio de discos de papel contendo 10 µL de metanol 100%. As placas foram incubadas a 15°C, o potencial bioativo foi aferido por meio da formação de halo sob a germinação conidial.

O extrato bruto e as demais frações bioativas foram analisados através de seus íons precursores (UPLC/MS), em equipamento ACQUITY UPLC H-Class Xevo[®] TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, USA), com uma fonte de ionização Z-spray, modo *Full Scan*. A análise inicial do extrato bruto, consistiu na injeção de 3 µL de amostra em coluna C₁₈ ACQUITY-BETH (2.1 x 50 mm; 1.7 µm), fase móvel A composta por H₂O + 10 mM de acetato de amônio e fase móvel B de metanol. O parâmetro de eluição aplicado consistiu em 5 minutos de gradiente 75-97% metanol, seguido de 5 minutos em 97% metanol, em fluxo contínuo de 0.3 ml.minuto⁻¹. As análises foram realizadas em modo positivo e negativo, voltagem do capilar 3.2 kV, voltagem do cone 40 V, temperatura da fonte 150°C e temperatura de dessolvatação do gás N₂ 300°C (faixas de massa entre *m/z* 250-1200). As

frações bioativas foram analisadas, em modo *Full Scan*, via inserção direta (ID/MS). As análises decorreram nas condições: voltagem da fonte ESI 4.0 kV, voltagem do capilar cone 47.96 V, fluxo de gás 0.09 Lpm e temperatura do gás cone 270°C (faixa de massa entre m/z 500-1500). O espectro de massa resultante da fragmentação dos íons alvo (MS/MS) foi obtido por meio de indução da dissociação ativada por colisão (*CAD*), utilizando gás Ar como fonte de energia. A energia de colisão aplicada variou de 10-50 eV.

4.3.1.3 Compostos bioativos – Curva de produção, influência de sais inorgânicos e geração de biomassa

A linhagem ASBV-1^T (1×10^6 u.f.c.) foi crescida em 50 ml de caldo BD, sob agitação constante (180 rpm), a 28°C, por 20 dias. A cinética de produção dos compostos de interesse foi avaliada por meio de alíquotas de 1 ml retiradas nos intervalos 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 e 20 dias de cultivo. Os metabólitos foram extraídos e analisados por UPLC/MS, conforme descrições anteriores. A produção relativa foi avaliada por meio da relação entre a intensidade da área dos sinais. Os resultados permitiram correlacionar o tempo de incubação com a produção dos compostos bioativos. Posteriormente, um segundo experimento foi realizado, avaliando a influência da adição de sais inorgânicos sob a produção de biomassa da linhagem ASBV-1^T, bem como a produção dos compostos de interesse. Para isso, o caldo BD foi suplementado com CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄ ou ZnSO₄, nas concentrações 1.0 mM, 2.0 mM e 5.0 mM, sob as mesmas condições de incubação, durante 5 dias. A produção dos biocompostos foi determinada pela análise do extrato em UPLC/MS, conforme descrições em 4.3.1.2. Ao final do experimento, a cultura foi centrifugada (7000 rpm; 20 minutos), realizou-se o descarte do sobrenadante e o conteúdo celular foi liofilizado para obtenção do peso seco das amostras sob a influência dos sais. O controle negativo foi realizado inoculando a linhagem ASBV-1^T (1×10^6 u.f.c.) em caldo BD, sem adição de sal. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.4 Taxonomia polifásica da linhagem ASBV-1^T

4.4.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA

A posição filogenética da linhagem ASBV-1^T foi determinada pela análise do gene 16S rRNA. O DNA genômico foi extraído da biomassa crescida em caldo Glicose Extrato de Levedura – GYE, durante 10 dias a 28°C. A amplificação do gene 16S rRNA foi efetuada em reação PCR segundo procedimento descrito por Kim et al. (2012). O amplicon resultante foi sequenciado e alinhado manualmente contra as sequências correspondentes de espécies tipo do gênero *Streptomyces*, obtidas no banco de dados EzTaxon (CHUN et al., 2007), aplicando-

se o software MEGA5 (TAMURA et al., 2011). As árvores filogenéticas foram inferidas utilizando os algoritmos evolutivos de máxima-verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981), máxima-parsimônia (FITCH, 1971) e “neighbour-joining” (SAITOU; NEI, 1987) desenhadas nos programas MEGA5 (TAMURA et al., 2011) e PHYML (GUINDON; GASCUEL, 2003). O modelo de Jukes e Cantor (1969) foi utilizado para gerar a matriz de distância para o algoritmo de “neighbour-joining”. As topologias das árvores resultantes foram avaliadas por análise de pseudo-replicação (“bootstrap”; FELSENSTEIN, 1985) do método de “neighbour-joining” baseada em 1000 replicações utilizando o programa MEGA5. *Streptomyces albus* subs. *albus* (AJ6216022) e *Streptacidiphilus albus* (AF074415) foram utilizadas como grupo externo.

4.4.2 Hibridização

Os valores de reassociação DNA-DNA (ΔT_m) entre a linhagem ASBV-1^T e as espécies filogeneticamente mais próximas foram determinados utilizando técnica fluorimétrica (GONZALES; SAIZ-JIMENEZ, 2005). A temperatura ótima de renaturação (T_{or}) foi determinada a partir de $T_{or} = 0.51(\%GC) + 47$. A temperatura de *melting* (T_m), onde 50% das fitas duplas iniciais de DNA tornam-se fitas simples em decorrência da desnaturação térmica, foi calculada entre as combinações genômicas dos micro-organismos: ASBV-1^T/ASBV-1^T, ASBV-1^T/*Streptomyces albolongus* (NRRL B-3604^T), ASBV-1^T/*S. celluloflavus* (NRRL – 2493^T) e ASBV-1^T/*S. cavourensis subsp. cavourensis* (NBRC 13026^T), obtendo-se a variável de hibridização (ΔT_m). Os ensaios foram realizados em triplicatas e duas repetições.

4.4.3 Quimiotaxonomia

O perfil quimiotaxonômico apresentado pela linhagem ASBV-1^T, foi comparado com os perfis determinados aos micro-organismos do gênero *Streptomyces*. Procedimentos padrões foram aplicados para determinação dos isômeros do ácido diaminopimérico (A2pm; STANECK; ROBERTS, 1974), tipo de ácido murâmico (UCHIDA et al., 1999), predominância de menaquinona (MINNIKIN et al., 1984). Os ácidos graxos do isolado e das demais linhagens tipo *S. albolongus*, *S. cavourensis subsp. cavourensis* e *S. celluloflavus* foram metilados e analisados por cromatografia gasosa (Hawlett Packard 6890), utilizando o sistema padrão *Sherlock Microbial Identification* (MIDI), analisados pela plataforma ACTINO versão 5.0 (SASSER, 1990). A composição genômica (%MolG+C) foi determinada

através de ensaios em triplicata e duas repetições, conforme descrição de Gonzales e Saiz-Jimenez (2005).

4.4.4 Características culturais, morfológicas, fenotípicas e bioquímicas

As linhagens foram crescidas em meio de cultivo padrão *International Streptomyces Project* – [ISP 1-7 (ANEXO A)] para análise comparativa de suas características culturais. As placas foram mantidas a 28 °C e avaliadas após 10 dias de incubação. A observação por microscopia eletrônica de varredura – MEV, foi realizada no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em equipamento *Field Emission Scanning Electron Microscope* (LEO 982 Zeiss Leica), segundo as descrições de O'Donnell et al. (1993), e deu-se a partir do crescimento da linhagem ASBV-1^T em meio de cultivo BDA por 20 dias, a 28°C. As linhagens foram avaliadas com relação à capacidade de: i) crescimento nas faixas de pH 4,0-10,0 [Tampão fosfato (ANEXO A)] e salinidade (NaCl 1-7% p/v) em meio de cultivo Glicose Extrato de Levedura Ágar – GYEA; ii) resistência a antibióticos – ácido nalidíxico (10 µg/mL), canamicina (10 µg/mL), novobiocina (10 µg/mL), penicilina (20 µg/mL), rifampicina (10 µg/mL) e estreptomicina (16 µg/mL); iii) crescimento em diferentes fontes de carbono – adonitol (1,0%), L(+) arabinose (1,0%), D(+) celubiose (1,0%), dextrina (1,0%), meso-erythritol (1,0%), D(+) frutose (1,0%), D(+) galactose (1,0%), glicerol (1,0%), glicogênio (1,0%), meso-inusitol (1,0%), α-lactose (1,0%), maltose (1,0%), D(+) manitol (1,0%), D(+) manose (1,0%), sorbitol (1,0%) e D(+) xylose (1,0%) em *International Streptomyces Project-9* (ANEXO A); e iv) degradar diferentes compostos carbônicos – caseína (0,5%), celulose (1,0%), guanina (0,4%), hipoxantina (0,4%), pectina (0,4%), L-tirosina (0,4%), xantina (0,4%), xilano (0,4%), amido (0,1%), tributyrin (1,0%), ácido oxálico (0,2%), L(+) ácido lático (0,2%) ácido úrico (0,5%) e ácido málico (0,2%) em meio GYEA, gelatina (0,4%) em meio de Gordon (GORDON et al., 1974; ANEXO A) e tween 20, 40, 60 e 80 (1,0%) em meio Sierra (SIERRA, 1957; ANEXO A). As placas foram inoculadas com 3,0 µL de suspensão celular (1x10⁶ u.f.c), incubadas a 28 °C por até 21 dias.

5 RESULTADOS

5.1 Potencial quitinolítico da linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T

A linhagem ASBV-1^T mostrou-se como uma potencial produtora de quitinase, por meio da formação de um halo de 2 cm ao redor da colônia. A degradação do substrato incorporado pode ser evidenciada a partir do 10º dia de incubação, através de coloração da cultura em solução de iodo.

5.2 Curva de produção enzimática, influência de pH e temperatura à atividade relativa do complexo quitinolítico

Os ensaios enzimáticos realizados a partir do filtrado da cultura de ASBV-1^T, demonstraram que a linhagem apresentou seu ponto máximo de expressão, com relação à produção de enzimas quitinolíticas nas condições avaliadas, entre o quinto e sétimo dia de cultivo, Figura 1A. A temperatura ótima à atividade do complexo enzimático é 30°C, conforme Figura 1B, apresentando maior eficiência à degradação de quitina, em meio alcalino, nos intervalos de pH 8.6 e pH 10.0, Figura 1C.

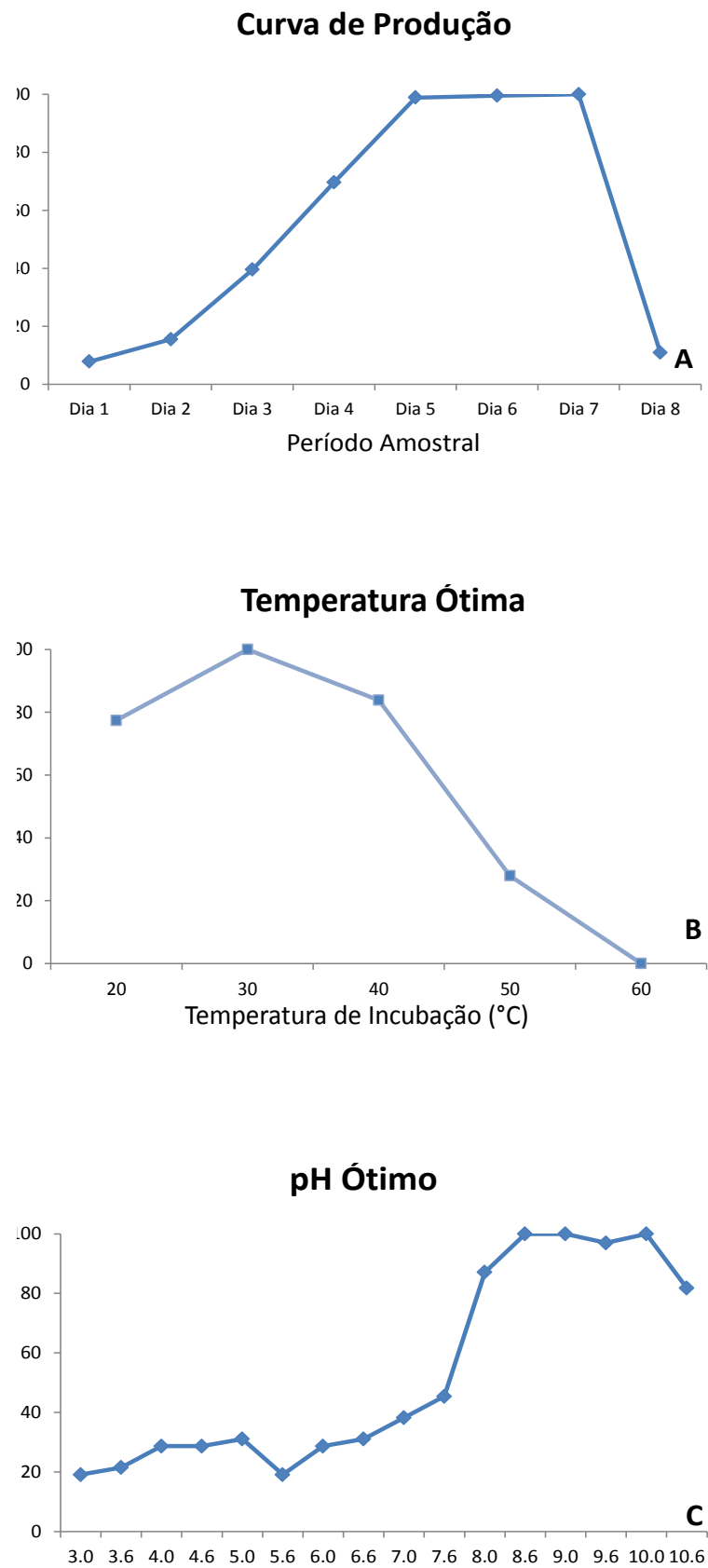


Figura 1 – Ensaio enzimático realizado a partir do filtrado da cultura ASBV-1^T; A) Curva de produção enzimática; B) Temperatura ótima; C) pH ótimo

5.2.1 Influência da adição de sais inorgânicos sob o complexo quitinolítico produzido pela linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T

A adição de sais inorgânicos pode atuar de forma positiva, negativa ou neutra à atividade enzimática quitinolítica. O complexo enzimático metabolizado pela linhagem ASBV-1^T apresentou correlação positiva, sob a degradação do substrato disponibilizado, na presença de: CuSO₄, MgSO₄ e NiSO₄. Houve um aumento da atividade relativa equivalente a 10,1% (CuSO₄ – 1.0 mM), 13,5% (MgSO₄ – 2.0 mM) e 18,0% (NiSO₄ – 5.0 mM). A adição de FeSO₄ e ZnSO₄, nas condições e concentrações aplicadas, não resultou pronunciadamente a atividade enzimática. Nota-se que a adição de MnSO₄ apresentou correlação negativa à atuação enzimática, reduzindo significativamente a degradação do substrato, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Influência de sais inorgânicos à atividade relativa do complexo enzimático quitinolítico produzido pela linhagem ASBV-1^T

Concentrações	Sais inorgânicos					
	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄	MnSO ₄	NiSO ₄	ZnSO ₄
1 mM	110,1	92,2	100	54,3	95,3	93
2 mM	108,1	100	113,5	82	112,6	104,5
5 mM	102,7	84,7	107,2	46,8	118	90,1

* Controle relativo = 100

5.2.2 Potencial bioativo do complexo quitinolítico produzido pela linhagem ASBV-1^T, frente a germinação conidial de *Botrytis cinerea*

O potencial bioativo “in vitro” das frações (≥ 100 kDa, ≥ 50 kDa, ≥ 30 kDa e < 30 kDa), obtidas por meio do particionamento do filtrado da cultura de ASBV-1^T, foi determinado a partir do 5º dia de incubação, através da formação de halo de inibição pela fração correspondente às proteínas de tamanho equivalente ou superior a 100 kDa, Figura 2.

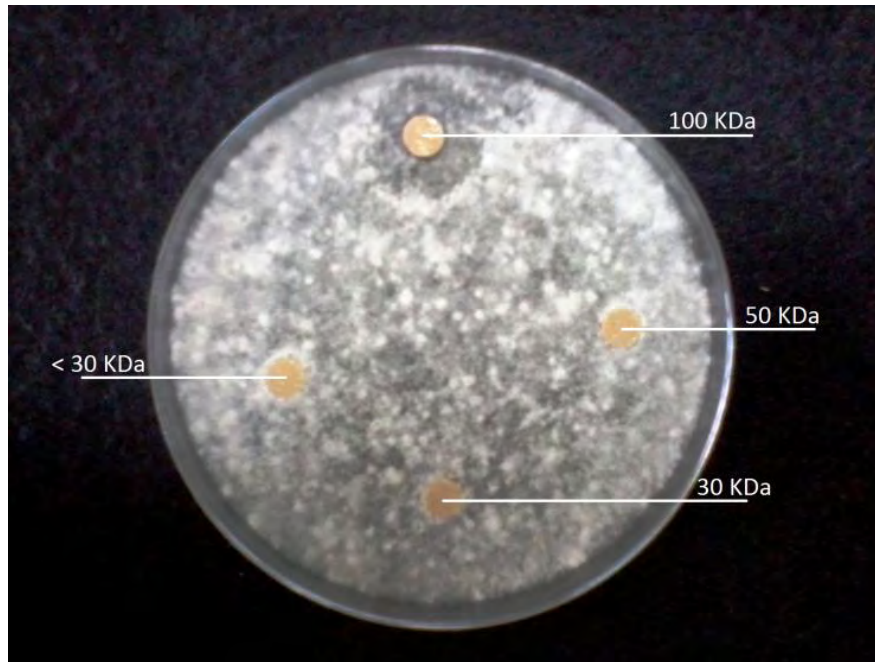


Figura 2 – Avaliação do potencial bioativo “in vitro”, das frações derivadas do particionamento do filtrado da cultura ASBV-1^T, à germinação conidial de *B. cinerea* em meio de cultivo BDA

5.3 Potencial bioativo “in vitro” da linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T, contra o crescimento de *Botrytis cinerea*

A linhagem ASBV-1^T demonstrou-se eficiente à inibição do crescimento “in vitro” do fitopatógeno *B. cinerea*. O teste de antagonismo resultou em uma zona de inibição de aproximadamente 2.5 cm. A aplicação dos metabólitos secundários (1.0 mg/ml⁻¹), resultantes da extração do filtrado da cultura ASBV-1^T (teste de antibiose), também mostrou-se eficiente à inibição, apesar de apresentar uma zona de inibição menor do que a evidenciada anteriormente, conforme Figura 3A e B.

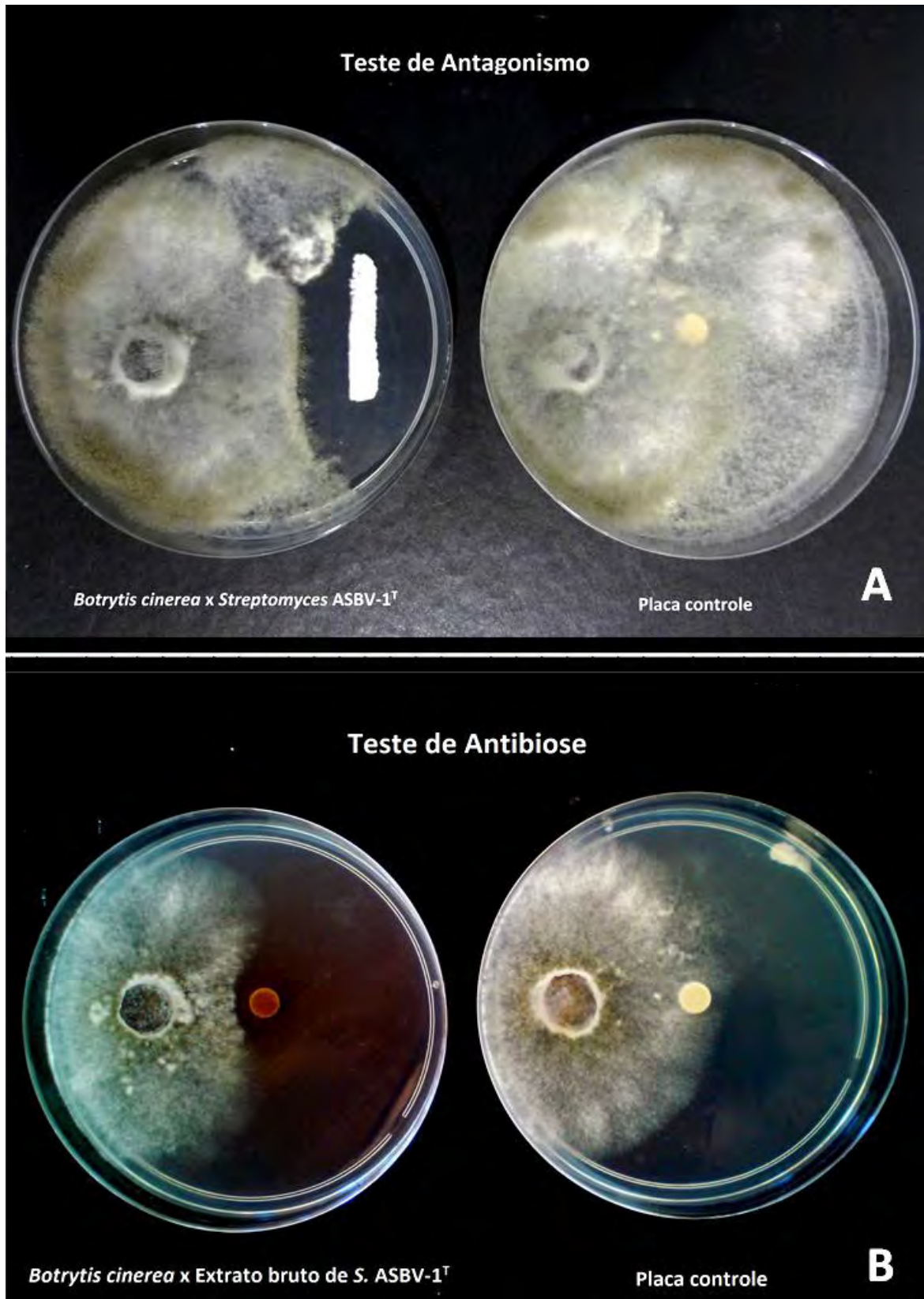


Figura 3 – Potencial bioativo “in vitro” da linhagem ASBV-1^T, ao crescimento de *B. cinerea*. A) Ensaio de antagonismo; B) Ensaio de antibiose (Extrato bruto 1.0 mg.ml⁻¹)

5.3.1 Atividade dos biocompostos “in vitro” e “in vivo”

A ação do extrato bruto metabolizado pela linhagem ASBV-1^T, sob a germinação conidial de *B. cinerea* “in vitro” foi equivalente a ação exercida pelo antifúngico comercial Cercobin 500 SC, aplicado como controle positivo de inibição. Pode-se observar a diferenciação de ambos os tratamentos em relação ao controle de germinação ao longo das 16 horas de avaliação. Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram o percentual de germinação conidial e a análise estatística comparativa entre os tratamentos, por meio de Tukey ($p < 0.05$). Apesar de não haver diferenciação significativa, entre a ação bioativa do antifúngico comercial e do extrato bruto, a análise de dose letal (LC₅₀) demonstrou que o Cercobin 500 SC, exerce sua capacidade de controle em concentrações menores do que as exigidas pelo extrato bruto, sendo: 0.123 mg.ml⁻¹ e 0.262 mg.ml⁻¹, respectivamente.

Tabela 2 – Germinação conidial de *Botrytis cinerea* (CCMA 1122) em caldo BD, suplementado por extrato bruto de ASBV-1^T e Cercobin 500 SC

Tempo (h)	Cercobin 500 (mg.ml ⁻¹)			Extrato bruto (mg.ml ⁻¹)			Controle
	0.1	1.0	5.0	0.1	0.5	1.0	
4	2.0 b	1.0 b	1.7 b	1.0 b	1.0 b	0.3 b	6.7 a
8	19.0 ab	10.7 bc	8.0 bc	11.0 bc	8.3 bc	1.7 c	25.7 a
12	38.3 b	18.3 cd	21.7 cd	26.0 bc	21.7 cd	8.3 d	62.0 a
16	38.3 bc	20.7 d	20.0 d	50.3 b	26.3 cd	22.0 cd	73.3 a

Nota: As letras iguais entre os tratamentos significam a não diferenciação estatística, por análise de Tukey ($p < 0.05$)

O ensaio “in vivo”, em condições de armazenamento, demonstrou a alta incidência do fitopatógeno *B. cinerea* em morangos comerciais, juntamente com a eficiência do procedimento de desinfestação aplicado (Figura 4 A e B, respectivamente). A virulência do inóculo de *B. cinera* (CCMA 1122) aplicado no ensaio, o efeito da linhagem ASBV-1^T aos pseudofrutos e a não influência do solvente DMSO à germinação inóculo, pode ser observada na Figura 4 C–E. A suspensão celular da linhagem ASBV-1^T não foi eficiente no controle da infestação do patógeno, porém os tratamentos contendo o extrato bruto (1.0 e 0.1 mg.ml⁻¹) apresentaram grande redução à média de pseudofrutos infestados, Figura 4 F–H (Tukey; $p < 0.05$), respectivamente. O tratamento contendo o extrato bruto na concentração 0.01 mg.ml⁻¹ não foi eficaz no controle da infestação de *B. cinerea*, apresentando similaridade com os índices do tratamento de controle de infestação do inóculo (Figura 4 I).



Figura 4 – Ensaio “in vivo” realizado em pseudofrutos de morangueiro em condições de armazenamento. Dia zero (início do experimento); Dia 5 (final do experimento) e Análise estatística dos resultados

Legenda – A) pseudofruto sem desinfestação (*in natura*); B) controle da desinfestação; C) controle da virulência do patógeno; D) efeito da linhagem ASBV-1^T aos pseudofrutos; E) efeito do solvente DMSO sob a germinação conidial; F) interação entre a linhagem ASBV-1^T e *B. cinerea*; G–I) efeito do extrato bruto 1.0, 0.1 e 0.01 mg.ml⁻¹, respectivamente) no controle do patógeno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0.05$)

5.3.2 Caracterização química dos compostos bioativos presentes no extrato bruto de *Streptomyces* ASBV-1^T

As condições cromatográficas aplicadas demonstraram-se eficientes à separação dos constituintes químicos do extrato bruto metabolizado pela linhagem ASBV-1^T (Figura 5). O λ de 270 nm possibilitou uma maior resolução e conseqüentemente apresentou uma maior diversidade de compostos. Os compostos majoritários, evidenciados nos tempos de retenção (T_R) entre 7-15 minutos apresentaram perfil químico de caráter mais polar.



Figura 5 – Perfil químico do extrato bruto da linhagem ASBV-1^T – HPLC/UV modo analítico

As condições cromatográficas aplicadas ao fracionamento por HPLC/UV preparativo possibilitaram a obtenção de 53 frações com aproximadamente 10 mL cada. A avaliação “in vitro” demonstrou que as frações 42 e 43 (F_R 42 e F_R 43) apresentam bioatividade pronunciada contra *B. cinerea* (Figura 6). Essas frações foram selecionadas e submetidas a análises subseqüentes para a elucidação estrutural.

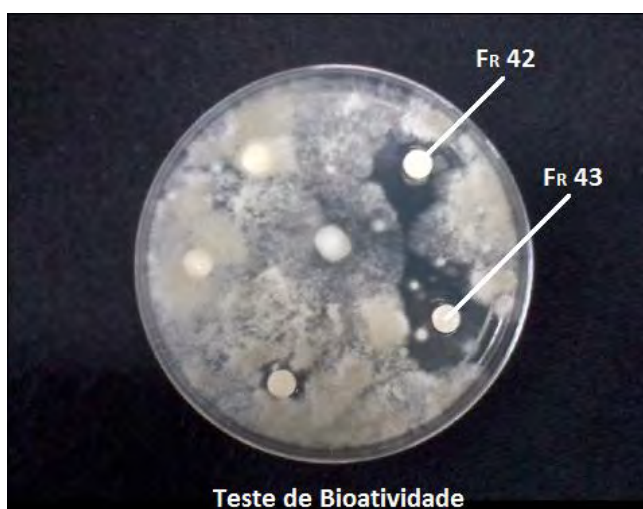


Figura 6 – Halo de inibição à germinação conidial de *B. cinerea* “in vitro”. FR 42 e FR 43, frações obtidas pelo fracionamento do extrato bruto da linhagem ASBV-1^T em HPLC/UV preparativo

Análises por cromatografia de camada delgada comparativa – CCDC demonstraram que as F_R 42 e F_R 43 apresentam grande similaridade em relação ao perfil químico. Com isso, as mesmas foram agrupadas e denominadas como fração reunida – F_R ASBV-1. Logo, essas frações foram submetidas à análise de Ionização por Electrospray – ESI/MS em modo *Full Scan* via Inserção Direta – DI/MS. A Figura 7 demonstra o espectro de massas obtido.

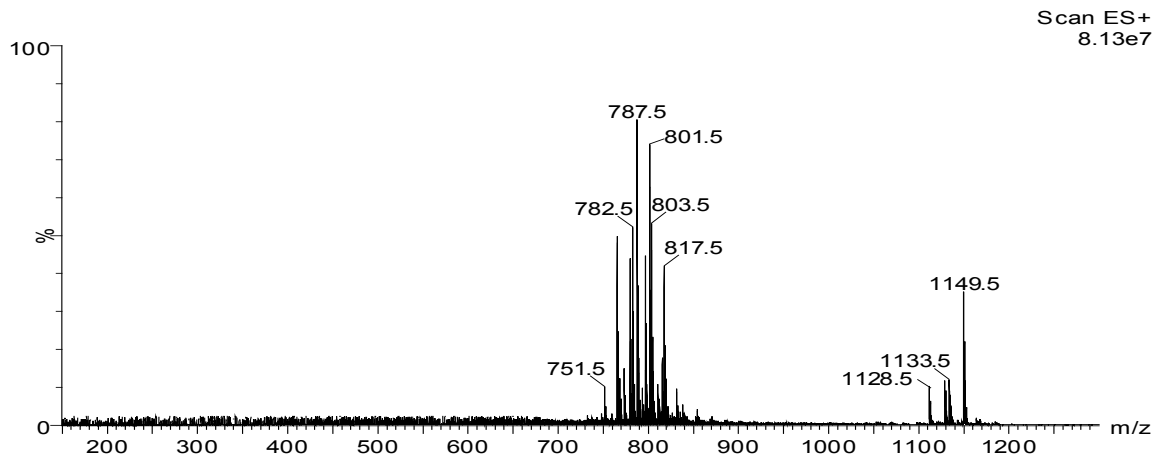


Figura 7 – Espectro de massas obtido pela Ionização por Electrospray por Inserção Direta da fração reunida F_R ASBV-1

A análise do espectro de massas, apresentado na Figura 7, revelou um conjunto de picos majoritários na faixa de m/z 750 e 850, além de um pico relativamente considerável entre a faixa de m/z 1100 e 1300. Os picos majoritários apresentaram, entre eles, uma diferença regular equivalente a 14 unidades de massa ($-CH_2-$), evidenciando que tais compostos pertencem à mesma classe química de uma série homóloga.

Os espectros de UPLC/MS da F_R ASBV-1 (Figura 8) demonstraram que a metodologia aplicada correspondeu de forma eficiente à separação dos compostos de interesse, de modo que os íons de m/z 768, m/z , 782, m/z 796 e m/z 810 apresentaram perfis químicos semelhantes com pequenas diferenças em seus tempos de retenção. Por outro lado, o íon de m/z 1128 apresentou um perfil químico diferente, com característica de um composto mais apolar. Com as informações obtidas foi possível constatar que os compostos na faixa de m/z 750-850 apresentaram-se como adutos de H^+ (m/z 751, m/z 765, m/z 779 e m/z 793), NH_4^+ (m/z 768, m/z 782, m/z 796, m/z 810), Na^+ (m/z 773, m/z 787, m/z 801, m/z 815) e K^+ (m/z 789, m/z 803, m/z 817, m/z 831), uma vez que a diferença de massa entre os picos foram de 5, 16 e 22 unidades de massa (u).

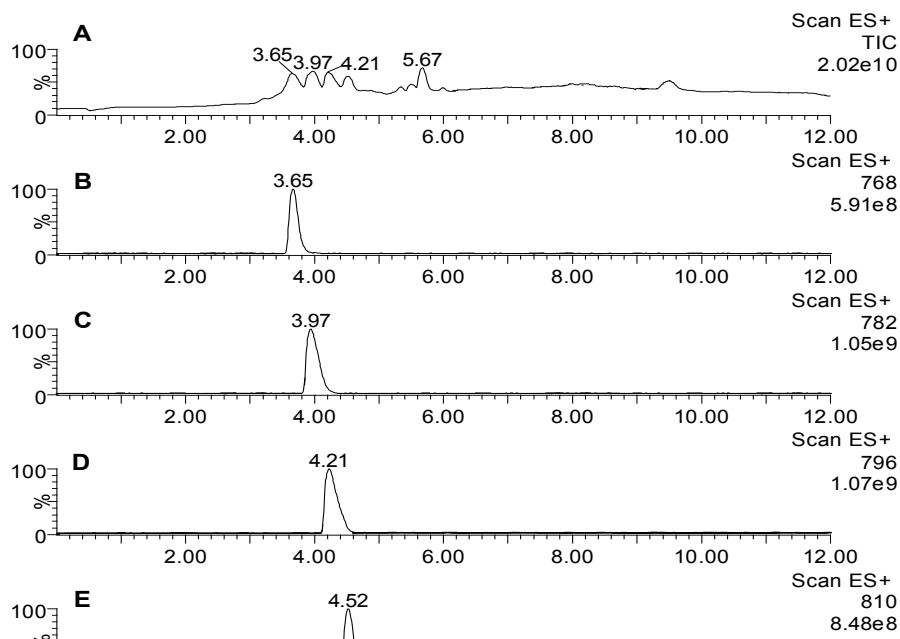


Figura 8 – Espectros de UPLC/MS da fração reunida (FR ASBV-1)

Legenda – A) Cromatograma de Corrente Iônica Total – TIC da fração reunida FR ASBV-1; B-F) Cromatograma de Íons Extraídos – EIC dos íons de m/z 768, 782, 796, 810 e 1128, respectivamente

Assim, com intuito de caracterizar os compostos de interesse, os íons adutos de sódio de m/z 787 [$M + Na^+$] e m/z 815 [$M + Na^+$] foram selecionados e submetidos aos experimentos de fragmentação por dissociação ativada por colisão – CAD. Os espectros obtidos por meio do monitoramento dos íons produtos estão apresentados na Figura 9.

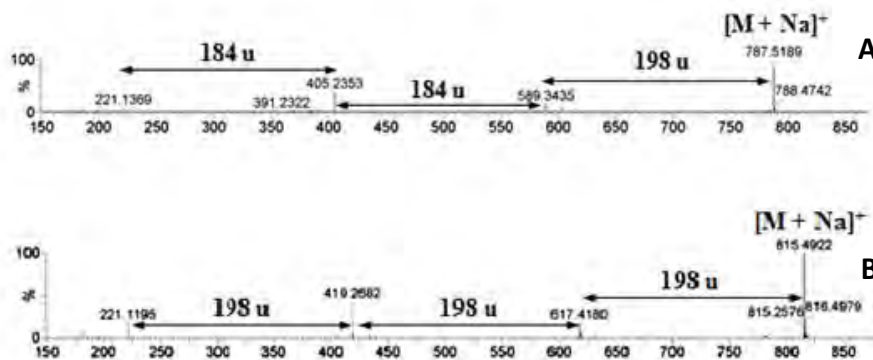


Figura 9 – Espectro de Íons Produto – CAD. Íons adutos de sódio A) m/z 787 e B) m/z 815

O padrão de fragmentação, apresentado no espectro de íons produtos, demonstrou sucessivas perdas neutras referentes a 184 e 198 u. Tais perdas correspondem aos fragmentos

de Ácido-2-(5-aliltetrahidofurano-2-il)-propanóico ($C_{10}H_{16}O_3$) e Ácido-2-[(5-(but-2-en-1-il)tetrahidofurano-2-il)]-propanóico ($C_{11}H_{18}O_3$), respectivamente. Confrontando os dados obtidos, frente a informações disponíveis em literatura (VINCENTIN et al., 1990), foi possível identificar o primeiro grupo de compostos bioativos selecionado (m/z 768, m/z 782, m/z 796 e m/z 810), presente no extrato bruto da linhagem ASBV-1^T como pertencente a classe dos macrotetralídeos, sendo eles: monactina, dinactina, trinactina e tetranactina, respectivamente (Figura 10).

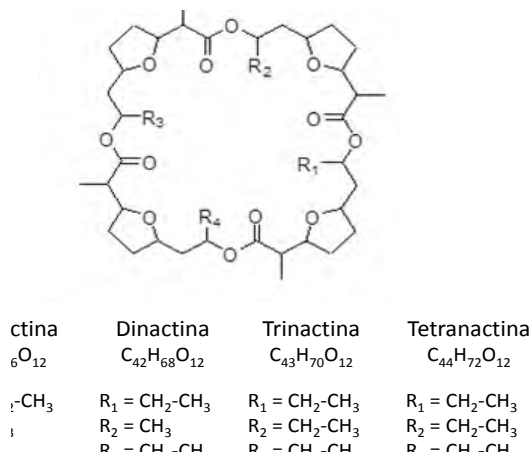


Figura 10 - Estrutura química dos macrotetralídeos produzidos pela linhagem ASBV-1^T

O metabólito presente na faixa de m/z 1100-1200 da F_R ASBV-1 (Figura 7) também foi identificado pela metodologia descrita anteriormente. A avaliação realizada demonstrou que os demais picos presentes nessa mesma faixa de massa, referem-se aos íons adutos de H⁺ (m/z 1111), Na⁺ (m/z 1133), NH₄⁺ (m/z 1128) e K⁺ (m/z 1149). Neste sentido, o íon aduto de amônio, apresentando m/z 1128 [M + NH₄⁺] foi submetido ao experimento de CAD (Figura 11) na tentativa de identificação estrutural deste composto.

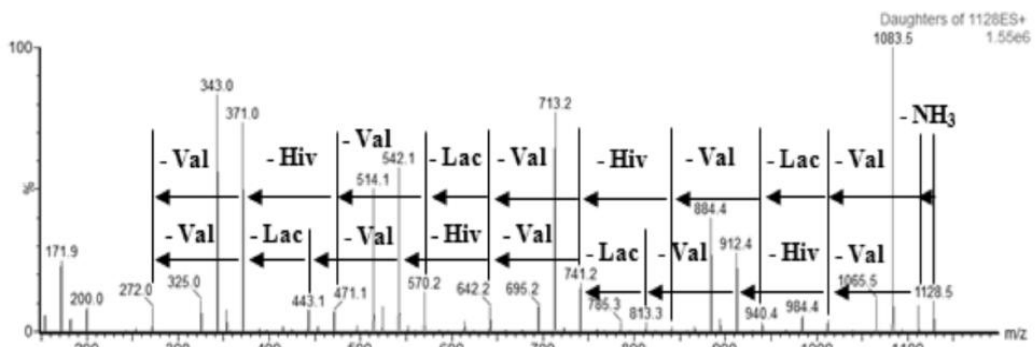


Figura 11 – Espectro de íons produtos do íon precursor de m/z 1128. Hiv = ácido 2-hidróxi-isovalérico; Lac = ácido láctico e Val = valina

Com relação ao íon de m/z 1128, os experimentos de CAD (Figura 11) indicaram sucessivas perdas neutras, equivalentes a 99, 72 e 100 u, como também perdas alternadas

destas mesmas unidades de massa. Tais perdas são referentes aos resíduos peptídicos de valina (Val-H₂O; 99 u), ácido láctico (Lac-H₂O; 72 u) e ácido 2 Hidroxi-isovalérico (Hiv-H₂O; 100 u), pertencentes ao composto dodecadepsipeptídeo, conhecido comercialmente como valinomicina (GRESE; CERNY; GROSS, 1989; NGOKA; GROSS, 2000). A estrutura química é ciclo $[-(D\text{-Val-L-Lac-L-Val-D-Hiv})\text{-}]_3$, sendo composta de massa exata equivalente a 1110, conforme Figura 12.

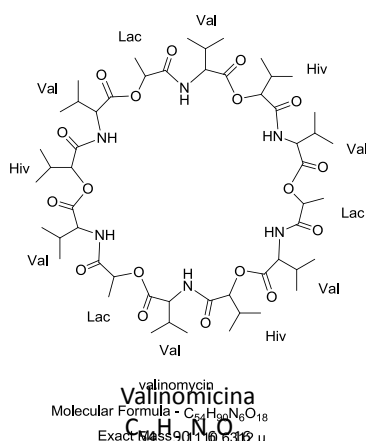


Figura 12 – Estrutura química da valinomicina

5.3.3 Compostos bioativos – Curva de produção, influência de sais inorgânicos e geração de biomassa

A avaliação sob a cinética de produção dos compostos bioativos: monactina, dinactina, trinactina e tetranactina metabolizados pela linhagem ASBV-1^T (Figura 13) demonstrou que a produção máxima de monactina ocorreu após 7 dias de incubação; enquanto que 10 dias foram necessários para a produção máxima de dinactina e trinactina, sendo que tetranactina só atingiu seu pico de produção no 15º dia. O monitoramento à expressão de valinomicina demonstrou que sua produção máxima ocorreu durante o 6º dia de cultivo.

Curva de Produção - Macrotetralídeos

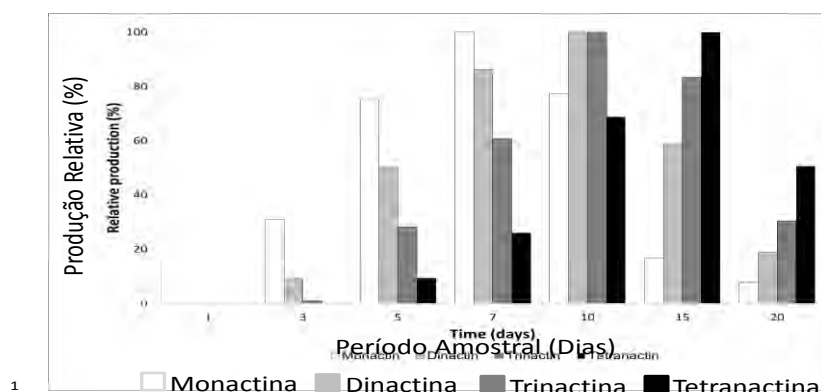


Figura 13 – Curva de produção dos macrotetralídeos. Monitoramento realizado através de UPLC/IDMS

A suplementação do meio de cultivo (BD), com sais inorgânicos influenciou diretamente na produção dos compostos bioativos pela linhagem ASBV-1^T (Tabela 4). A adição de CuSO₄ e FeSO₄, nas concentrações e condições avaliadas, inibiram completamente a expressão dos macrotetralídeos e reduziram drasticamente a expressão de valinomicina. Entretanto, MgSO₄ (2.0 mM) influenciou positivamente a produção dos macrotetralídeos (monactina, dinactina, trinactina e tetranactina). Além disso, o monitoramento realizado pelo UPLC/DI-MS demonstrou a aceleração da via metabólica responsável pela expressão dos macrotetralídeos. O ensaio foi realizado durante o quinto dia de cultivo e apresentou uma grande concentração de tetranactina, composto comprovadamente pertencente ao final da cadeia regular dos macrotetralídeos e pouco expresso durante o quinto dia de incubação, nas condições normais de cultivo (Figura 13).

A adição de ZnSO₄ ao meio de cultivo inibiu completamente a síntese dos macrotetralídeos. Entretanto, a suplementação do meio com ZnSO₄ (1.0 mM) aumentou a produção de valinomicina em 116,7%.

Tabela 4 – Produção relativa dos compostos de interesse sob a influência de sais inorgânicos. Monitoramento realizado através de UPLC/DIMS

Sais	Concentração	Monactina	Dinactina	Trinactina	Tetranactina	Valinomicina
CuSO ₄	1 mM	-	-	-	-	-
	2 mM	-	-	-	-	1,3
	5 mM	-	-	-	-	1,6
FeSO ₄	1 mM	-	-	-	-	-
	2 mM	-	-	-	-	-
	5 mM	-	-	-	-	-
MgSO ₄	1 mM	83,24	92	105,83	118,24	113,1
	2 mM	179,47	248,72	429,5	501,59	129,3
	5 mM	50,37	85,84	146,43	227,22	82,4
MnSO ₄	1 mM	75,09	64,09	52,86	46,49	85,4
	2 mM	46,44	55,42	59,48	-	74,6
	5 mM	0,87	0,74	-	-	47,2
ZnSO ₄	1 mM	-	-	-	-	216,7
	2 mM	-	-	-	-	66,2
	5 mM	-	-	-	-	-

O crescimento da linhagem ASBV-1^T foi diretamente influenciado pela adição de sais inorgânicos ao meio de cultivo. A suplementação por CuSO₄ e FeSO₄ (1.0, 2.0 e 5.0 mM) resultou na inibição completa do crescimento. Não houve correlação positiva, nas condições avaliadas, entre a adição de sais e crescimento da linhagem. Ou seja, a produção relativa de biomassa resultante do crescimento em meio suplementado por sais, esteve abaixo da produção relativa obtida no meio controle, conforme Figura 14.

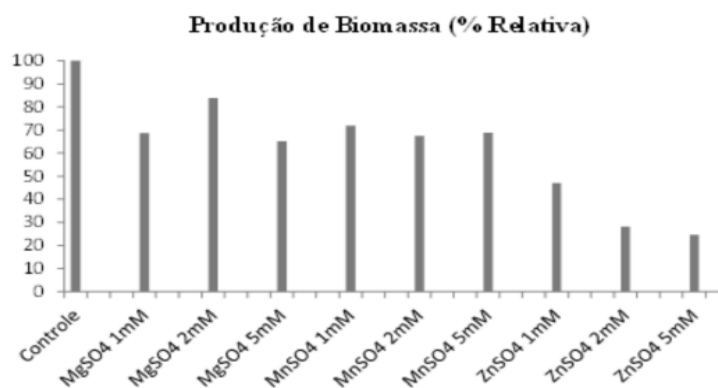


Figura 11 – Influência de sais inorgânicos à produção relativa de biomassa pela linhagem ASBV-1^T

5.4 Taxonomia polifásica da linhagem ASBV-1^T

5.4.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA e hibridização

A linhagem ASBV-1^T (GenBank EU792889) formou uma linha filética distinta na periferia do subclado do gene 16S rRNA de *Streptomyces celluloflavus*. Esse status taxonômico foi suportado por um alto valor de suporte (93%) e também pelos demais algoritmos evolutivos avaliados (Figura 15). A linhagem ASBV-1^T apresentou maior similaridade do gene 16S rRNA com a linhagem tipo de *Streptomyces celluloflavus* NRRL B-2493^T. Os dois organismos apresentaram uma similaridade de 99,4%, correspondente a 9 nucleotídeos de diferença entre os 1447 sítios analisados. A similaridade da linhagem ASBV-1^T com as linhagens tipo de *Streptomyces albolongus* NRRL B-3604^T e *Streptomyces cavourensis subsp. cavourensis* NBRC 13026 foi de 99,0%, equivalente a diferença de 14 e 15 nucleotídeos entre os 1457 e 1458 sítios analisados, respectivamente.

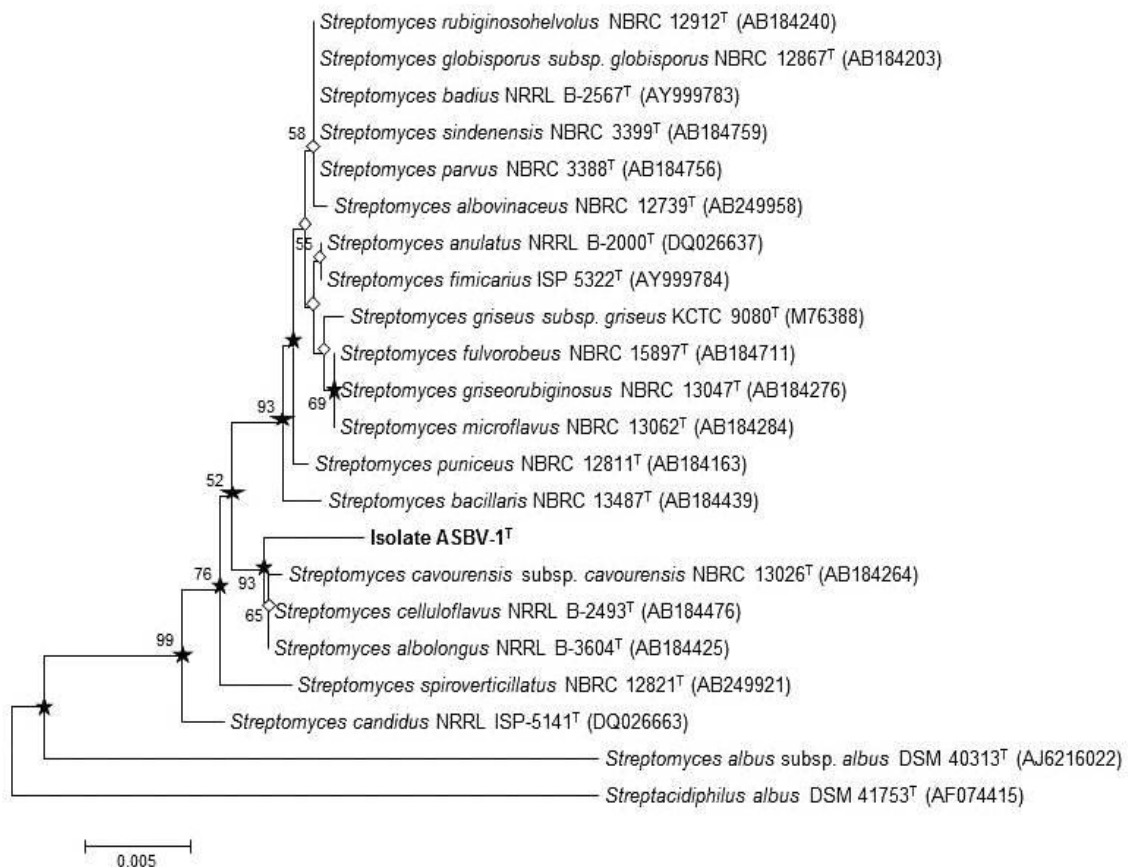


Figura 15 – Relações filogenéticas (~1400 pb) do gene 16S rRNA entre a linhagem ASBV-1^T e as linhagens tipo do gênero *Streptomyces* mais próximas baseadas no algoritmo evolutivo de “neighbour-joining”. Estrelas indicam ramos da árvore que também foram recuperados nos algoritmos evolutivos de máxima-parsimônia e máxima verossimilhança; losangos brancos indicam ramos que foram recuperados usando o algoritmo evolutivo de máxima parsimônia. Números nos nós representam as porcentagens de suporte baseados na análise de “neighbour-joining” usando 1000 pseudorepetições (apenas valores acima de 50% são apresentados). Barra: 0.005 substituições por posição nucleotídica

As variações térmicas de dissociação (ΔT_m) entre os DNAs genômicos da linhagem ASBV-1^T e os DNAs híbridos preparados a partir de ASBV-1^T/*S. albolongus* NRRL B-3604^T, ASBV-1^T/*S. cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC-13026^T e ASBV-1^T/*S. celluloflavus* NRRL B-2493^T foram 5.3, 10.1 e 6.8 °C, respectivamente (Figura 16). Tais valores correspondem respectivamente, a 63.5 ± 0.2 , 39.8 ± 1.5 e 55.8 ± 0.7 % de similaridade entre as linhagens empregadas e a linhagem ASBV-1^T. Os valores obtidos conferem com a recomendação: similaridade DNA–DNA < 70%, à determinação de uma nova espécie bacteriana (WAYNE et al., 1987).

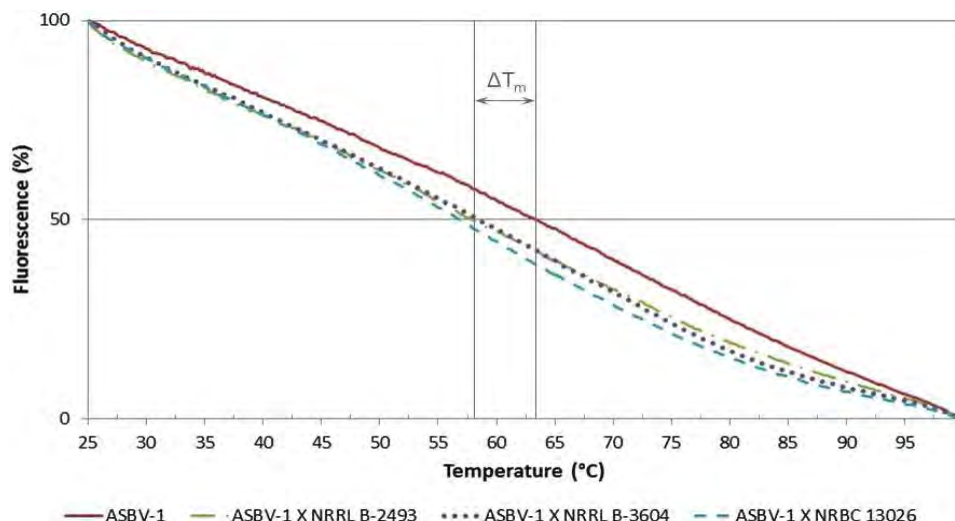


Figura 16 – Desnaturalização térmica de DNA genômico

Legenda – Hibridização DNA/DNA ente linhagem ASBV-1^T (linha sólida) e ASBV-1^T com linhagens tipo *Streptomyces* mais próximas (linhas traçadas)

5.4.2 Quimiotaxonomia

As avaliações quimiotaxonômicas demonstraram que linhagem ASBV-1^T apresenta predominância do isômero ácido *LL*-diaminopimélico, presença de ácido murâmico *N*-acetilado e menaquinonas octahidrogenadas, contendo oito e nove unidades de isopreno (MK-9 [H₈] e MK-8 [H₈]), na razão 19:5 e menores quantidades de MK-10 [H₄] e MK-9 [H₂], conforme Tabela 5, não sendo possível a caracterização dos açúcares de parede celular do organismo. A constituição do DNA genômico (%G+C) da linhagem ASBV-1^T, *S. albolongus* NRRL B-3604^T, *S. cavourensis subsp. cavourensis* NBRC 13026^T e *S. celluloflavus* NRRL B-2493^T foram de 79.6 ± 0.0, 72.0 ± 0.2, 71.4 ± 0.0 e 75.4 ± 0.1 %, respectivamente.

Tabela 5 – Análise do perfil de menaquinonas da linhagem ASBV-1^T e linhagens *Streptomyces* mais próximas

Menaquinona	Linhagens			
	1	2	3	4
MK-8 (H ₄)	-	10,29	2,5	5,29
MK-8 (H ₈)	17,38	-	7,15	-
MK-9 (H ₂)	5,34	-	-	1,6
MK-9 (H ₄)	-	-	-	5,79
MK-9 (H ₆)	-	-	-	6,68
MK-9 (H ₈)	65,39	65,53	56,35	35,45
MK-10 (H ₄)	11,86	24,17	22	45,16

Legenda – 1) ASBV-1^T; 2) *S. albolongus* B-3604^T; 3) *S. cavourensis subsp. cavourensis* F-7461^T e 4) *S. celluloflavus* B-2493^T

A composição dos ácidos graxos de membrana, da linhagem ASBV-1^T e das linhagens *Streptomyces* mais próximas filogeneticamente, está apresentada na Tabela 6. Todas as linhagens apresentaram grande quantidade de C_{16:0} (13.4–31.4 %), C_{18:1ω9c} (15.5–37.3 %) e características somadas de anteiso-C_{18:0}/C_{18:2ω6,9c} (15.2–26.2 %). O isolado ASBV-1^T distingue-se por apresentar proporções elevadas de C_{16:0} (31.4 %) e C_{18:1ω9c} (37.3 %).

Tabela 6 – Avaliação de ácidos graxos de membrana das linhagens *Streptomyces*

Ácidos graxos (%)	Linhagens			
	1	2	3	4
C _{10:0}	0.09	-	-	-
<i>iso</i> -C _{12:0}	-	-	0.13	-
C _{12:0}	0.12	0.21	0.16	0.29
<i>iso</i> -C _{13:0}	-	0.14	0.12	-
<i>anteiso</i> -C _{13:0}	-	-	0.43	-
<i>iso</i> -C _{14:0}	-	1.85	2.22	1.06
C _{14:0}	1.57	0.85	0.66	0.59
<i>iso</i> -C _{15:0}	-	10.12	3.42	5.15
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	-	12.06	13.55	3.50
<i>iso</i> -C _{16:1 H}	-	0.81	0.47	-
C _{16:1 w6c} /C _{16:1 w7c}	6.72	1.72	1.27	3.28
<i>iso</i> -C _{16:0}	-	13.46	8.82	4.20
<i>anteiso</i> -C _{16:0}	-	-	0.18	-
C _{16:0}	31.40	13.43	14.30	18.30
<i>anteiso</i> -C _{17:1 w9c}	-	0.84	1.24	-
C _{17:1 w8c}	0.42	-	-	-
<i>iso</i> -C _{17:0}	-	2.62	1.24	2.72
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	-	4.77	4.30	1.79
<i>cyclo</i> -C _{17:0}	-	4.13	1.34	2.53
C _{17:0}	0.15	-	-	-
<i>anteiso</i> -C _{18:0} /C _{18:2 w6,9c}	17.60	15.21	24.02	26.24
C _{18:1 w9c}	37.26	15.49	20.52	25.45
C _{18:0}	4.67	0.52	0.65	1.06
C _{20:1 w9c}	-	-	0.20	0.44

Legenda – 1) ASBV-1^T; 2) *S. albolongus* B-3604^T; 3) *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* F-7461^T e 4) *S. celluloflavus* B-2493^T

5.4.3 Características culturais, morfológicas, fenotípicas e bioquímicas

As características culturais da linhagem ASBV-1^T e das linhagens *Streptomyces* mais próximas filogeneticamente foram descritas a partir do crescimento em meios *ISP* 1–7. O isolado ASBV-1^T produz micélio de pigmentação amarelada e esporos de coloração branca em meio *ISP*–3. A disposição das hifas aéreas do isolado difere-se de uma cadeia curta e retilínea, para uma cadeia flexuosa de esporos, conforme Figura 17.

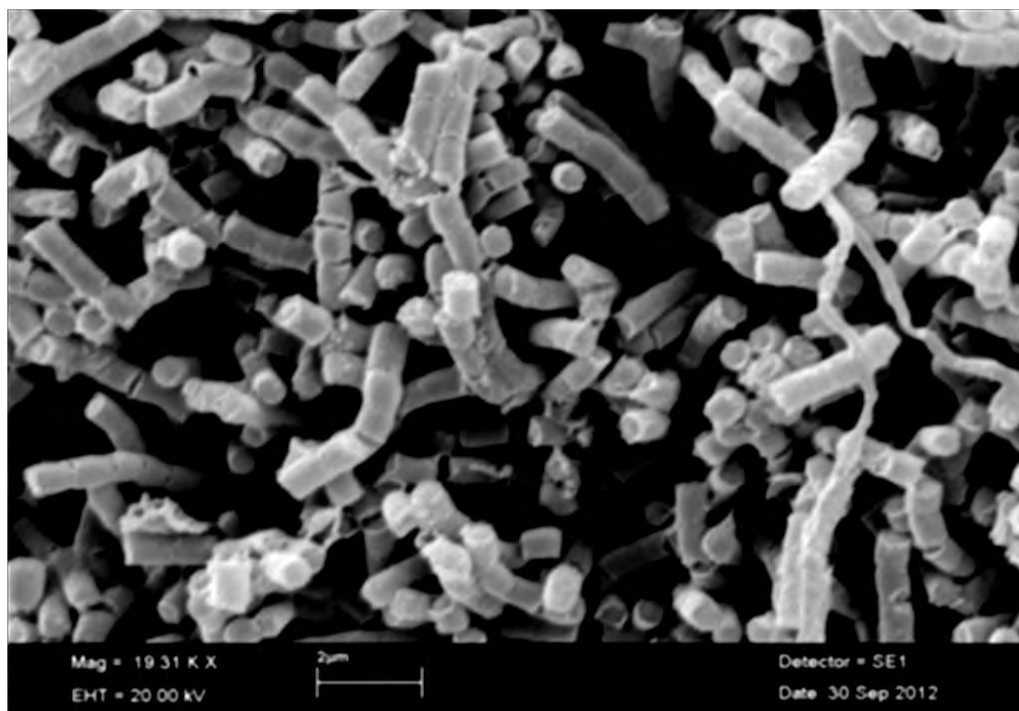


Figura 17 – Electromicrografia de varredura da linhagem ASBV-1^T, crescida em meio *International Streptomyces Project-3*, durante 15 dias, 28°C

Com exceção ao meio *ISP*-5, a linhagem ASBV-1^T apresentou bom crescimento nos demais meios *ISP* utilizados, evidenciando as diferenciações à produção de pigmentação em meio, coloração micelial e coloração dos esporos, entre a linhagem ASBV-1^T e as linhagens *Streptomyces* mais próximas (Figura 18).

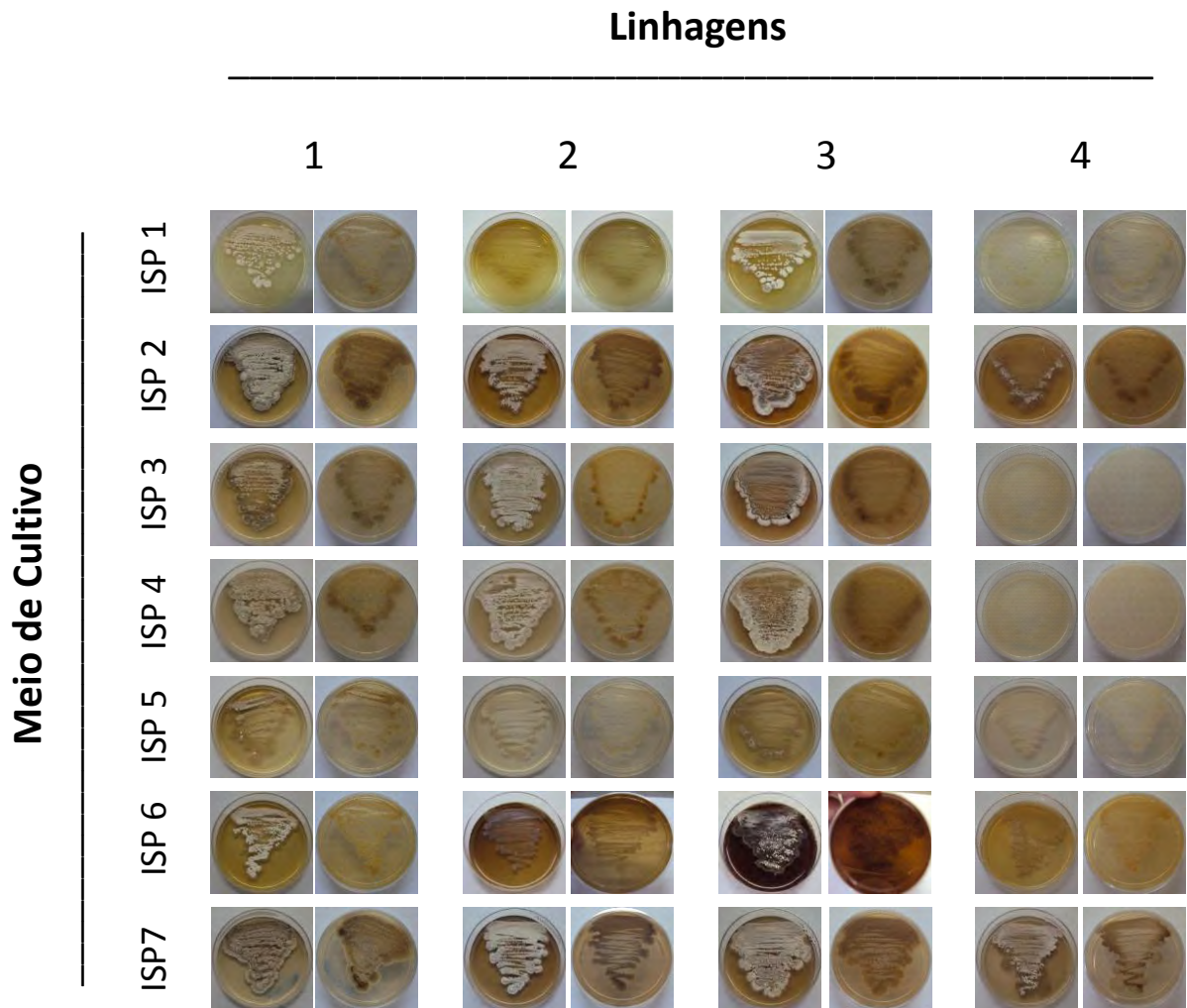


Figura 18 – Variações morfológicas entre as linhagens *Streptomyces*, crescidas em meio *International Streptomyces Project (ISP 1–7)*

Legenda – 1) ASBV-1^T; 2) *S. albolongus* B-3604^T; 3) *S. cavourensis subsp. cavourensis* F-7461^T; 4) *S. celluloflavus* B-2493^T

O ensaio fenotípico demonstrou que a linhagem ASBV-1^T e as demais linhagens tipo *Streptomyces* avaliadas foram capazes de crescer, nas condições avaliadas, entre os intervalos de pH 4,0 e 10,0 e em presença de 1,0% de NaCl, são resistentes aos antibióticos penicilina G e ácido nalidixico, não degradam ácido láctico, guanina e são capazes de degradar gelatina e utilizar frutose, galactose, glicerol, maltose, manose ou xylose como única fonte de carbono. Além disso, a linhagem ASBV-1^T pode ser prontamente diferenciada das linhagens tipo mais próximas, pela sua susceptibilidade ao antibiótico canamicina, por sua inabilidade em degradar ácido oxálico e capacidade de crescer utilizando adonitol como única fonte de carbono. As demais diferenciações entre o isolado ASBV-1^T e as demais linhagens podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Diferenças fenotípicas entre a linhagem ASBV-1^T e linhagens *Streptomyces* mais próximas
(continua)

Características	Linhagens			
	1	2	3	4
Antagonismo:				
<i>Botrytis cinerea</i> CMAA 1122	+	+	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> CMAA 1121	+	+	+	-
<i>Pythium dissotocum</i> CMAA 1206	+	+	+	-
<i>Rhizoctonia solani</i> CMAA 901	+	-	+	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> CMAA 1105	+	+	-	+
<i>Sclerotium rolfsii</i> CMAA 352	-	+	+	-
Potencial enzimático - APIZYM:				
Fosfatase ácida	+	+	-	+
Fosfatase alcalina	+	-	+	+
α -quimotripsina	+	-	+	-
Arilamidase cistina	+	+	+	-
Esterase (C4)	+	-	+	+
Lipase esterase (C8)	+	+	-	+
α -glucosidase	+	-	+	-
β -glucosidase	+	-	+	-
α -manosidase	-	-	-	+
Naftol-AS-B1-fosfohidrolase	-	+	-	+
Valina arilamidase	+	+	+	-
Degradação:				
Caseína	+	+	+	-
Quitina	+	+	+	-
Hypoxantina	-	-	+	+
Pectina	+	+	+	-
Amido	+	+	+	-
Tributyrim	-	-	+	-

Tabela 7 – Diferenças fenotípicas entre a linhagem ASBV-1^T e linhagens *Streptomyces* mais próximas (conclusão)

Características	Linhagens			
	1	2	3	4
Tween 20	-	+	-	-
Tween 40	-	+	-	-
Tween 60	-	+	-	-
Tween 80	-	+	-	-
Ácido úrico	+	-	+	-
Xantina	+	-	+	+
Xylano	+	-	+	+
Fonte de carbono:				
Adonitol	+	-	-	-
L-arabinose	+	+	+	-
Celubiose	+	+	+	-
Dextrina	+	+	+	-
Dulcitol	+	-	-	-
<i>meso</i> -Erythritol	+	-	-	+
Glicogênio	+	+	+	-
<i>myo</i> -Inusitol	+	-	+	+
Lactose	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	-
Sorbitol	+	-	+	-
Crescimento:				
3,0 NaCl (p/v)	+	+	-	+
10°C	+	-	+	-
37°C	+	-	+	-

Legenda – 1) ASBV-1^T; 2) *S. albolongus* B-3604^T; 3) *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* F-7461^T; 4) *S. celluloflavus* B-2493^T

6 DISCUSSÃO

6.1 Linhagem ASBV-1^T – Complexo enzimático quitinolítico

Considerado o segundo polímero natural de maior abundância, a quitina (β -1,4-*N*-acetilglucosamina) tem despertado atualmente, grande interesse por diferentes áreas tecnológicas. Durante muitos anos, a indústria pesqueira destinou este subproduto à aterros, oceanos e/ou incineradores, medida imprópria do ponto de vista econômico e ecológico (HALDER et al., 2012; KANDRA; CHALLA; JYOTHI, 2012). Estima-se que anualmente, cerca de 1×10^{11} toneladas de quitina são depositadas naturalmente nos leitos oceânicos. A ação microbiana deste ecossistema não permite o acúmulo do material (HALDER et al., 2013). A biodegradação dá-se por meio da ação conjunta do complexo enzimático (quitinase – EC 3.2.1.14 e β -*N*-acetilhexosaminidase – EC 3.2.1.52), denominado coletivamente como quitinases.

As quitinases são amplamente empregadas para a obtenção de protoplastos fúngicos, isolamento proteico, formulados farmacêuticos a base de quitossacarídeos e como agentes biocontroladores de fungos fitopatogênicos e insetos pragas (HELDER et al., 2013). Algumas bactérias e fungos tais como: *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Cellulomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Legionella* sp., *Listeria* sp., *Pseudomonas* sp. *Vibrio* sp. e *Streptomyces* sp. apresentam capacidade de empregar quitina como fonte exclusiva de carbono e nitrogênio, tornando-os importante à ciclagem natural deste elemento, bem como potenciais agentes de controle biológico (BHATTACHARYA; NAGPURE; GUPTA, 2007; PARK; LEE; HARMAN, 2005).

A linhagem ASBV-1^T demonstrou o seu potencial quitinolítico nos ensaios “in vitro”, a partir da degradação do substrato incorporado ao meio de cultivo (1% quitina coloidal; BDA e BD). Os resultados apresentados à temperatura ótima, pH ótimo (Figura 1) e ativação enzimática por meio da adição de sais inorgânicos (Tabela 1) foram realizados de forma independente. Goel e Naseby (2007) relatam que a presença de sais e o pH do meio interferem diretamente na estabilidade térmica e atuação enzimática, havendo maior interferência à classe química do sal, do que pela concentração da solução. Portanto os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos de ASBV-1^T poderão apresentar variações, caso haja interação das condições experimentais.

Jiang et al. (2012) também reportam correlação positiva à atividade quitinolítica, a partir de adição de $MgSO_4$ e correlação negativa, a partir da adição de $MnSO_4$ e $ZnSO_4$.

Porém, os autores relatam redução da atividade enzimática relativa, na presença de CuSO_4 , dado divergente ao obtido em nossos experimentos.

Quitinases metabolizadas por *Streptomyces* podem apresentar peso molecular variado entre 20 e 70 kDa. Acreditamos que a fração bioativa, à germinação conidial de *Botrytis cinerea* “in vitro”, descrita como ≥ 100 kDa (Figura 2), possa ser um agregado enzimático, incapaz de transpor a membrana seletora *Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filters for Protein Purification and Concentration*. A caracterização quitinolítica dependerá de ensaios específicos, como por exemplo: purificação (precipitação por sulfato de amônio), diálise (Tampão Tris-HCl 50 mM), separação (Coluna HiPrep QXL; Superdex 75 HR), e SDS PAGE, conforme descrição de Jiang et al. (2012).

6.2 Linhagem ASBV-1^T – Metabólitos secundários e biocontrole de *Botrytis cinerea*

O gênero *Streptomyces* compõe-se de um grupo de micro-organismos conhecidamente descritos pela sua habilidade em metabolizar compostos bioativos de interesse biotecnológico. Dentre estes compostos, os macrotetralídeos apresentam-se como uma classe química de amplo espectro, tais como: antibacteriano, antifúngico, antitumoral, antiprotozoário, inseticida e imunossupressor (CALLEWEART et al., 1988; TANOUCI; SHICHI, 1987; ZIZKA, 1998).

O primeiro composto, pertencente a esta classe, foi isolado em meados dos anos 50 (CORBAZ et al., 1955), e foi descrito como nonactina, curiosamente por não apresentar qualquer atividade antibiótica (KELLER-SCHIERLEIN; GERLACH, 1968). Os compostos monactina, dinactina, trinactina e tetranactina metabolizados pela linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T estão descritos atualmente como tetra ésteres cíclicos lipofílicos neutros e são derivados do ácido nonático e ácido homononático (REZANKA et al., 2004), os quais conferem à classe das nactinas seu caráter ionóforo (MARRONE; MERZ, 1992; PRESSMAM, 1976; STERERDING; KADENBACH, 1990).

O monitoramento realizado sob a cinética do primeiro grupo de compostos, presente na F_R ASBV-1, demonstrou que monactina, dinactina, trinactina e tetranactina são resultados de uma mesma via metabólica apresentando sua expressão em forma de cadeia regular (Figura 13). A estruturação química desses compostos ocorre a partir da substituição de um, dois, três e quatro radicais metil (CH_3) por radicais etil ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$) na estrutura base - nonactina (JANI; EMMERT; WOHLGEMUTH, 2007). Curiosamente, a nonactina, considerada precursora destes compostos não foi identificada em nossas análises.

Também isolada inicialmente a partir de culturas de *Streptomyces* (BROCKMANN; SCHMIDT-KASTNER, 1955), a valinomicina é descrita atualmente como um ciclo peptídeo de grande potencial bioativo, podendo ser empregada como antibacteriano (PARK et al., 2008), inseticida, nematicida, antiviral e antitumoral (CHENG, 2006; RYOO et al., 2006). A estrutura química do composto dispõe de uma cavidade interna hidrofílica, a qual suporta a acomodação de íons K^+ (EISENMAN, 1968; PRESSMAN, 1973), fator descrito como responsável à capacidade de transpor membranas plasmáticas (MARUYAMA et al., 2007). As cadeias externas de valina e ácido hidroxí-isovalérico determinam à estrutura química do composto seu caráter hidrofóbico.

Os macrotetralídeos apresentam baixa toxicidade a animais e ao ambiente (COPPING; MENN, 2000), e são conhecidamente descritos como polinactinas, pela dificuldade encontrada em separar, isoladamente os compostos: monactina, dinactina, trinactina e tetranactina. A valinomicina, por sua vez, é reportada como um composto de toxicidade moderada à saúde humana (TEPLOVA et al., 2006). Zizka (1998) e Park et al. (2008) apresentam a concentração mínima inibitória (*MIC*) de tetranactina e valinomicina a 24.0 e 4.0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivamente. O extrato bruto da linhagem ASBV-1^T utilizado nos experimentos, continha a proporção 13, 43, 32, 6 e 6 % de monactina, dinactina, trinactina, tetranactina e valinomicina, respectivamente, apresentando valores de *MIC* próximos a 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Esta relação sugere que dinactina e trinactina apresentem baixa atividade antagônica à *Botrytis cinerea*, frente à atividade apresentada por tetranactina ou que os compostos competem pelos mesmos sítios de ligação, reduzindo a eficiência bioativa.

Os experimentos demonstraram a efetividade destes biocompostos em controlar o crescimento do fitopatógeno *B. cinerea*, não havendo diferenciação estatística entre este agente bioativo e os agentes químicos utilizados atualmente como forma de controle à infestação do patógeno em culturas de morango. O emprego de suspensão celular da linhagem ASBV-1^T, nos ensaios “in vivo” não resultou no controle da infestação, muito provavelmente por não haver tempo suficiente à colonização dos pseudofrutos pela linhagem. Em trabalho realizado anteriormente, Zucchi et al. (2008), reportaram a eficiência da linhagem ASBV-1^T em controlar a infestação de *Aspergillus parasiticus* em grãos de amendoim, por meio de tratamentos curativos, onde a linhagem bioativa foi inoculada com 24 horas de antecedência ao patógeno.

A influência dos sais inorgânicos à produção de compostos bioativos, bem como o impacto deste fator na biomassa final são informações pouco reportadas em trabalhos científicos, porém muito exploradas pela indústria biotecnológica. Neste trabalho podemos

observar que a suplementação do meio de cultivo por ZnSO₄ (1.0 mM), resultou na superexpressão de valinomicina e inibição completa da via responsável pela expressão dos macrotetralídeos e redução de biomassa em aproximadamente 50%. A produção de macrotetralídeos aumentou aproximadamente 400%, a partir da suplementação por MgSO₄ (2.0 mM) (Tabela 4 e Figura 14).

A imobilização celular (KOURKOUTAS et al., 2004; PRASAD et al., 2005), por meio de matrizes compostas por alginato, carvão, silicone, maltodextrina, cerâmica, buchas vegetais, dentre outras, poderá auxiliar futuramente no desenvolvimento de bioprodutos, a partir da linhagem ASBV-1^T.

6.3 *Streptomyces araujoniae* sp. nov. – Taxonomia polifásica

As variações entre os valores de hibridização (DNA/DNA), a constituição de bases nitrogenadas no DNA (%Mol G+C), relações filogenéticas (16S rRNA), perfis quimiotaxonômicos (MK-H e ácidos graxos) e propriedades fenotípicas confirmaram que a linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T trata-se do núcleo de um novo táxon do gênero *Streptomyces* e por conseguinte, o nome *Streptomyces araujoniae* sp. nov. foi proposto (SILVA et al., 2013; ANEXO B).

Streptomyces araujoniae sp. nov. (a.ra.u.jo.ni'ae. N.L. gen. fem. *araujoniae*, nomeado como forma de homenagear a Prof. Dr. Janete Magali de Araújo (UFPA) em reconhecimento às suas contribuições aos estudos de actinomicetos brasileiros).

Pertence a classe *Actinobacteria*, aeróbico, gram-positivo, catalase-positivo, com crescimento micelial aéreo predominantemente branco, diferenciado por uma cadeia retilínea e flexuosa de esporos de superfície lisa (0,6-0,7 x 1,0-1,2 µm) quando cultivada em meio de ISP 3. Produz pigmentação solúvel, de coloração amarelada, em meio ISP 6. A linhagem apresenta bom crescimento nos intervalos de 10 e 37 °C, pH 4,0 a 10,0, mas não é capaz de crescer na presença de NaCl (5,0% p/v). Demonstra-se capaz de degradar gelatina e incapaz de degradar guanina. Utiliza adonitol, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-xylose, dulcitol e glicerol (1,0% p/v) como única fonte de carbono ao crescimento, e é incapaz de utilizar ácido láctico (0,2% p/v). Apresenta potencial enzimático para a produção de leucina arilamidase, mas não expressa à tripsina, β-galactosidase, β-glucosidase, e α-fucosidase (APYZim Teste). Inibe o crescimento de diversas linhagens fitopatogênicas, tais como: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phythium dissotocum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Aspergillus parasiticus*. Apresenta resistência a sulfato de estreptomicina, rifampicina e sensibilidade a sulfato de canamicina e novobiocina (10 µg/mL).

A linhagem ASBV-1^T (CBMAI 1465^T; CCMA 894^T e NRRL B-24922^T) foi isolada a partir de tubérculos de batata (ZUCCHI et al, 2008). A descrição é baseada em um único isolado e por isso, serve como a descrição da linhagem tipo. O número de acesso GenBank para o gene 16S rRNA de *S. araujoniae* ASBV-1^T é EU792889.

7 CONCLUSÃO

- A linhagem *Streptomyces* ASBV-1^T demonstrou seu potencial bioativo, por meio da produção de complexo enzimático quitinolítico e metabólitos secundários;
- Macrotetralídeos e valinomicina foram responsáveis pelo controle da infestação de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morangos;
- Procedimentos simples e de baixo custo, como por exemplo, a adição de sais inorgânicos ao meio de cultivo, pode influenciar drasticamente a fisiologia de actinomicetos, permitindo que haja maior expressão dos compostos de interesse, redução da produção de biomassa e silenciamento de vias metabólicas;
- A linhagem ASBV-1^T constitui um novo táxon dentro ao gênero *Streptomyces*, sendo nominada como *Streptomyces araujoniae* sp. nov.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA. **Consulta Pública nº89, de 27 de novembro de 2009**. Gerência geral de toxicologia. Nota técnica: Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo metamidofós. 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect>>. Acesso em: 01 ago. 2012.
- AGRONEGÓCIO BRASILEIRO EM NÚMEROS. **Revista de Política Agrícola**, abr./jun., 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 13 ago. 2013.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. Clonagem do eucalipto. In: _____. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. p. 58-72.
- ANDRIGUETO, J.R. Desenvolvimento e conquistas da produção integrada de frutas no Brasil. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Meio Ambiente. **Formação de inspetores para atuação no Brasil de acordo com o Protocolo Europeu de Boas Práticas Agrícolas e Qualidade do Produto (EUREPGAP + BRC)**. Jaguariúna, 2004. 1 CD-ROM.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2010. Disponível em: <<http://www.anuarios.com.br>>. Acesso em: 15 jul. 2013.
- BAUTISTA-BANOS, S.; GARCIA, E.; BARRERA, L.; REYES, N.; WILSON, C. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecello biumdulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 29, n. 1, p. 81-92, 2003.
- BEEVER, R.E.; BOLLARD, E.G. Nature of stimulation of fungal growth by potato extract. **Journal of General Microbiology**, London, v. 60, n. 2, p. 273–279, 1970.
- BENITO, E.P.; ARRANZ, M.; ESCLAVA, A. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 17, p. 43-46, 2000.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites, a personal view. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BHATTACHARYA, D., NAGPURE, A., GRUPTA, R.R. Bacterial chitinases: properties and potential, **Critical Reviews in Biotechnology**, Floride, v. 27, p. 21–28, 2007.
- BLACHINSKY, D.; ANTONOV, J.; BERCOVITZ, A.; ELAD, B.; FELDMAN, K.; HUSID, A.; LAZARE, M.; MARCOV, N.; SHAMAI, I.; KEREN-ZUR, M.; DROBY, S. Commercial applications of “Shemer” for the control of pre and postharvest diseases. **International Organisation for Biological Control**. Avignon, v. 30, n. 6/1, p.75-78, 2007.
- BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.

BORTOLOZZO, A.R.; SANHUEZA, R.M.V.; MELO, G.W.B.; BERNARDI, A.K.J.; HOFFMANN, A.; BOTTON, M.; FREIRE, J.M.; BRAGHINI, L.C.; VARGAS, L.; CALEGARIO, F.F.; FERLA, N.J.; PINEN, S.M.J. **Produção de morangos no sistema semi-hidropônico**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. 71 p. (Circular Técnica, 62).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana de açúcar 2012**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em: 13 ago. 2013.

_____. **Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 e 2020/2021**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%20_0.pdf. Acesso em: 13 ago. 2013.

_____. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Desenvolvimento da produção**. 2011. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 05 jan. 2013.

BRAUN, P.G.; SUTTON, J.C. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. **Canadian of Plant Pathology**, Ottawa, v. 10, n. 2, p. 133-141, 1988.

BROCKMANN, H.; SCHMIDT-KASTNER, G. Valinomycin I, XXVII Mitteilung uber Antibioticas Actinomyceten, **Chemische Berichte**, Weinheim, v. 88, n. 1, p. 57-61, 1955.

BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O. (Coord.). **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: IICA; MAPA; SPA, 2007. 102 p. (Série Agronegócios, 7). Disponível em: http://www.ibraf.org.br/x_files/Documentos/Cadeia_Produtiva_de_Frutas_S%C3%A9rie_Agroneg%C3%B3cios_MAPA.pdf. Acesso em: 10 ago. 2013.

BULL, A.T; WARD, A.C; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

CALIFORNIA STRAWBERRY COMMISSION; THE CALIFORNIA MINOR CROPS COUNCIL. **A pest management strategic plan for strawberry in California**. 2013. Disponível em: <http://www.ipmcenters.org/pmsp/pdf/CASTRAWBERRY.PDF>. Acesso em: 01 ago. 2013.

CALLEWAERT, D.M.; RADCLIFF, G.; TANOUCHE, Y.; SHICHI, H. Tetranactin, a macrotetrolide antibiotic, suppresses “*in vitro*” proliferation of human lymphocytes and generation of cytotoxicity. **Immunopharmacology**, New York, v. 16, n. 1, p. 25-32, 1988.

CANOVA, S.P.; PETTA, T.; REYES, L.F.; ZUCCHI, T.D.; MORAES, L.A.B.; MELO, I.S. Characterization of lipopeptides from *Paenibacillus* sp. (IIRAC30) suppressing *Rhizoctonia solani*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 2241–2247, 2010.

CARVALHO, S.P. Histórico, importância socioeconômica e zoneamento da produção no Estado de Minas Gerais. In: _____. (Coord.). **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. p. 9-14.

CASTELLANI, A. The viability of mold culture of fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, p. 225-226, 1939.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Temas sociais**: distribuição de renda e empregos. Piracicaba, 2011. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

CHARTER, K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society British**, London, v. 361, n. 1469, p. 761-798, 2006.

CHENG, Y.Q. Deciphering the biosynthetic codes for the potent anti-SARS-CoV cyclo de psipeptide valinomycin in *Streptomyces tsusimaensis* ATCC 15141. **European Journal of Chemical Biology**, Weinheim, v. 7, n. 3, p. 471-477, 2006.

CHET, I.; BENHAMOU, S.H. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: HARMAN G.E.; KUBICE C.P. (Ed.). **Trichoderma & Gliocladium**: enzymes, biological control and commercial applications. London; Taylor & Francis, 1998. v. 2, p. 153-152.

CHOQUER, M.; FOURNIER, F.; KUNG, C.; LEVIS, C.; PRADIER, J.; SIMON, A.; VIAUD, M. *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Oxford, v. 277, n. 1, p. 1-10, 2007.

CHRISTOVA, K.; SHOLEVA, Z.; CHIPEVA, V. Application of molecular biological methods in taxonomy of genus *Streptomyces*. **Journal of Culture Collections**. Bulgaria, v. 1, n. 1, p. 3-10, 1995.

CHUN, J.; LEE, J.; JUNG, Y.; KIM, M.; KIM, S.; KIM, B.K.; LIM, Y.W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 10, p. 2259-2261, 2007.

COLWELL, R.R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Basingstoke, v. 18, n. 5, p. 302-307, 1997.

CORBAZ, R.; ETTLINGER, L.; GAUMANN, E.; KELLER-SCHIERLEIN, W.; KRADOLFER, F.; NEIPP, L.; PRELOG, V.; ZOHNER, H. Metabolic products of actinomycetes. **Helvetica Chimica Acta**, Zurich, v. 38, n. 6, p. 1445-1448, 1955.

CREVELIN, E.J.; CANOVA, S.P.; MELO, I.S.; ZUCCHI, T.D.; SILVA, R.E.; MORAES, L.A.B. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, 2013. doi:10.1007/s12010-013-0418-5. Disponível em: <link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-013-0418-5#page-1>. Acesso em: 09 out. 2013.

DJONOVIC, S.; VITTONI, G.; MENDOZA-HERRERA, A.; KENERLEY, C.M. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively co expressing beta-1,3- and beta-1,6-glucanase genes. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 469-480, 2007.

DOMINGOS, J.B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V.G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 745–753, 2003.

DORBY, S.; LICHTER, A. Post-harvest Botrytis infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. (Ed.). **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 223–242.

DOTTO, M.C.; POMBO, M.A.; MARTINEZ, G.A; CIVELLO, P.M. Heat treatments and expansin gene expression. In strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**, New York, v. 130, n. 4, p. 775-780, 2011.

EISENMAN, G. Ion permeation of cell membranes and its models. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 27, n. 6, p. 1249-1251, 1968.

ELAD, Y.; KOEHL, J.; FOKKEMA, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeast. **Phytopathology**, New York, v. 84, n. 10, p. 1193-1200, 1994.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet**. (2013) (Atualizado em: 14 de Maio, 2013). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/s/streptomyces.html>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

FAO. Codex Alimentarius Commission. **Food and agricultural commodities production**. Joint FAO/OMS Food Standards Programme, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/a1472e/a1472e00.HTM>>. Acesso em: 15 set. 2013.

_____. **Statistics division online databases 2010**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/>>. Acesso em: 13 ago. 2013.

_____. **FAO statistical year book 2012: world food and agriculture**. Rome, 2012 362 p.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

_____. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, New York, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FIEDLER, H.P.; BRUNTNER, C.; BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; POTTERAT, O.; PUDER, C.; MIHM, G. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p.37-42, 2005.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV Editora, 2003. 412 p.

- FILONOW, A.B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 8, n. 2, p. 243-256, 1998.
- FITCH, W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for specific tree topology. **Systematic Zoology**, Washington, v. 20, n. 4, p. 406-416, 1971.
- FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 337-359, 2005.
- FURTADO, E.L.; SANTOS, C.A.G.; TAKAHASHI, S.S.; CAMARGO, F.R.A. **Doenças de Eucalyptus em viveiro e plantio: diagnose e manejo**, Jacareí: Votorantim Celulose e Papel, Unidade Florestal, 2001, 48 p. (Boletim Técnico, 1).
- GALLETTA, G.J. BRINGHURST, R.S. Strawberry management. In: GALLETTA G.J.; HIMELRICK D.G. **Small fruit crop management**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990. p. 83-156.
- GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advance**, Oxford, v. 23, p. 471-499, 2005.
- GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effect of nutrients on production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiology Research**, Pavia, v. 160, n. 3, p. 243-248, 2005.
- GOEL, V.; NASEBY, D.C. Thermal stabilization of chitinolytic enzymes of *Pantoea dispersa*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p.150-157, 2007.
- GONZALES, J.M.; SAINT-JIMENEZ, C. A simple fluorimetric method for the estimation of DAN-DNA relatedness between closely related microorganism by thermal denaturation temperatures, **Extremophiles**, Berlin, v.9, n. 1, p.75-79, 2005.
- GOODFELLOW, M.; KUMAR, Y.; LABEDA, D.P.; SEMBIRING, L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for *Streptomyces* with rugose ornamented spores. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 173-199. 2007.
- GORDON, R.E.; MIHM, J.M. Type species of genus *Nocardia*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 1-10, 1962.
- GORDON, R.E.; BARNETT, D.A.; HANDEHAN, J.E.; PANG, C.H.N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and *Nocardia* strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 24, n. 1, p. 54-63, 1974.
- GRESE, R.P.; CERNY, R.L.; GROSS, M.L. Metal ion-peptide interactions in the gas phase: a tandem mass spectrometry study of alkali metal cationized peptides. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 111, n. 1, p. 2835-2842, 1989.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, Austin, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.

HALDER, S.K., MAITY, C., JANA, A., PATI, B.R., MONDAL, K. C. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity, **International Organization for Biological Control**, Dordrecht, v. 57, p. 441–449, 2012.

HALDER, S.K.; MAITY, C.; JANA, A.; DAS, A.; PAUL, T.; MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinases and antioxidant chitosaccharides, **International Biodeteriorations Biodegradation**, New York, v. 79, p. 88–97, 2013.

HELBING, J. Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. In strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 1891). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 5, p. 265-273, 2001.

HOANG, K.C., LAI, T.H., LIN, C. S., CHEN, Y. T., LIAU, C. Y. The chitinolytic activities of *Streptomyces* sp. TH-11. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 12, p. 56–65, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Contagem da população 2010**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 ago. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS RENOVÁVEIS. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília, 2010. 84 p.

IM, W.T.; JUNG, H.M.; TEN, L.N.; KIM, M.K.; BORA, N.; GOODFELLOW, M.; LIM, S.; JUNG, J.; LEE, S.T. *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from fresh water, and *Deinococcuscaeni* sp. nov., isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 10, p. 2348-2353, 2008.

JANI, P.; EMMERT, J.; WOHLGEMUTH, R. Process analysis of macrotetrolide biosynthesis during fermentation by means of direct infusion LC-MS. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 3, n. 2, p. 202-208, 2008.

JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 411-441, 2002.

JARVIS, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, New York, v. 73, n. 3, p. 190-194, 1989.

JIJAKLI, M.H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Pichiaanomala* strain K, antagonista of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 4, p. 335-343, 1998.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (Ed.). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. v. 3, p. 21-123.

KELLER-SCHIERLEIN, W.; GERLACH, H. Makrotetrolide. **Fortschritte de Chemie Organischer Naturstoffe**, New York, v. 26, p.161–189, 1968.

- KANDRA, P.; CHALLA, M.M.; PADMA J.H.K. Efficient use of prawn waste: present and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 93, p. 17-29, 2012.
- KIM, B.Y.; ZUCCHI, T.D.; FIEDLER, H.P.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces cocklensis* sp nov., a dioxamycin-producing actinomycete. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 2, p. 279–283, 2012.
- KOURKOUTAS, Y.; MCERLEAN, C.; KANELLAKI, M.; HACK, C.J.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; KOUTINAS, A.A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 112, n. 1, p. 25-35, 2004.
- KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2: Doenças as plantas cultivadas, p. 319-332.
- KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers** Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- KURYLOWICZ, W. **Antibióticos uma revisão crítica**. Recife: Guanabara Koogan, 1981. 341 p.
- LAHLALI, R.; SERRHINI, M.N.; FRIEL, D.; JIJAKLI, M.H. Predictive modeling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 114, n. 1, p. 1-9, 2007.
- LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de micro-organismos no Brasil. In: MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 15-28.
- MAAS, J.L. **Compendium of strawberry diseases**. 2nd ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1998. 138 p.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.
- MARRONE, T.J.; MERZ-JR, K.M. Molecular recognition of potassium ion by the naturally occurring antibiotic ionophore nonactin. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 114, n. 19, p. 7542-7549, 1992.
- MARUYAMA, M., YAMAUCHI, S., AKIYAMA, K., SUGAHARA, T., KISHIDA T., KOBAYASHI Y. Antibacterial activity of virgatus in related compound. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 71, p. 677-680, 2007.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, 308 p.

MINNIKIN, D.E.; O'DONNELL, A.G.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; ATHALYE, M.; SCHAAL, A.; PARLETT, J.H. An integrated procedure for extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **Journal of Microbiological Methods**, New York, v. 2, n. 5, p. 233-241, 1984.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; SUTTON, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interaction with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, Israel, v. 29, n. 2, p.103-113, 2001.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. **Journal Natural Products**, Washington, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGOKA, L.C.M.; GROSS, M.L. Multistep collisionally activated decomposition in an ion trap for the determination of the amino-acid sequence and gas-phase ion chemistry of lithium-coordinated valinomycin. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 194, p. 247-259, 2000.

O'DONNELL A.G.; FALCONER C.; GOODFELLOW M.; WARD A.C.; WILLIAMS, E. Biosystematics and diversity amongst novel carboxydo trophic actinomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 325–340, 1993.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine Drugs**, Basel, v. 7, n. 2, p. 210-218, 2009.

OLIVEIRA, T.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. **Avaliação da atividade antagônica “in vitro” de isolados de *Trichoderma* sp para biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Comunicado Técnico, 177). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN-2009-09/31543/3/cot177_0808.pdf>. Acesso em: 04 maio 2012

PARK, S.K., LEE, M.C., HARMAN, G.E. The biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. strain C-61 against *Rhizoctonia solani* depends on the productive ability of chitinase, **European Foundation for Plant Pathology**, Dordrecht, v. 21, p. 275–282, 2005.

PARK, C.N.; LEE, J.M.; LEE, D.; KIM, B.S. Antifungal activity of valinomycin a peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. strain M10 antagonistic to *Botrytis cinerea*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, n. 5, p. 880-884, 2008.

PARRA, J.R.P. Controle biológico no Brasil: parasitoide e predadores, In: PARRA, J.R.P.; BOELLO, P.S.M.; ORRÃO-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. v. 1, p. 19-23.

PATIL, R.S.; GHORMADA, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 6, n. 7, p. 473-483, 2000.

PAULA JÚNIOR, T.J.; MORANDI, M.A.B.; ZAMBOLIM, L.; SILVA, M.B. Controle alternativo de doenças de plantas: histórico. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG; CTZM, 2005. p. 135-162.

PAULITZ, T.C.; BELANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p.103-133, 2001.

PINTO, A.C. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PISARZHEVSKII, S.A.; GLOBALA, A.G.; SHIRSHOV, O.N.; MARCHUK, A.I.; SVETUKHIN, A.M.; KARELIN, A.A. Method of estimation of lysozyme activity in serum with chitin azure as substrate. **Voprosy Medicin Skol chimii**, Moscow, v. 43, n. 3, p. 185-190, 1997.

PRASAD, K.K.; MOHAN, S.V.; BHASKAR, Y.V.; RAMANAIAH, S.V.; BABU, V.L.; PATI, B.R.; SARMA, P.N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 301-307, 2005.

PRESSMAN, B.C. Properties of ionophores with broad range cation selectivity. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 32, n. 6, p. 1698-1703, 1973.

_____. Biological application of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976.

REZANKA, T.; SPIZEK, J.; PRIKRYLOVÁ, V.; PRELL, A.; DEMBITSKY, V.M. Five new derivatives of nonactin and homo-nonactin acids from *Streptomyces globisporus*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 60, n. 22, p. 4781-4787, 2004.

RHA, E.; PARK, H.J.; KIM, M.O. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Oxford, v. 201, n. 1, p. 105-109, 2006.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, New York, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROBBS, C.F. Potencialidades de bactérias no biocontrole de doenças de plantas. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1986, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 17-23.

RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. **International Journal of Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 3, p. 696-703, 2010.

ROSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **Federation European Microbiological Societies Microbiology Review**, New York, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

RYOO, I.J.; PARK, H.R.; CHOO, S.J.; HWANG, J.H.; PARK, Y.M.; BAE, K.H.; SHIN-YA, K.; YOO, I.D. Selective cytotoxic activity of valinomycin against HT-29 human colon carcinoma cells via down-regulation of GRP78. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 817-820, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 4, n. 4, p. 404-425, 1987.

SANTOS, L.O.; MARTINS, R.N.; DURIGAN, J.F.; MATTIUZ, B.H. Técnicas de conservação à pós colheita de morangos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 88-97, 2007.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Newark: MIDI Inc., 1990. 7 p. (Technical Note, 101).

SCHENKER, P.; BAICI, A. Paradoxical interaction between modifiers and elastase-2. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, Oxford, v. 277, n. 11, p. 2486-2495, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 129-137. 2000.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 7-13, jan./fev. 2007.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Assistant computational program version for the windows operating system. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, L.J.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S.; GOODFELLOW, M.; ZUCCHI, T.D. *Streptomyces araujoniae* sp. nov.: an actinomycete isolated from a potato tubercle. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 103, n. 6, p. 1235-1244, 2013.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS. **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento**: Brasil, 2010. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Informação Científica e Tecnológica; 2010. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acessado em: 13 ago. 2013.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.; KMPFER, P.; MAIDEN, M.C.; NESME, .; R OSSELL -MORA, R.; SWINGS, .; R PER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

- STANECK, J.L.; ROBERTS, G.D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 28, n. 2, p. 226–231, 1974.
- STERERDING, D.; KADENBACH, B. The K1-ionophores nonactina and valinomycin interact differently with the protein of reconstituted cytochrome oxidase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 22, n. 2, p. 197-205, 1990.
- SUTTON, J.C.; LI, D.W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.G.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Washington, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.
- SVITIL, A.L.; CHADHAIN, S.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitin degradation proteins produced by marine bacterium *Vibrio harveyi* on different forms of chitin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 2, p. 408-413, 1997.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- TANOUCI, Y.; SHICHI, H. Immunosuppressive effects of polynactins (tetranactin, trinactina and dinactina) on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. **Japanese Journal of Ophthalmology**, New York, v. 31, n. 2, p. 218-229, 1987.
- THAKORE, Y.B. **Enzymes for industrial applications**. BBC Research, Jan., 2008. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/bio030e>>. Acesso em: 15 ago. 2013.
- UCHIDA, K.; KUDO, T.; SUZUKI, K.; NAKASE, T. A new rapid method of glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 45, n. 2, p. 49–56, 1999.
- VINCENTI, M.; GUGLIELMETTI, G.; ANDRIOLLO, N.; CASSANI, G. Structural analysis of macrotetrolide antibiotic mixtures using collision induced dissociation mass spectrometry. **Biomedical and Environmental Mass Spectrometry**, Chichester, v. 19, p. 240-247, 1990.
- XIAYUN, J., CHEN D., SHENLE H., WANG W., CHEN, S., ZOU, S. Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 87, p. 2409– 2415, 2012.
- WAKSMAN, S.A.; HENRICI, A.T. The nomenclature and classification of actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p.337-341, 1943.
- WANG, S.L.; CHANG, W.T. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 2, p. 380-386, 1997.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; JOG, M.M.; BHOLE, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 176, n. 5, p. 386-390, 2001.

YEN, M.T.; YANG, J.H.; MAU, J.H. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crabshells **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 15-21, 2009.

ZAHAVI, T.; COHEN, L.; WEISS, B. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 20, n. 2, p. 115-124, 2000.

ZIZKA, Z. Biological effects of macrotetrolide antibiotics and nonactic acids. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 43, n. 1, p. 7-14, 1998.

ZOBELL, C.E.; RITTENBERG, S.C. The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 35, n. 3, p. 275-287, 1938.

ZUCCHI, T.D.; MORAES, L.A.; MELO, I.S. *Streptomyces* sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 6, p. 2153–2160, 2008.

ZUCCHI, T.D.; TAN, G.Y.A.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis thermophila* sp. nov. and *Amycolatopsis viridis* sp. nov., novel thermophilic actinomycetes isolated from arid Australian soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 1, p. 168-72, 2012.

ZUCCHI, T.D.; BONDA, A.N.V.; FRANK, S.; KIM B.Y.; KSHETRIMAYUM, J.D.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis bartoniae* sp. nov., *Amycolatopsis bullii* and *Amycolatopsis namatjirensis* sp. nov., novel mesophilic actinomycetes isolated from arid Australian soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 102, n. 1, p. 91–98, 2012.

ZUCCHI, T.D.; TAN, G.Y.A.; BONDA, A.N.V.; FRANK S.; KSHETRIMAYUM J.D.; GOODFELLOW M. *Amycolatopsis granulosa* sp. nov., *Amycolatopsis ruanii* sp. nov. and *Amycolatopsis thermalba*, novel thermophilic actinomycetes isolated from arid soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 6, p. 1245–1251, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

1 – Batata Dextrose Ágar (BDA)

* Caldo de batata -----	200 mL
Água destilada -----	800 mL
Dextrose -----	20,0 g
Ágar -----	16,0 g

2 – Caldo Batata Dextrose (BD)

* Caldo de Batata -----	200 mL
Água destilada -----	800 mL
Dextrose -----	20,0 g

* Para cada quilograma de batata descascada, adicionar 1000 mL de água destilada. O conteúdo deve ser fervido durante 30 minutos. Após este procedimento, filtrar em gaze estéril e completar o volume final à 1000 mL através da adição de água destilada. O caldo deve ser particionado em volume de 100 mL e mantido a -20 °C.

3 – Agar Água (AA)

Água destilada -----	1000 mL
Ágar -----	16,0 g

4 – Glicose Extrato de Levedura Ágar (GYEA)

Extrato de levedura -----	10,0 g
Glicose -----	10,0 g
Ágar -----	16,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,2±0,2

5 – Caldo Extrato de Levedura (GYE)

Extrato de levedura -----	10,0 g
Glicose -----	10,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,2±0,2

6 – Meio de Gordon (Degradação de Gelatina)

KH ₂ PO ₄ -----	9,1 g
Na ₂ HPO ₄ -----	9,5 g
Extrato de levedura -----	0,1 g
Vermelho de Fenol -----	0,01 g
** Solução de gelatina	
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	6,8

** A gelatina deverá ser autoclavada separadamente em água destilada, sendo posteriormente incorporada ao meio basal, de forma obter uma concentração final de 1,0 (p/v).

7 – Meio Sierra (Degradação de Tween)

Peptona bacteriana -----	10,0 g
NaCl -----	5,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O -----	0,1 g
*** Solução de Tween -----	10 mL
Ágar -----	15,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,4

*** O(s) Tween(s) deve(m) ser autoclavado(s) separadamente em água destilada. Utilizar 10 mL de Tween de forma obter uma concentração final de 1,0%.

8 – International Streptomyces Project 1 (Extrato de Triptona Ágar)

Triptona bacteriológica -----	5,0 g
Extrato de levedura bacteriológica -----	3,0 mL
Ágar -----	15,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,0 - 7,2

9 – International Streptomyces Project 2 (Extrato de Malte Ágar)

Extrato de levedura -----	4,0 g
Extrato de malte -----	10,0 g
Dextrose -----	4,0 g
Ágar -----	20,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,3

10 – International Streptomyces Project 3 (Extrato de Aveia Ágar)

**** Filtrado de aveia ----- 1000 mL

***** Solução traço de sais ----- 1,0 mL

Ágar ----- 18,0 g

pH ----- 7,2

**** Para o preparo do filtrado deve-se adicionar 20,0 g de aveia em 1000 mL de água destilada. Após 20 minutos de fervura, o caldo deve ser filtrado em gaze estéril. O volume final deve ser ajustado para 1000 mL, por meio da adição de água destilada.

***** Solução traço de sais

FeSO₄.7H₂O ----- 0,1 g

MnCl₄.4H₂O ----- 0,1 g

ZnSO₄.7H₂O ----- 0,1 g

Água destilada ----- 100 mL

- A solução deve ser autoclavada durante 20 minutos a 121 °C e armazenada a 4°C.

11 – International Streptomyces Project 4 (Meio de Amido com Sais Inorgânicos)

Água destilada ----- 500 mL

K₂HPO₄ ----- 1,0 g

MgSO₄.7H₂O ----- 1,0 g

(HH4)₂SO₄ ----- 2,0 g

NaCl ----- 1,0 g

CaCO₃ ----- 2,0 g

***** Solução de amido ----- 500 mL

pH ----- 7,0 - 7,4

Agar ----- 20,0 g

***** Para o preparo da solução de amido deve-se adicionar 10 g de amido em 500 mL de água destilada. A solução deve ser homogeneizada por meio de aquecimento.

12 – International Streptomyces Project 5 (Meio Glicerol/Asparagina)

L- asparagina ----- 1,0 g

Glicerol ----- 10,0 g

KH₂PO₄ ----- 1,0 g

*** Solução traço de sais ----- 1,0 mL

Ágar ----- 15,0 g

Água destilada ----- 1000 mL

pH ----- 6,8±0,2

13 – International Streptomyces Project 6 (Extrato de Peptona Férrica)

Peptona bacteriológica férrica ágar -----	36,0 g
Extrato de levedura bacteriológica -----	1,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	7,0±0,2

14 – International Streptomyces Project 7 (Meio de Tirosina)

Glicerol -----	15,0 g
L-tirosina -----	0,5 g
L-asparagina -----	1,0 g
K ₂ HPO ₄ -----	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	0,5 g
NaCl -----	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O -----	0,01 g
Água destilada -----	1000 mL
*** Solução traço de sais -----	1,0 mL
Agar -----	20,0 g
pH -----	7,2 - 7,4

15 – International Streptomyces Project 9 (Meio Basal de Sais Minerais para degradação de carbono)

(NH ₄) ₂ SO ₄ -----	2,64 g
KH ₂ PO ₄ -----	2,38 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O -----	5,65 g
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	1,0 g
***** Solução traço de sais Pridham e Gottlieb -----	1,0 mL
Ágar -----	15,0 g
Água destilada -----	1000 mL
pH -----	6,8±7,0

***** Solução traço de sais Pridham e Gottlieb

CuSO ₄ .5H ₂ O -----	0,64 g
FeSO ₄ .7H ₂ O -----	0,11 g
MnCl ₂ .4H ₂ O -----	0,79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O -----	0,15 g
Água destilada -----	100 mL

- As fontes de carbono foram dissolvidas em água destilada e autoclavada separadamente. A solução deve ser incorporada ao meio de cultivo de forma a obter a concentração desejada.

16 – Solução Tampão (Avaliação de Tolerância a pH)

O tampão fosfato (0,2M) foi preparado nas concentrações de pH 4,0; 5,0; 9,0 e 10,0 a partir da combinação das soluções tamponantes A (0,2M Fosfato de Potássio Monobásico) e B (0,2M Fosfato de Potássio Dibásico) nas proporções: 199,7 : 0,3 ; 197,3 : 2,7 ; 1,4 : 198,6 e 0,1 : 199,9, respectivamente. As soluções devem ser autoclavada durante 20 minutos, a 121 °C. Cada solução suporta o seu volume equivalente de meio de cultivo, caso necessário o pH final deverá ser ajustado a partir de solução estéril de NaOH (1M) ou HCl (1M).

TODOS OS MEIOS DE CULTIVO DEVEM SER AUTOCLAVADOS DURANTE 20 MINUTOS, A 121 °C.

ANEXO B

Antonie van Leeuwenhoek (2013) 103:1235–1244
 DOI 10.1007/s10482-013-9901-9

ORIGINAL PAPER

Streptomyces araujoniae sp. nov.: an actinomycete isolated from a potato tubercle

Leonardo José da Silva · Rodrigo Gouvêa Taketani ·
 Itamar Soares de Melo · Michael Goodfellow ·
 Tiago Domingues Zucchi

Received: 26 November 2012 / Accepted: 5 March 2013 / Published online: 16 March 2013
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract The taxonomic position of a streptomycete isolated from a potato tubercle was determined by using a polyphasic approach. The organism had chemotaxonomic and morphological properties consistent with its classification in the genus *Streptomyces* and formed a distinct phyletic line in the *Streptomyces* 16S rRNA gene tree. It was found to be closely related to *Streptomyces celluloflavus* NRRL B-2493^T (99.4 % 16S rRNA gene similarity) and shared a 99.0 % 16S rRNA gene similarity value with *Streptomyces albolongus* NRRL B-3604^T and *Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T; low levels of DNA–DNA relatedness with these organisms showed that the isolate belonged to a distinct genomic species. The isolate was distinguished readily from the type strains of these species using a combination of morphological and other phenotypic properties. On the basis of these results, it is proposed that isolate ASBV-1^T (= CBMAI 1465^T = CCMA 894^T = NRRL B-24922^T) be classified as the type strain of *Streptomyces araujoniae* sp. nov.

Keywords *Streptomyces araujoniae* · Polyphasic taxonomy · Endophyte · Actinomycetes

Introduction

The genus *Streptomyces* encompasses over 600 species (Euzéby 2012) which fall into numerous multi- and single-membered subclades within the *Streptomyces* 16S rRNA gene tree (Labeda et al. 2012). Another remarkable feature of the genus is the ability of many constituent strains to produce bioactive compounds of biotechnological interest, such as antibiotics and antitumor agents (Kim et al. 2012a; Olano et al. 2009; Fiedler et al. 2005). Indeed, streptomycetes are a unique source of natural products being responsible for synthesizing nearly 40 % of all known bioactive compounds (Bérdy 2005; Goodfellow and Fiedler 2010). The extensive biosynthetic capabilities of streptomycetes have been exploited in biological control programmes designed to inhibit the growth of phytopathogenic fungi, although only two approved commercial products (Actinovate[®] and Mycostop[®]; Gardner and Fravel 2002) have been marketed to date.

The complex taxonomic relationships within the genus *Streptomyces* are being unraveled by the application of genotypic and phenotypic procedures (Kämpfer 2012; Labeda et al. 2012). This approach has also been found to be effective in the circumscription of

L. J. da Silva · R. G. Taketani · I. S. de Melo ·
 T. D. Zucchi (✉)
 Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA
 Meio Ambiente, Rod SP 340-Km 127, 5, PO Box 69,
 13820-000 Jaguariúna, Brazil
 e-mail: tiago_zucchi@hotmail.com

M. Goodfellow
 School of Biology, University of Newcastle, Newcastle
 upon Tyne NE1 7RU, UK

novel antibiotic-producing strains isolated from environmental sources (Kim et al. 2012a, b; Rong et al. 2009; Kumar and Goodfellow 2008).

In our continuing search for biocontrol agents, a putatively novel *Streptomyces* strain, isolate ASBV-1^T, was recovered from a potato tubercle. This isolate effectively inhibited the growth of *Aspergillus parasiticus* with a consequent decrease in aflatoxin contamination of peanut grains (Zucchi et al. 2008). The present investigation was designed to establish the taxonomic position of isolate ASBV-1^T using a polyphasic approach. The resultant data showed that the isolate merited recognition as a new *Streptomyces* species, for which the name *Streptomyces uraujoniae* sp. nov. is proposed.

Materials and methods

Organisms, maintenance and cultural conditions

Strain ASBV-1^T was isolated from a starch-casein agar plate (Küster and Williams 1964) which had been inoculated with a suspension of uncooked mashed potato tubercle (*Solanum tuberosum* L.) and incubated at 28 °C for 14 days. The strain was maintained on plates of potato-dextrose agar (Beever and Bollard 1970) at 4 °C and as suspensions of mycelial fragments in glycerol (20 %, v/v) at –80 °C. Biomass for the chemosystematic and molecular systematic studies was grown in shake flasks of glucose-yeast extract broth (GYE; Gordon and Mihm 1962) for 7 days at 28 °C, harvested by centrifugation and washed twice in distilled water; cells for the chemotaxonomic studies were freeze-dried. Biomass for the fatty acid analyses on the isolate and *Streptomyces albolongus* NRRL B-3604^T, *Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T and *Streptomyces celluloflavus* NRRL B-2493^T; were harvested from Trypticase Soy Broth (TSB; Difco) which had been incubated at 28 °C for 3 days.

Chemotaxonomy

The isolate was examined to establish whether it had a chemotaxonomic profile typical of *Streptomyces* strains. Standard procedures were used to determine the isomers of diaminopimelic acid (A₂pm; Staneck and Roberts 1974), muramic acid type (Uchida et al.

1999) and predominant menaquinones (Minnikin et al. 1984). Fatty acids of the isolate and the type strains of *S. albolongus*, *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* and *S. celluloflavus* were methylated, determined by gas chromatography (Hewlett Packard 6890) and analyzed using the standard Sherlock Microbial Identification (MIDI) system and the ACTINO version 5 database (Sasser 1990). The DNA base composition of the isolate was determined, in duplicate using three replicates, after Gonzalez and Saiz-Jimenez (2002).

Phylogeny

Genomic DNA was extracted from the isolate and PCR amplification and 16S rRNA gene sequencing achieved following the method of Kim et al. (1996). The almost complete 16S rRNA gene sequence [1,471 nucleotides (nt)] was aligned manually using MEGA version 5 software (Tamura et al. 2011) against corresponding sequences of closely related type strains of *Streptomyces* species retrieved from the GenBank database using the EzTaxon-e server (Kim et al. 2012). Phylogenetic trees were inferred by using the maximum-likelihood (Felsenstein 1981), maximum-parsimony (Fitch 1971) and neighbour-joining (Saitou and Nei 1987) tree-making algorithms drawn from the MEGA 5 and PHYML packages (Tamura et al. 2011; Guindon and Gascuel 2003); an evolutionary distance matrix for the neighbour-joining analysis was generated using the Jukes and Cantor (1969) model. The topologies of the evolutionary trees were evaluated by a bootstrap analysis (Felsenstein 1985) of the neighbour-joining method based on a 1,000 replicates using the MEGA 5 software. The root position of the neighbour-joining tree was inferred by using *Streptomyces albus* subsp. *albus* (GenBank Accession no. J6216022) and *Streptacidiphilus albus* (GenBank accession no. AF074415) as outgroups.

DNA–DNA pairing

DNA–DNA relatedness values (ΔT_m) between isolate ASBV-1^T and its nearest phylogenetic neighbours, were determined using a fluorimetric method (Gonzalez and Saiz-Jimenez 2005). The optimum temperature for renaturation (T_{or}) was calculated using $T_{or} = 0.51 (\%GC) + 47$. The melting temperatures (T_m) at which 50 % of the initial double stranded DNA denatured into single-stranded DNA for isolate

ASBV-1^T gDNA and the isolate ASBV-1^T/*S. albolongus* NRRL B-3604^T, isolate ASBV-1^T/*S. celluloflavus* NRRL B-2493^T and isolate ASBV-1^T/*S. cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T hybrid DNA preparations were compared and the differences (ΔT_m) calculated. All DNA–DNA hybridizations were conducted twice with three replicates.

Cultural, morphological and other phenotypic properties

The arrangement of hyphae and spores of the isolate were examined on oatmeal agar (International *Streptomyces* Project [ISP] medium 3; Shirling and Gottlieb 1966) which had been incubated at 28 °C for 2 weeks. Spore arrangement and spore ornamentation were observed by scanning gold-coated dehydrated specimens taken from the oatmeal agar plate using a scanning electron microscope (Cambridge Stereoscan 240 instrument), as described by O'Donnell et al. (1993). Cultural properties were determined using standard ISP media (Shirling and Gottlieb 1966) after incubation at 28 °C for 14 days. Strain ASBV-1^T and the type strains of *S. albolongus*, *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* and *S. celluloflavus* were examined for phenotypic properties known to be of value in streptomycete systematics (Kämpfer 2012). Additional tests (tolerance to temperature, pH and NaCl) were carried out on the isolate using GYEA as the basal medium, as described by Williams et al. (1983). Constituent enzymic activities of the isolate were determined using API ZYM strips (bioMérieux), according to the manufacturer's instructions. Dual culture tests against several phytopathogenic fungi were performed after Zucchi et al. (2010).

Results

16S rRNA gene sequencing and DNA–DNA relatedness studies

Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence of strain ASBV-1^T (GenBank accession number EU792889) revealed that the isolate ASBV-1^T formed a new phyletic line at the periphery of the *S. celluloflavus* 16S rRNA gene tree, a result supported by all of the tree-making algorithms and by a bootstrap value of 93 % (Fig. 1). The organism shares a 16S rRNA gene

similarity of 99.4 % with *S. celluloflavus* NRRL B-2493^T, a value which corresponds to 9 nt differences at 1,447 sites. The corresponding 16S rRNA gene similarity with *S. albolongus* NRRL B-3604^T and *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T was 99.0 % in each case, values equivalent to 14 and 15 nt differences at 1,457 and 1,458 locations, respectively. The ΔT_m values between genomic DNA of isolate ASBV-1^T and ASBV-1^T/*S. albolongus* NRRL B-3604^T hybrid DNA, ASBV-1^T/*S. cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T hybrid DNA and ASBV-1^T/*S. celluloflavus* NRRL B-2493^T hybrid DNA preparations were 5.3, 10.1 and 6.8 °C, respectively (Fig. 2), results equivalent to DNA–DNA related similarities of 63.5 ± 0.2 , 39.8 ± 1.5 and 55.8 ± 0.7 %, respectively, values below the 70 % cut-off point recommended for the circumscription of bacterial species (Wayne et al. 1987).

Chemotaxonomic, cultural, morphological and phenotypic characteristics

Isolate ASBV-1^T was found to contain major amounts of *LL*-diaminopimelic acid but lack characteristic sugars in whole-organism hydrolysates (wall chemotype I sensu Lechevalier and Lechevalier [1970]), to possess *N*-acetylated muramic acid, and octahydrogenated menaquinones with nine and eight isoprene units (MK-9 [H₈] and MK-8 [H₈]) as predominant isoprenologues in a ratio of 19:5; minor amounts of MK-10 (H₄) and MK-9 (H₂) were detected. The G + C contents of the DNA preparations of isolate ASBV-1^T, *S. albolongus* NRRL B-3604^T, *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T and *S. celluloflavus* NRRL B-2493^T were determined to be 79.6 ± 0.0 , 72.0 ± 0.2 , 71.4 ± 0.0 and 75.4 ± 0.1 %, respectively.

The fatty acid compositions of the isolate and its nearest phylogenetic neighbours are shown in Table 1. All of the strains were found to contain major proportions of C_{16:0} (13.4–31.4 %), C_{18:1} ω9c (15.5–37.3 %) and the summed features *anteiso*-C_{18:0}/C_{18:2} ω6,9c (15.2–26.2 %) though they can be distinguished from one another based on quantitative differences between these and other components. Isolate ASBV-1^T was noted to contain particularly high proportions of C_{16:0} (31.4 %) and C_{18:1} ω9c (37.3 %). None of the strains synthesized mycolic acids.

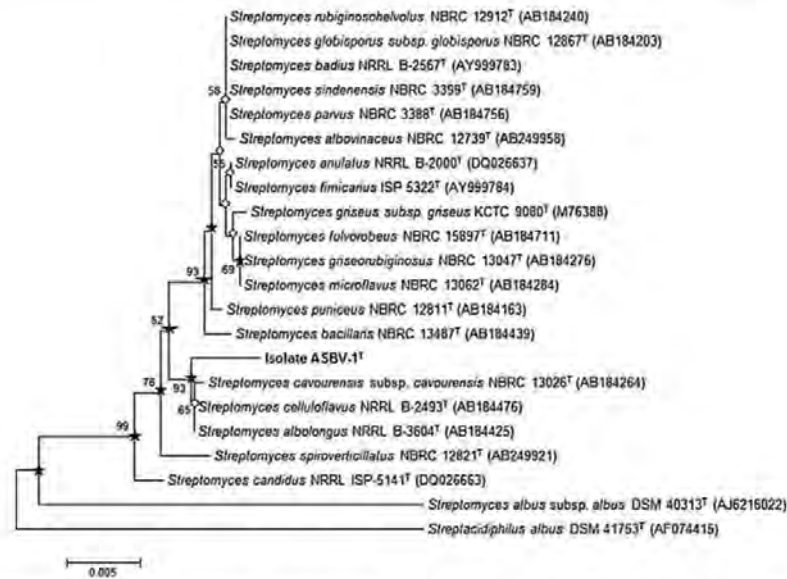
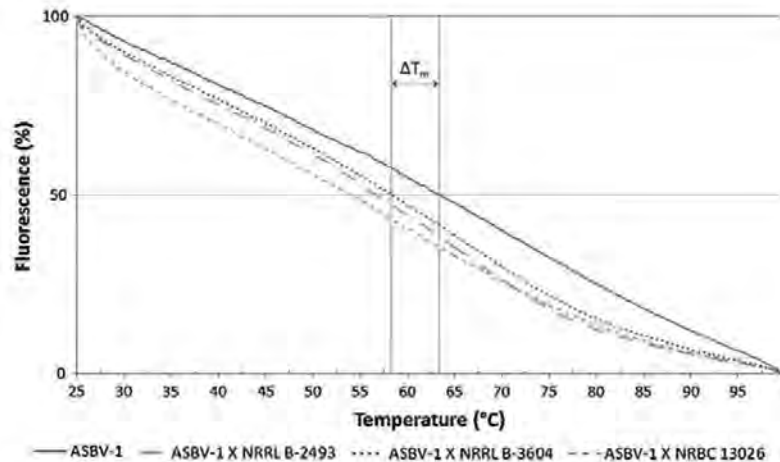


Fig. 1 Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (~1400 bp) showing relationships between isolate ASBV-1^T and the type strains of phylogenetically close *Streptomyces* species. Stars indicate branches of the tree that were recovered with the maximum-likelihood and maximum-parsimony tree-making algorithms; the white

diamond stands for a branch which was recovered using the maximum-parsimony tree-making algorithm. Numbers at the nodes are percentage bootstrap values based on a neighbour-joining analysis of 1,000 resampled datasets; only values above 50 % are given. Bar 0.005 substitutions per nucleotide position

Fig. 2 Thermal denaturation of genomic DNA from isolate ASBV-1^T (solid line) and hybrid DNA between the isolate and *S. celluloflavus* NRRL B-2493^T (dashed-dotted line), *S. albolongus* NRRL B-3604^T (dotted line) and *S. cavourensis* subsp. *cavourensis* NBRC 13026^T (dashed line)



Isolate ASBV-1^T was observed to form an extensively branched yellowish substrate mycelium which bore an abundant white aerial mycelium on oatmeal agar; aerial hyphae differentiated into straight to flexuous (*rectiflexibilis*) chains of smooth-surfaced

spores (Fig. 3). With a single exception (ISP 5), the isolate was observed to grow well on ISP media and was readily distinguishable from its nearest phylogenetic relatives on the basis of diffusible and substrate mycelial colours formed on peptone-yeast extract and

Table 1 Fatty acid composition (%) of isolate ASBV-1^T and the type strains of its closest phylogenetic neighbours

Fatty acids	Strains			
	Isolate ASBV-1 ^T	<i>S. albolongus</i> NRRL B-3604 ^T	<i>S. cavourensis</i> subsp. <i>cavourensi</i> NRBC 13026 ^T	<i>S. celluloflavus</i> NRRL B-2493 ^T
C _{10:0}	0.1	–	–	–
Iso-C _{12:0}	–	–	0.1	–
C _{12:0}	0.1	0.2	0.2	0.3
Iso-C _{13:0}	–	0.1	0.1	–
Anteiso-C _{13:0}	–	–	0.4	–
Iso-C _{14:0}	–	1.9	2.2	1.1
C _{14:0}	1.6	0.9	0.7	0.6
Iso-C _{15:0}	–	10.1	3.4	5.3
Anteiso-C _{15:0}	–	12.1	13.6	3.5
Iso-C _{16:1} H	–	0.8	0.5	–
C _{16:1} ω6c/C _{16:1} ω7c	6.7	1.7	1.3	3.3
Iso-C _{16:0}	–	13.5	8.8	4.2
Anteiso-C _{16:0}	–	–	0.2	–
C _{16:0}	31.4	13.4	14.3	18.3
Anteiso-C _{17:1} ω9c	–	0.8	1.2	–
C _{17:1} ω8c	0.4	–	–	–
Iso-C _{17:0}	–	2.6	1.2	2.7
Anteiso-C _{17:0}	–	4.8	4.3	1.8
Cyclo-C _{17:0}	–	4.1	1.3	2.5
C _{17:0}	0.2	–	–	–
Anteiso-C _{18:0} /C _{18:2} ω6,9c	17.6	15.2	24.0	26.2
C _{18:1} ω9c	37.3	15.5	20.5	25.5
C _{18:0}	4.7	0.5	0.6	1.1
C _{19:1} ω6c/cyclo-C _{19:0}	–	–	–	3.3
C _{20:1} ω9c	–	–	0.2	0.4

tyrosine agars (Table 2). The strain is susceptible to ($\mu\text{g ml}^{-1}$) kanamycin sulphate (10) and novobiocin (10), but not to rifampicin (10) or streptomycin sulphate (10).

Isolate ASBV-1^T can be distinguished readily from its nearest phylogenetic neighbours using a broad range of phenotypic properties (Table 3). It is, for instance, distinguished from *S. albolongus* NRRL B3604^T, its closest relative based on DNA–DNA relatedness data, by its ability to grow at 10 and 37 °C, to degrade uric acid, xanthine and xylan, to produce alkaline phosphatase, α -chymotrypsin, esterase (C4) and α - and β -glucosidases, and to use adonitol, dulcitol, *meso*-erythritol, *myo*-inositol, mannitol and sorbitol as sole carbon sources. Similarly, it can be separated from the type strains of *S. cavourensis*

subsp. *cavourensis* and *S. celluloflavus* by its ability to use adonitol and dulcitol as sole carbon sources and by its failure to degrade hypoxanthine and xanthine. Additional phenotypic properties of the isolate are given in the species description.

Discussion

The results of the present study confirm and extend those reported by Zucchi et al. (2008) in showing that the strain ASBV-1^T has morphological, chemotaxonomic and molecular genetic properties in line with its classification in the genus *Streptomyces* (Kämpfer 2012; Labeda et al. 2012). The isolate can be distinguished from the type strains of *S. albolongus*,



Fig. 3 Scanning electron micrograph of isolate ASBV-1^T showing spore arrangement and spore ornamentation following growth on oatmeal agar at 28 °C for 2 weeks

S. cavourensis subsp. *cavourensis* and *S. celluloflavus* using DNA–DNA relatedness, DNA base composition, 16S rRNA gene sequence, fatty acid and phenotypic data. It can also be concluded from the genotypic and phenotypic data that the isolate ASBV-1^T can be distinguished readily from other members of the *S. celluloflavus* 16S rRNA gene subclade. It is, therefore, proposed that the isolate ASBV-1^T be recognized as a new *Streptomyces* species bearing the name *Streptomyces araujoniae* sp. nov. The potential of ASBV-1^T as a biological control agent, firstly highlighted by its activity against an aflatoxigenic strain of *A. parasiticus* (Zucchi et al. 2008), was reinforced in the present study by its antagonism against other phytopathogenic fungi (Table 3). However, further studies under field conditions need to be conducted before this strain can be considered to be a potentially useful biocontrol agent.

Description of *Streptomyces araujoniae* sp. nov.

Streptomyces araujoniae (a.ra.u.jo.ni'ae. N.L. gen. fem. *araujoniae*, named after Janet Magali de Araújo in recognition of her contributions to the study of Brazilian actinomycetes).

Aerobic, Gram-positive, catalase-positive actinomycete that forms a branched substrate mycelium that bears white aerial hyphae which differentiate into straight to flexuous chains of smooth-surfaced spores (0.6–0.7 × 1.0–1.2 µm) on oatmeal agar. A yellow diffusible pigment is formed on peptone-yeast extract-iron agar. Grows from 10 to 37 °C and from pH 4.0 to 10.0, but not in the presence of 5.0 % (w/v) NaCl. Degrades gelatin, but not guanine, D-Fructose, D-galactose, glycerol, D-mannose and D-xylose (at 1.0 % w/v) are used as sole carbon sources for energy and growth, but not lactic acid (at 0.2 % w/v). Produces leucine arylamidase, but not trypsin, β-galactosidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-glucosaminidase or α-fucosidase (API ZYM tests). Inhibits the growth of a range of phytopathogenic fungi, including *A. parasiticus*. Additional properties are cited in the main text and in Tables 2 and 3. Chemotaxonomic properties are typical of the genus *Streptomyces*.

The type strain ASBV-1^T (= CBMAI 1465^T = CCMA 894^T = NRRL B-24922^T) was isolated from a potato tubercle. The species description is based on a single strain and hence serves as the description of the type strain. The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of *S. araujoniae* ASBV-1^T is EU792889.

Table 2 Growth and cultural characteristics of isolate ASBV-1^T and the type strains of the most closely related *Streptomyces* species following incubation at 28 °C for 14 days

Medium	Strains			
	Isolate ASBV-1 ^T	<i>S. albolongus</i> NRRL B-3604 ^T	<i>S. cavourensis</i> subsp. <i>cavourensis</i> NRBC 13026 ^T	<i>S. cellulosus</i> NRRL B-2493 ^T
Glucose-asparagine agar (ISP medium 5) ^a				
Growth	+	++	+	+
Aerial mycelium	White	White	White	White
Colour of substrate mycelium	Pale brown	White	Pale brown	White
Inorganic salts-starch agar (ISP medium 4) ^a				
Growth	+++	+++	++	+
Aerial mycelium	White	White	White	Absent
Colour of substrate mycelium	Pale brown	White	White	White
Oatmeal agar (ISP medium 3)				
Growth	++	+	+++	++
Aerial mycelium	White/ greenish	Absent	White	White
Colour of substrate mycelium	Yellowish	Grayish yellow	Yellow	Light brown
Peptone-yeast extract agar (ISP medium 6)				
Growth	+++	++	++	++
Aerial mycelium	White	Dark gray	White	Absent
Colour of substrate mycelium	Dark yellow	Pale yellow	Dark brown	Dark brown
Diffusible pigment	Yellow	Light yellow	Brown	Dark brown
Tryptic-yeast extract-iron agar (ISP medium 1)				
Growth	+++	+++	+++	+++
Aerial mycelium	White	Gray	White	None
Colour of substrate mycelium	Pale yellow	Pale brown	Pale brown	Whitish
Diffusible pigment	None	Brown	Brown	None
Tyrosine agar (ISP medium 7)				
Growth	+++	+++	+++	+++
Aerial mycelium	White	White	White	White
Colour of substrate mycelium	Light gray	Pale brown	Pale brown	Pale brown
Diffusible pigment	None	Light brown	Light brown	None
Yeast extract-malt extract agar (ISP medium 2)				
Growth	+++	+++	+++	++
Aerial mycelium	White	White	Light brown	Light orange
Colour of substrate mycelium	Light yellow	Light yellow	Light brown	Light orange
Diffusible pigment	None	None	Light brown	Light brown

Key: +++, abundant growth; ++, moderate growth; +, poor growth

^a None of the strains formed diffusible pigments on these media

Table 3 Phenotypic properties that distinguish between isolate ASBV-1^T and the type strains of closely related *Streptomyces* species

Characteristics	Strains			
	Isolate ASBV-1 ^T	<i>S. albolongus</i> NRRL B-3604 ^T	<i>S. cavourensis</i> subsp. <i>cavourensis</i> NRRL-B-3493 ^T	<i>S. celluloflavus</i> NRRL B-2604 ^T
Antagonism to:				
<i>Botrytis cinerea</i> CCMA 1122	+	+	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i> CCMA 1121	+	+	+	-
<i>Pythium dissotocum</i> CCMA1206	+	+	+	-
<i>Rhizoctonia solani</i> CCMA 901	+	-	+	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> CCMA 1105	+	+	-	+
<i>Sclerotium rolfsii</i> CCMA 352	-	+	+	-
API ZYM tests at 0.1 %, w/v:				
Acid phosphatase	+	+	-	+
Alkaline phosphatase	+	-	+	+
α -Chymotrypsin	+	-	+	-
Cystine arylamidase	+	+	+	-
Esterase (C4)	+	-	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+	-	+
α -Glucosidase	+	-	+	-
α -Glucosidase	+	-	+	-
α -Mannosidase	-	-	-	+
Naphthol-AS-B1-phosphohydrolase	-	+	-	+
Valine arylamidase	+	+	+	-
Degradation of:				
Casein	+	+	+	-
Chitin	+	+	+	-
Hypoxanthine	-	-	+	+
Pectin	+	+	+	-
Starch	+	+	+	-
Tributyrin	-	-	+	-
Tween 20	-	+	-	-
Tween 40	-	+	-	-
Tween 60	-	+	-	-
Tween 80	-	+	-	-
Uric acid	+	-	+	-
Xanthine	+	-	+	+
Xylan	+	-	+	+
Growth on sole carbon sources at 1 % w/v:				
Adonitol	+	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	-
Dextrin	+	+	+	-
Dulcitol	+	-	-	-
meso-Erythritol	+	-	-	+
Glycogen	+	+	+	-

Table 3 continued

Characteristics	Strains			
	Isolate ASBV-1 ^T	<i>S. albolongus</i> NRRL B-3604 ^T	<i>S. cavourensis</i> subsp. <i>cavourensis</i> NRRL-B-3493 ^T	<i>S. celluloflavus</i> NRRL B-2604 ^T
<i>myo</i> -Inositol	+	–	+	+
Lactose	+	+	+	–
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	+	–	+	–
Sorbitol	+	–	+	–
Growth at				
3.0 % NaCl (w/v)	+	+	–	+
10 °C	+	–	+	–
37 °C	+	–	+	–

Acknowledgments The authors are indebted to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for providing a fellowship to LJS and to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for providing fellowships to TDZ (Grant 11/14333-6) and RGT (Grant 10/50799-7). TDZ is also grateful to FAPESP for providing the funding for developing this research (grant 11/50243-1).

References

- Beever RE, Bollard EG (1970) Nature of stimulation of fungal growth by potato extract. *J Gen Microbiol* 60:273–279
- Bérdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58:1–26
- Euzéby JP (2012) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Last full update: <http://www.bacterio.cict.fr/5> Oct 2012
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fiedler H-P, Brumtner C, Bull AT, Ward AC, Goodfellow M, Potterat O, Puder C, Mihm G (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:37–42
- Fitch WM (1971) Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20:406–416
- Gardner BBM, Fravel DR (2002) Biological control of plant pathogens: research, commercialization and application in the USA. *Plant Health Progress* <http://naldc.nal.usda.gov/download/12141/PDF>. Published: 10 May 2002; Accessed 12 Oct 2012
- Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C (2002) A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environ Microbiol* 4:770–773
- Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C (2005) A simple fluorimetric method for the estimation of DNA–DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles* 9:75–79
- Goodfellow M, Fiedler H-P (2010) A guide to successful bio-prospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:119–142
- Gordon RE, Mihm JM (1962) Type species of genus *Nocardia*. *J Gen Microbiol* 27:1–10
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biology* 52:696–704
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*, vol 3. Academic Press, New York, pp 21–123
- Kämpfer P (2012) Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339 emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J et al. (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Part B, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp 1455–1767
- Kim D, Chun J, Sahin N, Hah YC, Goodfellow M (1996) Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S rRNA ribosomal DNA sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol* 46:581–587
- Kim BY, Zucchi TD, Fiedler HP, Goodfellow M (2012a) *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:279–283
- Kim BY, Zucchi TD, Fiedler HP, Goodfellow M (2012b) *Streptomyces staurisporinus* sp. nov., a staurosporine-producing actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:966–970
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012c) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721
- Kumar Y, Goodfellow M (2008) Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp.

- nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1369–1378
- Küster E, Williams ST (1964) Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 202:928–929
- Labeda DP, Goodfellow M, Brown R, Ward AC, Lanoot B, Vannanneyt M, Swings J, Kim SB, Liu Z, Chun J, Tamura T, Oguchi A, Kikuchi T, Kikuchi H, Nishii T, Tsuji K, Yamaguchi Y, Tase A, Takahashi M, Sakane T, Suzuki KI, Hatano K (2012) Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101:73–104
- Lechevalier MP, Lechevalier H (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* 20:435–443
- Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH (1984) An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Meth* 2:233–241
- O'Donnell AG, Falconer C, Goodfellow M, Ward AC, Williams E (1993) Biosystematics and diversity amongst novel carboxydophilic actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:325–340
- Olano C, Mendez C, Salas JA (2009) Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Marine Drugs* 7:210–248
- Rong XY, Guo YP, Huang Y (2009) Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solivificans*. *Syst Appl Microbiol* 32:314–322
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:404–425
- Sasser M (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. MIDI Inc., Newark
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 16: 313–340
- Staneck JL, Roberts GD (1974) Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* 28:226–231
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Uchida K, Kudo T, Suzuki K, Nakase T (1999) A new rapid method of glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. *J Gen Appl Microbiol* 45:49–56
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG (1987) Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463–464
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* 129: 1743–1813
- Zucchi TD, Moraes LA, Melo IS (2008) *Streptomyces* sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. *J Appl Microbiol* 105:2153–2160
- Zucchi TD, Almeida LG, Dossi FCA, Cônsoli FL (2010) Secondary metabolites produced by *Propionicimonas* sp. (ENT 18) induce histological abnormalities in the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biocontrol* 55:811–819