



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA DE MOURA ALVES

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE *Streptomyces* sp.
ASSOCIATIVOS DE *Baccharis trimera* (CARQUEJA)**

LUANA DE MOURA ALVES

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE *Streptomyces sp.* ASSOCIATIVOS DE
Baccharis trimera (CARQUEJA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues

Londrina
2019

LUANA DE MOURA ALVES

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE *Streptomyces sp.* ASSOCIATIVOS DE
Baccharis trimera (CARQUEJA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Jesiane Stefânia da Silva Batista
Universidade Estadual de Ponta Grossa -
UEPG

Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas Boas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2019.

À minha avó, meus pais e a todos os meus familiares pelo apoio, base, incentivo, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pelo suporte fornecido ao desenvolvimento deste trabalho e ao corpo docente e funcionários que sempre se mostraram dispostos a ensinar e auxiliar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço a CAPES e CNPq suporte financeiro ao projeto “Microrganismos promotores do crescimento de plantas visando à sustentabilidade agrícola e à responsabilidade ambiental” e pela concessão de bolsa de estudos.

À minha orientadora Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues por ter me aceitado como aluna, à sua excelente orientação, as diretrizes, aos ensinamentos transmitidos, pelo cuidado e amizade, tornando-se um exemplo pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

À banca examinadora de qualificação e defesa, pela disponibilidade e pelas sugestões feitas.

Ao Professor Dr. André Luiz M. de Oliveira, pela disponibilidade do seu tempo e conhecimentos. Às Professoras Dra. Claudete Ruas e Dra. Silvia Helena Sofia, pela disponibilidade de seus laboratórios e de seus alunos, que estavam sempre dispostos a ajudar, contribuindo para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amados pais, Douglas e Celina, e aos meus irmãos, Pedro e Debora, por todo amor, carinho e apoio para que eu realize meus planos e sonhos. E a toda minha família pela colaboração, apoio, ajuda e paciência que tiveram ao longo desta fase da minha vida.

Ao técnico Ideval Souza e as alunas de iniciação científica Giovana, Jéssica, Ariane e Emanuely pela colaboração com este trabalho. Aos meus amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) Jéssica, Amanda, Giovana, Douglas, Cátia, Ilmara, Ana Camila e Gilberto pelo auxílio nas atividades laboratoriais, mas principalmente pela amizade, companheirismo e momentos vividos juntos.

Ao meu saudoso amigo Matheus Cury. Aos meus amigos de São Paulo e os conquistados neste período em Londrina que tornam minha vida mais leve e feliz.

À Deus que me dá capacidade de crer, de sonhar, de empreender e de realizar.
Minha eterna gratidão.

“O mundo pode fazer tudo por você.
Menos a sua parte.”

Caio Carneiro

ALVES, Luana Moura. **Taxonomia polifásica de *Streptomyces* sp. associativos de *Baccharis trimera* (Carqueja)**. 2019. 128 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Streptomyces são bactérias gram-positivas, pertencentes ao filo Actinobacteria, que se destacam de outros gêneros bacterianos por seu desenvolvimento singular, formando micélios de substrato e aéreos de pseudohifas filamentosas, capazes de se diferenciar em esporos reprodutivos. É o gênero bacteriano de maior relevância biotecnológica, devido a sua capacidade de produzir diversos metabólitos secundários de interesse comercial e industrial, sendo mais de 75% dos antibióticos conhecidos isolados de representantes de *Streptomyces*. Capazes de colonizar diversos habitats, os *Streptomyces* são encontrados em associações íntimas com plantas nas regiões de rizosfera e no interior dos tecidos vegetais (endosfera). As plantas constituem uma enorme fonte de diversidade de microrganismos endofíticos e associativos, incluindo aquelas do gênero *Streptomyces*. *Baccharis trimera* é uma planta medicinal comumente utilizada para tratamento de doenças hepáticas e digestivas e com grande importância comercial e médica. Assim como observado com a grande maioria das plantas medicinais e nativas da flora brasileira, que consistem em habitats ainda inexplorados, apesar de sua importância, a microbiota associada a *Baccharis trimera* é ainda pouco conhecida. O presente estudo teve por objetivo realizar a taxonomia polifásica de isolados de *Streptomyces* obtidos de associações com *Baccharis trimera*. Foram analisados 16 isolados obtidos do solo, da rizosfera e endofíticos de *Baccharis trimera*, coletado de duas regiões do Paraná, Ponta Grossa e Ortigueira. Os isolados foram analisados por metodologias moleculares (sequenciamento do gene 16S rRNA e análise de sequência multilocus (MLSA) de 5 genes *housekeeping*), por análises morfológicas e bioquímicas. Os isolados apresentaram alta variabilidade com relação à micromorfologia e coloração de esporos, à produção de pigmentos, bem como na utilização das diferentes fontes de carbono testadas. Estes resultados correlacionados com as análises moleculares exibiram a alta diversidade de espécies entre os isolados. No total, 3 (18,75%) dos isolados foram identificados como pertencentes a espécies de *Streptomyces* já descritas, BTM036 e BTM412 representantes de *S. recifencis* e BTM281 da espécie *S. goshikiensis*, 1 (6,25%) produziu dados inconclusivos para a classificação (BTM304 com a espécie *S. prunicolor*). Considerando os valores de corte de similaridade de sequências, >98,5% para o gene 16S rRNA e ≥99,3% de MLSA, os outros 12 (75%) podem ser classificados como candidatos a novas espécies bacterianas do gênero *Streptomyces*. Os resultados confirmam que a planta medicinal *Baccharis trimera* representa um reservatório extremamente rico para o isolamento de uma diversidade significativa de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, incluindo novas espécies, que são fontes potenciais para a descoberta de compostos biologicamente ativos.

Palavras-chave: Planta medicinal. MLSA. Taxonomia polifásica.

ALVES, Luana Moura. **Polyphasic Taxonomy of *Streptomyces* sp. associations of *Baccharis trimera* (Carqueja)**. 2019. 128 p. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Streptomyces are gram-positive bacteria, belonging to the phylum Actinobacteria, which stand out from other bacterial genera for their unique development, forming substrate mycelia and aerial filamentous pseudohifas, able to differentiate into reproductive spores. It is the most important bacterial genus due to its ability to produce several secondary metabolites of commercial and industrial interest, with more than 75% of the known antibiotics being isolated from *Streptomyces* representatives. Capable of colonizing diverse habitats, *Streptomyces* are found in intimate associations with plants in the rhizosphere regions and inside plant tissues (endosphere). Plants constitute a huge source of diversity of endophytic and associative microorganisms, including those of the genus *Streptomyces*. *Baccharis trimera* is a medicinal plant commonly used for treatment of liver and digestive diseases and of great commercial and medical importance. As observed with the great majority of medicinal and native plants of the Brazilian flora, which consist of habitats still unexplored, despite its importance, the microbiota associated with *Baccharis trimera* is still little known. The present study aimed to perform the polyphase taxonomy of *Streptomyces* isolates obtained from associations with *Baccharis trimera*. Sixteen isolates obtained from the soil, rhizosphere and endophytic of *Baccharis trimera* collected from two regions of Paraná, Ponta Grossa and Ortigueira were analyzed. The isolates were analyzed by molecular methodologies (16S rRNA gene sequencing and multilocus sequence analysis (MLSA) of 5 housekeeping genes) by morphological and biochemical analyzes. The isolates presented high variability in relation to the micromorphology and spore staining, the pigment production, as well as in the use of the different carbon sources tested. These results correlated with the molecular analyzes showed the high species diversity among the isolates. In total, 3 (18.75%) of the isolates were identified as belonging to previously described *Streptomyces* species, BTM036 and BTM412 representatives of *S. recifencis* and BTM281 of *S. goshikiensis* species, 1 (6.25%) produced inconclusive data for classification (BTM304 with *S. prunicolor*). Considering cut-off values of sequence similarity > 98.5% for the 16S rRNA gene and ≥99.3% MLSA, the other 12 (75%) can be classified as candidates for new bacterial species of the genus *Streptomyces*. The results confirm that the medicinal plant *Baccharis trimera* represents an extremely rich reservoir for the isolation of a significant diversity of actinobacteria of the genus *Streptomyces*, including new species, that are potential sources for the discovery of biologically active compounds.

Key words: Medicinal plant. MLSA. Polyphasic taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Esquema representativo do ciclo de vida de *Streptomyces* sp13
- Figura 2** - Interações planta-bactéria em processos de colonização radicular16
- Figura 3** - Plantas de *Baccharis trimera* em estágio vegetativo (A) e reprodutivo (B), ramo de inflorescência (C) e detalhe dos frutos aquênios (D).....20
- Figura 4** - Diferentes morfologias de colônias observadas em estirpes de *Streptomyces* sp24

ARTIGO

- Figura 1** - Variedade de arranjos de esporos observados em *Streptomyces*...48
- Figura 2** - Representação da distribuição do inóculo de *Streptomyces* sp. para o teste de utilização de fontes de carbono49
- Figura 3** - Placas do isolado BTM467, com 7 dias de crescimento. A - controle negativo meio básico, B - controle negativo ágar-água, C - controle positivo (meio básico com glicose) e D - meio básico com rafinose positiva. Observa-se variação na coloração da cadeia de esporos, branco no meio básico com glicose e roxa no meio com rafinose50
- Figura 4** - Placas do isolado BTM471, com 7 dias de crescimento. A - controle negativo meio básico, B - controle negativo ágar-água, C - controle positivo (meio básico com glicose) e D - meio básico com frutose com crescimento intermediário50
- Figura 5** - Placas do isolado BTM300, 7 dias de crescimento. A - controle negativos meio básico, B - controle negativo ágar-água, C - controle positivo (meio básico com glicose) e D - meio básico com arabinose sem crescimento (negativo)51
- Figura 6** - Árvore filogenética do gene 16S rRNA.....63
- Figura 7** - Árvore filogenética da análise de sequências multilocus (MLSA) de 5 genes *housekeeping* (*recA*, *trpB*, *rpoB*, *gyrB* e *atpD*) de isolados de *Streptomyces* sp. e espécies-tipo relacionadas72

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Tabela 1 -	Isolados de <i>Streptomyces</i> sp. utilizados neste estudo.....	46
Tabela 2 -	Primers utilizados nas reações de amplificação por e no sequenciamento dos genes 16S e genes <i>housekeeping</i>	56
Tabela 3 -	Caracterização morfológica dos isolados de <i>Streptomyces</i> sp.....	58
Tabela 4 -	Utilização de diferentes fontes de carbono por isolados de <i>Streptomyces</i> sp.....	59
Tabela 5 -	Tamanho das sequências dos genes obtidos do sequenciamento de cada isolado.....	62
Tabela 6 -	Matriz de similaridade de sequências (%) do gene 16S rRNA dos isolados de <i>Streptomyces</i> sp. e de espécies-tipo relacionadas.....	67
Tabela 7 -	Relações filogenéticas entre os isolados de <i>Streptomyces</i> sp. e as espécies-tipo mais próximas.....	75

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1	Gênero <i>Streptomyces</i> sp	12
1.2	Actinobactérias associadas a plantas medicinais.....	15
1.3	<i>Baccharis trimera</i>	18
1.4	Taxonomia de <i>Streptomyces</i> sp.....	21
1.4.1	Caracterização fenotípica	22
1.4.2	Caracterização por sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal	25
1.4.3	Hibridização DNA-DNA.....	27
1.4.4	Análise de sequências multilocus (MLSA).....	28
1.5	Descrição de novas espécies bacterianas	31
	REFERÊNCIAS	34
2	OBJETIVO	40
2.1	Objetivo geral.....	40
2.2	Objetivos específicos.....	40
3	ARTIGO.....	41
3.1	INTRODUÇÃO	42
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.2.1	Estirpes Utilizadas e Condições de Cultivo	46
3.2.2	Caracterização Fenotípica	47
3.2.3	Caracterização Bioquímica.....	48
3.2.4	Caracterização Genotípica.....	51
3.3	RESULTADOS.....	57
3.3.1	Caracterização morfológica.....	57
3.3.2	Teste da Utilização de Fontes de Carbono.....	59
3.3.3	Análise do gene 16S rRNA.....	61
3.3.4	Análise de Sequências Multilocus (MLSA).....	70
3.4	Discussão.....	76
3.5	Conclusão	81

4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS	91
ANEXO 1 -	Códigos de acesso das sequências das espécies-tipo selecionadas, no banco de dados Genbank	92
ANEXO 2 -	Análises morfológicas dos isolados de <i>Streptomyces</i>	95
ANEXO 3 -	Árvore filogenética do gene 16S rRNA com 128 espécies-tipo de <i>Streptomyces</i> sp.....	111
ANEXO 4 -	Árvores filogenéticas dos genes <i>housekeeping atpD</i> , <i>rpoB</i> , <i>recA</i> , <i>trpB</i> e <i>gyrB</i>	115
ANEXO 5 -	Matriz de identidade de sequências (%) da análise MLSA de 5 genes <i>housekeeping (atpD, rpoB, recA, trpB e gyrB)</i> dos isolados BTM e 61 espécies-tipo de <i>Streptomyces</i> sp. mais relacionadas.....	125
ANEXO 6 -	Árvore filogenética a partir da concatenação do gene 16S rRNA e genes <i>housekeeping (recA, trpB, gyrB, rpoB e atpD)</i>	127

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Gênero *Streptomyces* sp.

O gênero *Streptomyces* representa um dos maiores táxons, em termos de número e variedade de espécies, dentro do filo Actinobacteria. Estas bactérias caracterizam-se por serem aeróbias, gram-positivas e pelo alto conteúdo de guanina e citosina em seu genoma, e diferenciam-se de outros gram-positivos por formarem filamentos que se alongam a partir de sua porção terminal, formando uma hifa ramificada capaz de se diferenciar em esporos, essenciais para a sobrevivência e dispersão das colônias (BARKA et al., 2015). Amplamente distribuídos na natureza, os membros do gênero *Streptomyces* apresentam uma diversidade metabólica única e um grande potencial para produção de compostos bioativos de importância, tanto biotecnológica quanto clínica e desempenham um importante papel na decomposição e ciclagem de nutrientes na natureza (LABEDA et al., 2012).

As espécies de *Streptomyces* são geralmente saprofíticas, habitantes do solo conhecidas pelo odor de “terra molhada” atribuída à produção da substância chamada geosminas em seu metabolismo (CHATER, 2010). A maioria dos solos contém cerca de 10^4 a 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC/g) desses microrganismos, geralmente, representando de 1,0 a 20,0% do total de células viáveis dos solos e até 40% em condições de secas ou solos alcalinos (ALBERTON, 2006, VETSIGIAN; JAJOO; KISHONY, 2011). Devido a sua morfologia filamentosa e ramificada, estas bactérias auxiliam na manutenção da estrutura física do solo, evitando assim erosões (VETSIGIAN; JAJOO; KISHONY, 2011). Além do solo, as espécies de *Streptomyces* são habitantes comuns em uma variedade de outros ambientes e podem viver em associações com diversas espécies de plantas e animais, como por exemplo as espécies *S. rhizophilus*, *S. gramineus*, encontradas na rizosfera da planta *Sasa borealis* (bambu de folha larga) (LEE; HAN; WHANG, 2011, ZHOU et al., 2019), e *S. hyaluromycini* e *S. spongiicola*, que são associativas de *Molgula manhattensis* (conhecido como “uva do mar”) e esponjas marinhas, respectivamente (KHUCHAROENPHAISAN; SRIPAIRAJ; SINMA, 2012, HARUNARI et al., 2015). *Streptomyces* também são comumente encontradas

em ambientes aquáticos, como por exemplo as espécies *S. nanhaiensis* e *S. verrucosissporus* encontradas em sedimentos do fundo do mar da China e da Tailândia, respectivamente (TIAN et al., 2011, PHONGSOPITANUN et al., 2016). Neste grupo estão incluídas espécies alcalotolerantes (*S. albidoflavus*), acidófilas (*S. acidiscabies*), halofíticas (*S. parvulus*), termotolerantes (*S. clavuligerus*) e até mesmo, espécies fitopatogênicas, como *S. scabies*, *S. luridiscabiei* e *S. puniscabiei* causadoras da sarna comum em batatas (*Solanum tuberosum*) (LAMBERT, 1989, PARK et al., 2003, LORIA; KERS; JOSHI, 2006, MADIGAN et al, 2016).

O gênero *Streptomyces* foi introduzido em 1943, por Henrici e Waksman e pertence à família Streptomycetaceae e à ordem Actinomycetales (ANDERSON; WELLINGTON, 2001). Estes microrganismos possuem um complexo desenvolvimento ao longo do seu ciclo de vida, com diferenciações morfológicas e fisiológicas que são dependentes tanto do conteúdo genômico, quanto do ambiente onde se desenvolve. Em meios de culturas líquidos apresentam crescimento formando colônias grumosas, que esporulam na região de superfície do meio. O complexo desenvolvimento de *Streptomyces*, contudo, observado pelo seu desenvolvimento em substrato sólido, os esporos germinam produzindo uma matriz de hifas ramificadas, formando um micélio vegetativo no interior do meio de cultura e um micélio aéreo que se projeta para o exterior do meio (FIGURA 1). Com o envelhecimento da colônia, as hifas aéreas se desenvolvem em longas cadeias de esporos (CHATER, 2006; CLAESSEN et al., 2006). As diferentes formas e arranjos dos filamentos aéreos, pseudohifas, e suas diferenciações para a formação de esporos são características fundamentais utilizadas na classificação das várias espécies de *Streptomyces* (BARKA et al, 2015).

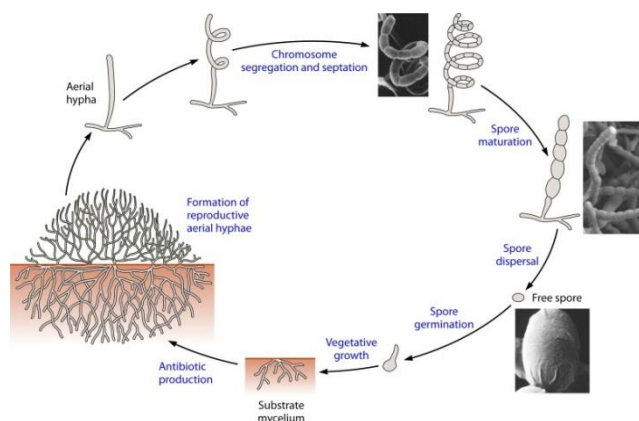


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo de vida de *Streptomyces* sp. (BARKA et al., 2015)

Os *Streptomyces* apresentam um cromossomo único linear, com tamanho que varia em média 8 - 9 Mb conforme a espécie. Os materiais genéticos contem na região central cerca de 4,5 a 6,5 Mb constituída dos genes *housekeeping*, os quais são necessários para o crescimento e metabolismo primário da bactéria. As regiões teloméricas possuem sequências terminais repetitivas invertidas (TRIs) associadas com proteínas que se ligam covalentemente nas regiões 5' terminal e conferem proteção contra enzimas nucleases (IKEDA et al., 2003, CHATER et al., 2010). Estas regiões TRIs dos cromossomos de *Streptomyces* variam amplamente de tamanho, de 24 a 550 kb, entretanto estudos com as espécies *S. lividans*, *S. argenteolus*, *S. clavuligerus*, *S. hydrogenans* e *S. rimosus* demonstraram que as sequências de nucleotídeos em suas porções mais distais são altamente conservadas, constituindo palíndromos de 13 a 25 pb, que se repetem nos genomas das diferentes espécies nos primeiros 166-168 nucleotídeos (HUANG et al., 1998). No geral, 5% do genoma de *Streptomyces* está relacionado com a biossíntese de metabólitos secundários, sendo estes genes localizados principalmente nas regiões dos telômeros. As proteínas codificadas por estes genes estão relacionadas às funções de sínteses de antibióticos, transporte, secreção, diferenciação celular e regulação (LEBLOND et al., 1996, IKEDA et al., 2003, PAN, CHEN E HUANG, 2018).

Um dos principais fatores que estimulam o estudo destas bactérias é a enorme habilidade que as espécies deste gênero possuem para produzir metabólitos secundários bioativos, sendo uma excelente fonte de novos compostos a ser explorada. Os membros do gênero *Streptomyces* são fonte de, aproximadamente, 75% dos antibióticos conhecidos, dentre as diversas classes de antibióticos sintetizados estão os polipeptídeos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, cefalosporina, penicilinas, quinolonas, tetraciclina e sulfonamidas. *Streptomyces* são produtores também de compostos com ações antifúngicas, parasiticidas, herbicidas, enzimas e outras substâncias ativas de interesse farmacológico, incluindo agentes antitumorais e imunossupressores (SALAMONI, 2009, PROCÓPIO et al., 2012).

O potencial biotecnológico das *Streptomyces* é de interesse também em outras áreas, como a agroindústria e setores ambientais. Por serem capazes de formar associações mais íntimas com as plantas e colonizar seus tecidos

internos, pesquisas mais recentes tem buscado estirpes e espécies de *Streptomyces* que possam beneficiar o desenvolvimento e produtividade das plantas agrícolas. Estes setores buscam por espécies de *Streptomyces* que possam ser aplicadas como bioinoculantes ou utilizadas na obtenção de seus metabólitos secundários e, deste modo, beneficiar o desenvolvimento e produtividade das plantas (CAO et al., 2004, VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFANI, 2018). Entre as atividades benéficas encontradas entre associações com *Streptomyces* para a promoção do crescimento vegetal e proteção da planta contra fitopatogenos estão incluídas, principalmente, a liberação de antimicrobianos, além de outros compostos como a capacidade de produzir ácido indol-3-acético (AIA), como fixadora de nitrogênio, solubilizar fosfato e capacidade de produção de sideróforos (quelantes de ferro). Bem como a produção de compostos orgânicos voláteis, biodegradação de celulose e lignina, e a biorremediação do solo, por exemplo compostos aromáticos recalitrantes, importantes para a recuperação de áreas ambientais (CHATER, 2006, VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFANI, 2018).

1.2 Actinobactérias associadas a plantas medicinais

Uma grande diversidade de fungos e bactérias são capazes de se colonizar diferentes tecidos das plantas, sendo seu conjunto, denominado microbiota vegetal. Estes microrganismos associativos colonizam todos os tecidos da planta e podem relacionar-se com o hospedeiro em diversos níveis de interação e influenciar direta ou indiretamente no seu desenvolvimento, como estimular a germinação e o crescimento, ajudar as plantas a combater doenças, promover a resistência ao estresse e influenciar na sanidade das plantas (BRAGINA et al., 2013; KÖBERL, 2015).

As bactérias podem se associar as plantas de diferentes formas habitando tanto a superfície externa do vegetal (rizoplano e filoplano), bactérias denominadas epifíticas, quanto o interior dos tecidos das plantas (endosfera), onde predominam bactérias endofíticas. Estudos têm mostrado que bactérias epifíticas, após a colonização do solo rizosférico, podem ser detectadas dentro do endosfera, em caules, folhas e também dentro de órgãos reprodutivos de diferentes plantas hospedeiras, adaptando-se como endofíticas (BRADER et

As plantas medicinais são fontes ricas de compostos bioativos, sendo as pesquisas com estas plantas concentradas por muito tempo no estudo fitoquímico. Recentemente, ampliou-se o foco dos estudos para a análise da microbiota de plantas medicinais, especialmente a comunidade complexa de bactérias e fungo endofíticos, que como consequência da associação de longo prazo com as plantas podem participar de vias metabólicas, direta ou indiretamente, ativar e aumentar sua própria bioatividade natural ou podem obter por trocas de informações genéticas capacidade para produzir compostos biologicamente ativos específicos, semelhantes à planta hospedeira (QIN et al., 2009; KUMAR et al., 2013). Estudos recentes realizados por Egamberdieva (2017) com plantas medicinais, *Hypericum perforatum* e *Ziziphora capitata*, verificaram a ação antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicas de extratos obtidos de bactérias endofíticas.

As actinobactérias destacam-se pôr a sua capacidade de produção de metabólitos secundários bioativos; as associações destas bactérias com as plantas, as possibilitam de usufruir destes compostos, destacando-se os metabólitos capazes de serem usados no antagonismo direto contra pragas e doenças. As actinobactérias endofíticas têm sido isoladas de uma variedade de tipos de plantas, incluindo de culturas agrícolas como trigo, arroz, tomate, milho, feijão, entre outras, e de uma variedade de plantas medicinais, como *Aloe vera* (babosa) e *Curcuma phaeocaulis* (açafraão-da-terra) (QIN et al., 2009, BIAN et al., 2012, NAFIS et al., 2018).

Atualmente, há o interesse de pesquisadores na compreensão da interação e comunicação que ocorre entre a microbiota e as plantas medicinais, sabendo-se das aplicações fitoterápicas das plantas, da capacidade metabólica das actinobactérias e das possibilidades de relações e interações entre ambas. Um número crescente de estudos tem sido publicado com diferentes espécies de plantas medicinais, sendo em muitos casos realizado o isolamento de novas actinobactérias e a avaliação da capacidade metabólica e possíveis aplicações biotecnológicas dos isolados. Wang e colaboradores (2008) estudaram a diversidade de bactérias associadas à planta medicinal *Mallotus nudiflorus*, (aplicada na medicina popular indiana, conhecida como tumari) e concluíram que cerca 38% dos isolados endofíticos eram actinobactérias, sendo o grupo de maior representatividade. Khamna (2010) isolou da rizosfera de 16 plantas

medicinais, coletadas na província de Lumphun (Tailândia), 445 actinobactérias dos quais 89% dos isolados eram pertencentes ao gênero *Streptomyces* e 11% foram distribuídos nos gêneros *Actinomadura sp.*, *Microbispora sp.*, *Micromonospora sp.*, *Nocardia s.* e *Nonomurea sp.*

Em 2008, Li e colaboradores descreveram duas novas espécies de actinobactérias, *Rhodococcus certidiphylli* e *Saccharopolyspora endophytica*, isoladas de *Cercidiphyllum japonicum* (conhecida como katsura), árvore nativa da China e Japão. Qin e colaboradores (2009) e Du e colaboradores (2013) também exploraram a diversidade das bactérias associativas de diversas plantas medicinais, coletadas de florestas tropicais em Xishuangbanna e de um subúrbio de Beijing (China), respectivamente, baseado no sequenciamento do gene 16S rRNA. Du et al. (2013) classificou 600 isolados de actinobactérias em 34 gêneros e 7 táxons desconhecidos a nível de gênero, enquanto Qin et al. (2009) encontrou entre 46 isolados de actinobactérias 32 gêneros diferentes.

É evidente a diversidade de microrganismos das plantas medicinais e o potencial biotecnológico que estes possuem. Países asiáticos como a China e o Japão, além dos Estados Unidos têm explorado, cada vez mais, a diversidade microbiana da flora nativa e de plantas medicinais, obtendo resultados promissores para a descoberta de novas espécies de microrganismos e o isolamento de novos compostos bioativos. No Brasil, poucos estudos são publicados considerando a riqueza da diversidade de flora que possui, o que destaca a necessidade do incentivo a novos estudos de diversidade de microrganismos das plantas não exploradas, como fonte potencial de novos representantes de microrganismos e metabólitos com aplicações comercial e industriais.

1.3 *Baccharis trimera*

A utilização de plantas para fins de tratamento, cura e prevenção de doenças, é feito desde os tempos mais remotos da humanidade. As plantas medicinais são ricas fontes de compostos bioativos, sendo uma das principais fontes utilizadas em processos de desenvolvimento da farmacoterapia moderna (OLIVEIRA et.al., 2016). De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) planta medicinal consiste em “todo e qualquer vegetal que possui, em

um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; KARAM et al., 2013).

Atualmente, a utilização de plantas medicinais ou de fitoterápicos pela população está atrelada às condições socioeconômicas, sendo muitas vezes o único recurso terapêutico de comunidades em países em desenvolvimento, às questões culturais e, mais recentemente, ao incentivo à medicinal natural promovido pelas novas mídias (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005, OLIVEIRA et al., 2016). São produtos de fácil aquisição sendo comercializados em feiras livres, mercados populares e encontradas também em quintais residenciais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas do gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, são amplamente distribuídas em diversos habitats, mas encontradas principalmente em regiões mais elevadas dos países da América do Sul e México (FABIANE et al., 2008, CUZZI et al. 2012, KARAM et al., 2013). Representado por mais de 500 espécies e classificadas com base nas características morfológicas em 28 grupos, são frequentemente estudadas quanto ao seu potencial farmacológico, destacando-se as suas atividades alelopática, analgésica, antiglicêmica, antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antimutagênica, antioxidante, antiviral, citotóxica, espasmolítica, gastroprotetora, hepatoprotetora, inseticida e vasorrelaxante (BORELLA; FONTOURA, 2002, BUDEL et al., 2003; VERDI et al., 2005; KARAM et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Baccharis* destaca-se a *Baccharis trimera* pertencente ao grupo Trimeria, comumente chamada de carqueja ou carqueja-amargosa, nativa dos campos e beiras de matas do Sul e Sudeste do Brasil (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2015, OLIVEIRA et al., 2016), Bolívia, Paraguai, Uruguai e Norte da Argentina (BONA et al., 2005; CUZZI et al. 2012). A carqueja é incluída na Farmacopéia Brasileira e consumida na medicina popular a partir de infusões, para o tratamento de desordens hepáticas e digestivas, anemias, processos inflamatórios, reumatismos, anginas, diabetes, problemas circulatórios e outros males (TORRES et al., 2000, BORELLA; FONTOURA, 2002; VERDI et al., 2005). O mercado tem explorado a produção de produtos à base de carqueja, como o consumo de cápsulas, para auxiliar no processo de emagrecimento e a produção de

cervejas artesanais, também para a aromatização de licores e vinhos e à fabricação de vassouras rústicas (BONA et al., 2005).

As plantas dessa espécie são no geral arbustos, com altura entre 0,5 a 4,0 metros, bastante ramificados na base, caules e ramos verdes com expansões tripladas, dioicas e com inflorescências do tipo capítulo, dispostas lateralmente nos ramos, de cor esbranquiçada para os machos e cor amarela para fêmeas (FIGURA 3) (BUDEL et al., 2003; VERDI et.al., 2005; KARAM et al., 2013).

As propriedades terapêuticas da *Baccharis trimera* estão relacionadas à sua composição química, sendo objeto de estudo para o isolamento dos compostos e compreensão das atividades biológicas dessas moléculas. Os constituintes químicos encontrados na carqueja incluem os flavonoides que são os principais metabólitos secundários da planta e os responsáveis pelo seu efeito hepatoprotetor e antioxidante (FABIANE et.al., 2008), uma variedade de compostos terpenóides e óleos essenciais (composto por α -pineno, β -pineno, canfeno, limoneno, acetato de carquejilo, carquejol, ocimeno, ledol e uma saponina), metabólitos conhecidos por suas ações farmacológicas com efeitos hipotérmicos e analgésicos (BORELLA; FONTOURA, 2002; VERDI et. al., 2005; KARAM et al., 2013).

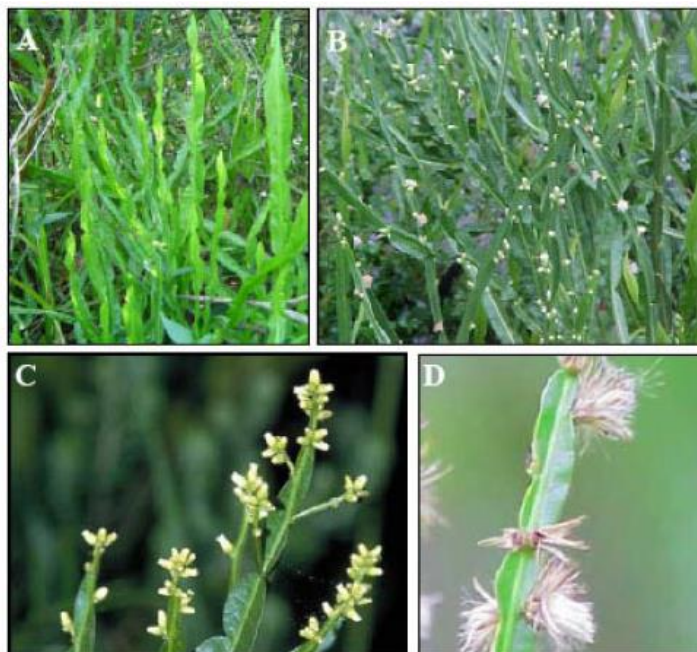


Figura 3 - Plantas de *Baccharis trimera* em estágio vegetativo (A) e reprodutivo (B), ramo de inflorescência (C) e detalhe dos frutos aquênios (D) (KARAM et al., 2013).

Embora estudos com a carqueja tenham permitido a compreensão e caracterização fitoquímica dos compostos com ações terapêuticas, há um déficit nas pesquisas sobre a microbiota dessa planta medicinal (VIEIRA et.al., 2014; OLIVEIRA et.al, 2016). Em 2014, Vieira e colaboradores estudaram a diversidade de fungos endofíticos associados a *Baccharis trimera* e seu potencial antimicrobiano. Os métodos utilizados permitiram a obtenção de 25 táxons diferentes de fungos, dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, sendo os extratos brutos selecionados para examinar as atividades antimicrobianas. Destes extratos 12,8% apresentaram atividade antimicrobiana contra ao menos um microrganismo alvo.

Estudos relacionados a microbiota bacteriana da carqueja são necessários para que possam elucidar uma possível relação da diversidade dos microrganismos associados com seu potencial terapêutico, ou como no caso do estudo de Vieira e colaboradores (2014) isolar microrganismos com atividades biotecnológicas. O grupo de pesquisa do laboratório de Genética de microrganismos (LAGEM), da Universidade Estadual de Londrina, iniciou com o trabalho de Jardim (2016) estudos de diversidade de bactérias associadas a *B. trimera*, avaliando a heterogeneidade de gêneros bacterianos cultiváveis capazes de se associarem com a planta. Ao todo 182 isolados foram avaliados e identificados, pertencendo a 38 gêneros bacterianos diferentes, sendo alocados nas seguintes classes: Bacilli (30%), Actinobacteria (24%), α -Proteobacteria (22%), β -Proteobacteria (12%) e γ -Proteobacteria (12%). A partir destes isolados, dados taxonômicos e metabólicos estão sendo obtidos (incluindo este trabalho, que selecionou como objeto de estudo o gênero *Streptomyces*), para melhor compreensão da diversidade bacteriana associada a *Baccharis trimera*.

1.4 Taxonomia de *Streptomyces* sp.

O grande interesse econômico e industrial em bactérias do gênero *Streptomyces* resultou inicialmente em um caos taxonômico com o aumento do número de espécies de cerca de 40 para mais de 3000 espécies descritas nas décadas de 1960-1970 (WILLIAMS et al., 1983; LABEDA et al., 2012). Como solução, o Projeto Internacional *Streptomyces* (ISP Project) foi lançado em

1964 para padronizar as análises necessárias para classificação de espécies deste gênero, visando à redução do número de espécies sinônimas mal descritas e definir os critérios necessários para pesquisas futuras. Atualmente existem mais de 800 espécies (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>) com nomes validamente descritos no gênero *Streptomyces* (LI et al, 2018). Os dados taxonômicos permitiram que algumas estirpes fossem reagrupadas consideradas espécies sinônimas, o que levou a redução do número de espécies dos anos 70 para os dias atuais, no entanto, continuamente novas espécies são propostas à medida que novos ambientes são estudados, visando principalmente aquelas com alta capacidade de serem produtoras de novos compostos bioativos.

Os estudos taxonômicos de *Streptomyces* utilizam-se da taxonomia polifásica, a combinação das análises de propriedades fenotípicas, morfológicas, bioquímicas, quimiotaxonômicas, e moleculares como hibridização DNA-DNA, perfis *fingerprinting*, porcentagem G+C no genoma, sequenciamento de genes, como o sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal e análises de sequências multilocus (MLSA), sequenciamento de genomas, entre outras, que são aplicadas para caracterização das espécies. O avanço das técnicas moleculares são nesta “nova era” essenciais para uma caracterização mais sensível na identificação desses microrganismos, pois os resultados permitem construir uma relação filogenética mais criteriosa entre os organismos, seja para melhor definição de espécies mal descritas ou para possibilitar as proposições de novos grupos e/ou espécies para o gênero (RAMASAMY et al., 2014).

1.4.1 Caracterização Fenotípica

Após a implantação do ISP Project (1964) estabeleceu-se critérios e metodologias para caracterização e identificação de *Streptomyces* (FIGURA 4). Os primeiros estudos taxonômicos do gênero baseavam-se em características fenotípicas, agrupando as estirpes conforme as semelhanças e diferenças observadas nestas análises (WILLIAMS et al., 1983). Para o gênero *Streptomyces* as metodologias empregadas por Shirling e Gottlieb (1966) permanecem como referência para pesquisas atuais.

Utilizando as diretrizes para as análises de caracterização das espécies, estudos fenotípicos com estirpes de *Streptomyces* possibilitaram agrupamentos de espécies tipo mais próximas entre si. Küster (1972) selecionou para análise os caracteres fenotípicos: morfologia de hifas, morfologia de esporos, cor do micélio aéreo, cor micélio vegetativo, produção de melanina, produção de pigmento solúvel e utilização de nove diferentes tipos de açúcares. Essas características foram avaliadas como confiáveis e constantes e permite, por meio de chaves dicotômicas, esclarecer a identificação e classificação dos isolados nos diferentes grupos de espécies de *Streptomyces*. Willians e colaboradores (1983), por sua vez, analisaram 139 caracteres fenotípicos, incluindo aqueles avaliados por Küster (1972) resultando na classificação de 394 representantes do gênero *Streptomyces* em 19 grandes grupos, 40 grupos menores e 18 grupos de espécie única (WILLIANS et al., 1983). As classificações e agrupamentos definidos nestes trabalhos, para as avaliações das características morfológicas e bioquímicas, são aplicados como referências para a descrição de novas espécie de *Streptomyces*.

A caracterização fenotípica é realizada sempre que se propõe a descrição de uma nova espécie. Como a definição de duas novas espécies isoladas do solo do deserto do Atacama, *Streptomyces aridus* sp. nov. (IDRIS et.al., 2017) e *Streptomyces asenjonii* sp. nov. (GOODFELLOW et.al, 2017), em que se examinaram as estirpes por microscopia eletrônica, o arranjo da cadeia de esporos, quanto à produção de menaquinona, total de açúcar celular, sua composição lipídica, crescimento em diferentes meios de cultura, coloração de colônia, pigmentos difusíveis e consumo de diferentes fontes de carbono.



Figura 4 – Diferentes morfologias de colônias observadas em estirpes de *Streptomyces* sp. (Fonte: bacteriaiphotos.com)

Além dos caracteres morfológicos, são utilizados na taxonomia de *Streptomyces* os métodos quimiotaxonômicos, especialmente, o perfil de ácidos graxos (FAME) que caracteriza por cromatografia a composição total de ácidos graxos em células inteiras. A constituição de ácidos graxos de um microrganismo tem se confirmado como um importante fator taxonômico, os dados obtidos podem ser analisados quantitativamente para fornecer informações taxonômicas úteis em nível de espécie e, em alguns casos, o nível de subespécies (SLABBINCK et al., 2008). Outras metodologias comumente aplicadas na taxonomia bacteriana são serologia, perfil de proteínas e identificação química dos compostos secundários produzidos (ANDERSON; WELLINGTON, 2001).

Embora sejam essenciais para a taxonomia estas metodologias fenotípicas demandam longo tempo e a utilização de técnicas elaboradas. Quando utilizada isoladamente, a quimiotaxonomia nem sempre permite a obtenção de um resultado preciso da espécie, por isso é fundamental para a descrição de espécies a utilização dessas metodologias em associação com as técnicas moleculares (ANDERSON; WELLINGTON, 2001).

1.4.2 Sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal (16S RNAr)

O sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizado como ferramenta em estudos taxonômicos de bactérias, sendo considerado como marcador universal para análise evolutiva de isolados cultiváveis e não cultiváveis, e como uma ferramenta para a detecção e quantificação de populações específicas no meio ambiente (RONG et al., 2012). O gene 16S RNAr apresenta alta conservação entre todos os organismos procariontes, Bacteria e Archaea, possuindo função indispensável na formação dos ribossomos e no processo de tradução do RNA mensageiro (mRNA) em proteína (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Apesar de a sequência ser altamente conservada o 16S rDNA também contém regiões variáveis, as quais são analisadas para discriminar os diferentes táxons (HEUER et al., 1997).

Em 1994, Stackebrandt e Goebel formularam os parâmetros necessários para o delineamento de novas espécies bacterianas e estabeleceram que duas estirpes pertencem à mesma espécie se compartilharem as seguintes características genômicas: similaridade de sequência do gene 16S rRNA superior a 97% de, similaridade de hibridização DNA-DNA $\geq 70\%$ e valores de $\Delta Tm \leq 5$ °C. Em 2006, estes parâmetros foram revisados por Stackebrandt e Ebers, sendo estabelecido uma similaridade da sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA superior a 98,5% para que duas estirpes sejam consideradas pertencentes a mesma espécie. Esta orientação simples e objetiva aumentou consideravelmente a taxa de descoberta de novas espécies. Bancos de dados especializados, como EzTaxon e o Ribossomal Database Project (RDP), foram criados mantendo com êxito as sequências de genes do 16S rRNA com curadoria, tornando-as disponíveis para comparação. Toda publicação que propõe uma nova espécie bacteriana é susceptível de relatar a sequência do gene 16S rRNA da espécie, por isso, faz-se necessário que estes bancos mantenham um alto nível de cobertura e exigências para aceitação de sequências para espécies-tipo. As submissões de novas espécies bacterianas auxiliam os taxonomistas microbianos a preencher as lacunas remanescentes, que existem nas bases de dados de sequências de genes 16S rRNA (KIM et al., 2014; RAMASAMY et al., 2014).

No entanto, em muitos casos, é difícil diferenciar duas espécies usando somente sequências do gene 16S rRNA, uma vez que algumas espécies compartilham um alto nível de similaridade de sequência deste gene (> 99%), como acontece em espécies estritamente relacionadas do gênero *Streptomyces*. A aplicação deste marcador filogenético possui uma resolução insuficiente ao nível de espécie, devido à alta conservação da sequência de nucleotídeos do gene e transferência horizontal entre estirpes ao longo da evolução (LABEDA et al., 2012; GLAESER; KÄMPFER, 2015).

Labeda e colaboradores (2012) analisaram o gene 16S rRNA de quase todas as espécies válidas da família Streptomycetaceae, a fim de esclarecer as relações filogenéticas entre as estirpes de *Streptomyces*. A árvore filogenética produzida foi constituída de 160 clados definidos com mais de 60% de valor de *bootstrap* e permitiu relacionar as espécies mais próximas desta família; no entanto, também demonstrou que o gene não é particularmente útil para determinar com precisão as relações filogenéticas dentro dos clados.

A alta similaridade do gene 16S rRNA dentro dos táxons de Streptomycetaceae enfraquece os valores de *bootstrap* da estrutura da árvore filogenética para esta família, sendo o seu valor taxonômico principalmente usado para a identificação ou confirmação de isolados dentro do gênero *Streptomyces* (LABEDA et al., 2012). Os autores observaram a existência de uma boa correlação entre os grupos de espécies construídos a partir da filogenia baseada no gene 16S rRNA e os grupos formados baseados nas características morfológicas e fisiológicas das espécies de *Streptomyces*, descritos por Willians e colaboradores (1983) (LABEDA et al, 2012).

A limitação do gene 16S rRNA para espécies muito relacionadas, tem sido observada em diversos trabalhos. Em um estudo com isolados de *Streptomyces* obtidos de lesões de batata (*Solanum tuberosum*) o gene 16S rRNA dos isolados e de espécies tipo de *Streptomyces* foram comparados, no entanto, a alta similaridade (>99%) obtida entre os isolados impediu a diferenciação a nível de espécie (SONG et al. 2004). Outras pesquisas, como de Coombs e Franco (2003) e Bontemps e colaboradores (2003) utilizaram-se do método de sequenciamento do gene 16S rRNA como passo inicial para o estudo taxonômico dos isolados de actinobactérias, revelando dados precisos sobre a classificação dos gêneros as quais pertenciam. Mas para a

caracterização detalhada do grupo foram necessárias outras metodologias e comparações para fundamentar a classificação de novas espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Goodfellow et al. (2017), que obteve em seu delineamento com isolados do solo do deserto do Atacama, um subclado na árvore do gene 16S rRNA que não estavam intimamente relacionadas com nenhum dos seus vizinhos filogenéticos próximos. E posteriormente, as estirpes foram submetidas à análise MLSA e taxonomia convencional confirmando a proposição da nova espécie de *Streptomyces asenjonii* sp. nov.

1.4.3 Hibridização DNA-DNA

A hibridização DNA-DNA (HDD) é considerada desde os anos 70 a metodologia padrão ouro para a definição de espécies bacterianas. Ela consiste na comparação entre as fitas de DNA de duas estirpes distintas, baseando-se nas propriedades de desnaturação e reassociação por complementariedade do DNA. Sucintamente, a técnica consiste na mistura dos materiais genéticos de dois organismos, que serão submetidos a ciclos com variações de temperatura, resultando ao final a formação de moléculas híbridas e nativas. A quantidade de híbridos formados é altamente dependente da similaridade genética entre as bactérias, sendo maior em bactérias mais similares. Serão consideradas pertencentes à mesma espécie bacteriana quando apresentarem similaridade de 70% ou mais de hibridização DNA-DNA e/ou valores de $\Delta T_m \leq 5$ °C (SOCRANSKY et al., 2004).

Embora a técnica de HDD seja amplamente utilizada para a taxonomia de espécies, existem desvantagens na sua utilização, como a dificuldade em aplicá-la em laboratórios que não possuem estrutura para a análise, o tempo consumido e a dificuldade de se construir bancos de dados comparativos entre os resultados obtidos por diferentes equipes de pesquisa. Devido a estes fatores e o avanço nas técnicas de sequenciamento de genes e genomas, estudos avaliam a possibilidade de substituição da HDD por estas. Dentre as metodologias de sequenciamento, até o momento, a identidade média de nucleotídeos (ANI), que consiste da comparação por similaridade de genomas de dois microrganismos, apresenta melhores resultados comparativos. A ANI cuja resultado reflete a média do grau de distância evolutiva entre dois

organismos, um valor maior que 94% de ANI representa o limite de similaridade HDD de 70% (RICHTER E ROSSELLÓ-MÓRA, 2009). Outra substituição proposta por pesquisadores para HDD é a análise de sequências multilocus (MLSA), a metodologia de concatenação de genes *housekeeping* possui uma resolução em nível de espécie satisfatória e boas correlações são observadas entre a HDD e o MLSA. No geral, os dados de corte de 70% de HDD correspondem a valores de similaridade >95% de sequências concatenadas MLSA (THOMPSON et al., 2013).

1.4.4 Análise de Sequências Multilocus (MLSA)

A análise de sequência multilocus (MLSA) é uma abordagem de análise baseada na tipagem de sequência multilocus (MLST), introduzida pela primeira vez por Maiden e colaboradores (1998) e envolve a análise combinada das sequências de diferentes genes do genoma de um organismo. Dados MLST mostram os padrões de “perfis alélicos”, a análise é realizada a partir da similaridade entre sequências concatenadas e as diferenças nucleotídicas encontradas. Com o pareamento das sequências se caracterizam as diferenças entre os alelos de cada gene, possibilitando a compreensão da distribuição da informação genética dos alelos, empregadas em estudos epidemiológicos de biologia populacional, patogenicidade e evolução bacteriana. Na metodologia MLSA, por outro lado, os resultados da concatenação de genes são aplicados para cálculos filogenéticos, que geram resultados da taxa evolutiva das estirpes com base nas informações das sequências de nucleotídeos dos genes. O alto poder de resolução de MLSA permite a distinção e classificação bacteriana a nível de espécie (GLAESER; KÄMPFER, 2015).

O método é atualmente aplicado na taxonomia bacteriana e considera fragmentos internos de vários genes *housekeeping*, os quais são responsáveis por codificar proteínas de cópias únicas e onipresentes em todos os membros do grupo taxonômico. As resoluções filogenéticas obtidas com o MLSA permitem à definição de espécies e a classificação em níveis infra-específicos. Os genes selecionados devem ser funcionais e necessários para o metabolismo da bactéria, por serem considerados mais estáveis em relação às mutações genéticas. Cada nova variação na sequência de nucleotídeos dos

fragmentos do alelo, mesmo que seja a troca de uma única base de nucleotídeo, leva à atribuição de um novo alelo único do respectivo gene (GLAESER; KÄMPFER, 2015; LABEDA, 2017).

De maneira geral, recomenda-se que 5 a 10 *locus* sejam incluídos em uma análise MLSA. No entanto, este número não deve ser considerado fixo, sendo a quantidade de genes necessária dependente do nível de resolução filogenética exigida no estudo; ao se estender esta quantidade uma maior resolução intraespécies será atingida (GUO et al., 2008). Resultados de estudos MLSA com 3 genes *housekeeping* tem apresentado resoluções satisfatórias para o posicionamento filogenético de estirpes bacterianas, como por exemplo para o gênero *Rhizophilus*, sendo aplicado na taxonomia como parâmetro para a proposição de novas espécies, que posteriormente deverão ser conduzidas a análise polifásica para descrição de espécie (HELENE et al., 2015; DELAMUTA et al., 2012). As árvores filogenéticas são calculadas baseada nas sequências alinhadas concatenadas, porque refletem melhor a relação taxonômica dos microrganismos (GLAESER; KÄMPFER, 2015; GUO et al., 2008). Os dados obtidos com estes genes são relacionados com resultados de Hibridização DNA-DNA, sendo o parâmetro >95% da análise de sequências multilocus correspondente ao padrão de 70% utilizado para similaridade HDD.

Existe um desafio para circunscrever as estirpes de *Streptomyces* devido um grande número de isolados e espécies taxonomicamente mal definidas. Há uma resolução insuficiente da sequência de genes 16S rRNA e dificuldades na identificação de diferenças fenotípicas significativas entre as estirpes. Assim, MLSA é uma ferramenta valiosa para solucionar a filogenia de espécies estreitamente relacionadas do gênero *Streptomyces* (GUO et al., 2008; LABEDA, 2017). Guo e colaboradores (2008) desenvolveram e aplicaram primers específicos para análise MLSA do gênero *Streptomyces* e desde então, vários estudos a fim de resolver as relações filogenéticas ou propor a descrição de uma nova espécie ao gênero os utilizam para análise MLSA.

A abordagem da técnica MLSA para *Streptomyces* é baseada em cinco genes *housekeeping*: ATP sintase F1 (subunidade, *atpD*), DNA girase (subunidade; *gyrB*), recombinase A (*recA*), RNA polimerase (subunidade; *rpoB*) e triptofano sintase (subunidade; *TrpB*), onde os genes *atpD*, *recA* e *rpoB* são normalmente mais conservadas do que *gyrB* e *trpB* (GUO et al., 2008).

Rong e colaboradores (2009) em seu estudo do grupo de *Streptomyces albidoflavus* usando sequências parciais dos genes *housekeeping* propuseram que 9 estirpes descritas eram sinônimas de *S. albidoflavus*, sendo elas *S. canescens*, *S. champavatii*, *S. coelicolor*, *S. felleus*, *S. globisporus* *subsp. caucasicus*, *S. griseus subsp. Solvifaciens*, *S. limosus*, *S. odorifer* e *S. sampsonii*.

Em outro trabalho Rong e colaboradores (2012) avaliaram a taxonomia do clado *Streptomyces hygroscopicus*, cujo seus representantes são conhecidos por serem produtores de antibióticos e muitos outros metabólitos secundários, industriais e agronomicamente importantes, a fim de proporcionar uma melhor relação entre os membros do grupo. O levantamento de dados esclareceu o posicionamento taxonômico das espécies, considerando como sinônimas *S. ehimensis* e *S. luteoverticillatus*, e *S. rektiverticillatus* sinônimo de *S. aureoversilis*. Além de propor a descrição de uma nova espécie *S. hygroscopicus subsp. ossamyceticus*.

Labeda e colaboradores (2013) utilizou o MLSA com o objetivo de determinar as relações entre espécies de *Streptomyces* fitopatogênicas e, com os dados obtidos, esclareceram posições taxonômicas de espécies que devem ser consideradas sinônimas e a confirmação de espécies distintas entre si. Em outro trabalho, Labeda e colaboradores (2017) avaliaram a relação filogenética das estirpes de *Streptomyces* disponíveis na Coleção de Cultura ARS, dos Estados Unidos, por MLSA e demonstraram as relações filogenéticas obtidas por MLSA estavam de acordo com as análises filogenéticas observadas anteriormente com o gene 16S RNAr (Labeda et al. 2012) e com os cladogramas atribuídos pela taxonomia numérica realizada por Willians e colaboradores (1983). Os dados possibilitaram renomear espécies sinônimas e validaram os gêneros *Kitasatospora* e *Streptacidiphilum* e propuseram a reclassificação de 12 espécies do gênero *Streptomyces* para o gênero *Kitasatospora*. Os resultados apresentados poderiam resultar na redução de *Streptomyces* listadas, no entanto, os pesquisadores afirmaram a necessidade de comparação com outras metodologias para confirmação dessas alterações (LABEDA et al, 2017).

Após a revisão dos parâmetros para descrição de espécies bacterianas, ficaram estabelecidos que para pertencer a uma espécie já descrita o isolado

de estudo deva quando comparado as espécies tipo possuir: 98,5% de identidade do gene 16S rRNA, >70% de similaridade DDH ou 95% de ANI, < 5°C ΔT_m e <5% mol de diferença no conteúdo G+C (Stackebrandt e Ebers 2006). Nota-se que o avanço das tecnologias tem influenciado na eficiência de resolução e reprodutibilidade dos estudos taxonômicos e possuem um potencial promissor para refinar a sistemática de *Streptomyces*, muitos grupos de pesquisa tem incentivado a ampliação do uso da técnica MLSA em substituição de HDD, pois há forte correlação entre os resultados obtidos por estas duas metodologias quando comparadas. Uma comparação entre DDH e MLSA realizada para o gênero *Streptomyces*, mostrou que o valor de corte de 70% de similaridade de hibridização DNA-DNA correspondeu a uma distância de MLSA de 0,007 com cinco genes *housekeeping* concatenados, o que representa uma similaridade de sequências nucleotídicas concatenadas de 99,3% (THOMPSON et al., 2013, GLAESER, KÄMPFER, 2015, LABEDA et al., 2017).

1.5 Descrição de Novas Espécies Bacterianas

A identificação e descrição de novos microrganismos constitui um trabalho com regras padronizadas, que requerem a observação de um conjunto de características das estirpes candidatas, com o objetivo de garantir a qualidade dos resultados, para que ao final a nova espécie seja relacionada o mais próximo possível de sua taxonomia natural. Está padronização de regras foi estabelecida pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP), comitê da Divisão de Bacteriologia e Microbiologia Aplicada da União Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS).

De acordo com a revista “Systematic and Applied Microbiology” para submissão de uma nova espécie o autor deverá validar e publicar seu trabalho no periódico “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” ou na “Systematic and Applied Microbiology”. No entanto, outros periódicos como “Frontiers in Microbiology” e “Microbes and Environments” apresentam publicações de proposições e descrições de novas espécies de microrganismos.

Os critérios necessários para a descrição de novas espécies bacterianas estão disponíveis no “Guia do autor” da revista “Systematic and Applied Microbiology” e são:

- Para qualquer espécie nova de um gênero, uma espécie tipo (“type strain”) deve ser designada, esta estirpe deve ser depositada em duas coleções de cultura em diferentes países. Os isolados devem ser estudados de forma abrangente por meio de uma abordagem polifásica, incluindo características genéticas e fenotípicas.

- O uso de mais de uma única linhagem para descrições de novos gêneros e/ou espécies é altamente encorajado. Também é de suma importância que todas as estirpes sejam igualmente estudadas para descrever a diversidade intraespecífica.

- Análises de hibridização DNA-DNA, concebidos para estimar o parentesco do genoma. As análises devem ser realizadas com as espécies tipo e os parentes mais próximos do novo táxon putativo.

- Perfis “*fingerprinting*” da(s) estirpe(s) usada(s) para classificar um novo táxon por meio de métodos como ERIC-, REP-, BOX-, ou RAPD-PCR, ou mesmo perfis de proteínas de células inteiras. É obrigatório mostrar que os diferentes isolados em uso, pertencentes ao mesmo táxon, não são variedades clonais.

- A sequência quase completa do gene 16S rRNA (mais de 1300 nucleotídeos) da estirpe tipo da espécie deve ser estudada e depositada em um repositório público. O número de acesso deve ser dado.

- Para análises de sequências gênicas não ribossômicas (por exemplo, MLSA), todos os números de acesso das sequências geradas devem ser dados.

- Os testes fenotípicos devem ser realizados por meio de métodos padronizados. É altamente recomendado que os marcadores quimiotaxonômicos sejam estudados, especialmente se estes forem utilizados como recursos diagnósticos para o gênero que abriga o novo táxon. Os marcadores recomendados são perfis de ácidos graxos, composição lipídica polar, tipos quinona, padrões de poliamina e tipo/composição de peptidoglicano.

- É obrigatório fornecer os valores em % molar de G + C do genoma do isolado comparado ao das espécies tipo.

- Para qualquer novo táxon, a etimologia do nome proposto deve ser fornecida.

Todos os parâmetros devem ser respeitados para a aceitação da nova espécie, no entanto, os periódicos a fim de incentivar as pesquisas e desenvolvimentos, permitem também aos pesquisadores publicações de "Candidatus", utilizado quando nem todas as exigências citadas anteriormente foram concluídas, mas com dados robustos que permitam a proposição da nova espécie.

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, L.R. et al. Efeito do extrato bruto enzimático de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre a digestibilidade de matéria seca in vitro para ruminantes. **Arq. ciên. vet. zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 9, n. 1, p.29-36, 2006.
- ANDERSON, A. S., WELLINGTON, E.M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p.797-814, 1 maio 2001. Microbiology Society.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p.1-43, 25 nov. 2015.
- BIAN, G.K et al. *Streptomyces* phytohabitans sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from medicinal plant *Curcuma phaeocaulis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 2, p. 289-296, 2012.
- BONA, C. M. de et al. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p.223-226, fev. 2005.
- BONTEMPS, C. et al. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. **Fems Microbiology Letters**, v. 342, n. 2, p.157-167, 4 abr. 2013.
- BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e teor de flavonoides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p.63-67, dez. 2002.
- BUDEL, J M.; DUARTE, M R.. Estudo farmacobotânico de partes vegetativas aéreas de *Baccharis anomala* DC, Asteraceae. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 18, supl. p. 761-768, Dez. 2008.
- CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters In Applied Microbiology**, v. 39, n. 5, p.425-430, nov. 2004.
- CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p.171-198, mar. 2010.
- CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out : a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics, **Philosophical transactions of the royal society** , n. 361, p. 761–768, fev 2006.
- CLAESSEN, D. et al. Regulation of *Streptomyces* development : reach for the sky!, **Elsevier**, v. 14, n. 7, p. 313-319, 2006.
- COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M. Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots Justin. **Applied And Environmental Microbiology**, Australia, v. 9, n. 69, p.5603-5608, set. 2003.
- DELAMUTA, J. R. M. et al. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 698-710, 2012.
- DU, H. et al. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants. **Wei Sheng Wu Xue Bao** v. 53, p. 15–23, 2013.

EGAMBERDIEVA, D. et al. Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1887-1897, 28 set. 2017

FABIANE, K. C. et al. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.197-203, jun. 2008.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GOODFELLOW, M. et al. *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.1-16, 6 jun. 2017.

GUO, Y. et al. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade : use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 58, p. 149–159, 2008.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Of Microbiology**, v. 43, n. 10, p.895-914, out. 1997.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends In Microbiology**, v. 16, n. 10, p.463-471, out. 2008.

HARUNARI, E. et al. *Streptomyces hyaluromycini* sp. nov., isolated from a tunicate (*Molgula manhattensis*). **The Journal Of Antibiotics**, v. 69, n. 3, p.159-163, 4 nov. 2015.

HELENE, L. C. F. et al. "Estudo das Relações Filogenéticas de Estirpes de Rizóbios através da Metodologia Multilocus Sequence Analysis (MLSA) com Identificação de Espécies Novas". In: **In Anais do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - VSIMBBTEC [Blucher Biochemistry Proceedings]**. p. 401. São Paulo: Blucher, 2015.

HEUER, H. et al. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients., **Applied And Environmental Microbiology** v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HUANG, C. et al. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 5, p.905-916, jun. 1998.

IDRIS, H. et al. *Streptomyces aridus* sp. nov., isolated from a high altitude Atacama Desert soil and emended description of *Streptomyces noboritoensis* Isono et al. 1957. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 5, p.705-717, 9 fev. 2017.

IKEDA, H. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 5, p.526-531, 14 abr. 2003.

JARDIM, A. C. M. **DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE CARQUEJA (*Baccharis trimera*)**. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Baccharis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2015.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 2, p.280-286, dez. 2013.

KHAMNA, S. et al. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **EurAsia J BioSci** 4, v. 4, p. 23-32, 2010.

KHUCHAROENPHAISAN, K.; SRIPAHOJ, N.; SINMA, K. Isolation and Identification of Actinomycetes from Termite's Gut against Human Pathogen. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, p. 68-73, 2012.

KIM, M. et al. Reconstruction of a high-quality metabolic model enables the identification of gene overexpression targets for enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p.1185-1194, 23 abr. 2014.

KÖBERL, M. et al. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 400, 2013.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, 2013.

KUSTER, E. Simple Working Key for the Classification and Identification of Named Taxa Included in the International *Streptomyces* Project. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, n. 3, p.139-148, 1 jul. 1972.

LABEDA, D. P. et al. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae., **Springer**, n. 101, p. 73–104, 2012.

LABEDA, D. P. et al. Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 3, p.894-900, 25 nov. 2013.

LABEDA, D. P. et al. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 4, p.563-583, 30 dez. 2017.

LEBLOND, P. et al. The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA., **Molecular Microbiology**, v.19, p. 261–271, 1996.

LEE, H.-j.; HAN, S.-i.; WHANG, K.-s.. *Streptomyces gramineus* sp. nov., an antibiotic-producing actinobacterium isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 4, p.856-859, 27 maio 2011.

LEE, H.-j.; WHANG, K.-s. *Streptomyces graminisoli* sp. nov. and *Streptomyces rhizophilus* sp. nov., isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 5, p.1546-1551, 29 jan. 2014.

LI H.B. et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Sci Technol.** v. 41, p. 385–390, 2008.

LI, L. et al. *Streptomyces desertarenae* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a desert sample. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.1-8, 17 set. 2018.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M.. Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p.469-487, set. 2006.

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAIDEN MC et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

NAFIS, Ahmed et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plant *Aloe vera*: Isolation, antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity assays and taxonomic study. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.513-518, 2018.

NISTE, M. et al. Stress Factors Affecting Symbiosis Activity and Nitrogen Fixation by *Rhizobium* Cultured in vitro. **Proenvironment, Romania**, v. 6, p.42-45, 2013.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **Eur. J. Soil Biol.**, 45:106-113, 2009.

OLIVEIRA, D. P. et al. Estudo do perfil microbiológico da matéria-prima e do produto acabado de *Rhamnus purshiana* e *Baccharis trimera* obtidos de diferentes farmácias de manipulação na cidade de Divinópolis-MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, Minas Gerais, v. 97, n. 0, p.30-44, maio 2016.

PAN, H.; CHEN, C. W.; HUANG, C. A highly efficient targeted recombination system for engineering linear chromosomes of industrial bacteria *Streptomyces*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 64, n. 4, p.167-173, 2018.

PARK, D.H., et al. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53, 2049–2054, 2003.

PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 265-272, 2010.

PHONGSOPITANUN, W. et al. *Streptomyces verrucosisorus* sp. nov., isolated from marine sediments. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 9, p.3607-3613, 1 set. 2016.

PROCÓPIO, R. E. L. et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p.466-471, set. 2012.

QIN, S. et al. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p.6176-6186, 31 jul. 2009.

RAMASAMY, D. et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2, p.384-391, 1 fev. 2014.

REIS JÚNIOR, F.B. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, p. 985-994, 2000.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 106, n. 45, p.19126-19131, 23 out. 2009.

RONG, X.; GUO, Y. HUANG, Y. 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. *solivaciens*. **Systematic And Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p.314-322, ago. 2009.

RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic And Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p.7-18, fev. 2012.

SALAMONI, S. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas., **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2009

SCHMIDT, Ruth et al. Effects of bacterial inoculants on the indigenous microbiome and secondary metabolites of chamomile plants. **Frontiers In Microbiology**, v. 5, p.1-14, 2014.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D.. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p.313-340, 1 jul. 1966.

SLABBINCK, B. et al. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. **Systematic And Applied Microbiology**, v. 32, n. 3, p.163-176, maio 2009.

SOCRANSKY S.S., et al. Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 352–362, 2004.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M.. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p.846-849, 1 out. 1994.

- STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiol Today** v. 33, p. 152–155, 2006.
- THOMPSON, C. C et al. Microbial genomic taxonomy. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p.913-924, 2013.
- TIAN, X.-p. et al. *Streptomyces nanhaiensis* sp. nov., a marine streptomycete isolated from a deep-sea sediment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 4, p.864-868, 27 maio 2011.
- TORRES, L. M. B. et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p.617-619, nov. 2000.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, jun. 2005.
- VERGINER, M. et al. Monitoring the plant epiphyte *Methylobacterium extorquens* DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. **Fems Microbiology Ecology**, v. 74, n. 1, p.136-145, 7 set. 2010.
- VETSIGIAN, K.; JAJOO, R.; KISHONY, R. Structure and Evolution of *Streptomyces* Interaction Networks in Soil and In Silico. **Plos Biology**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.1-12, 25 out. 2011.
- VIEIRA, M. L. A. et al. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 12, p.847-856, dezembro. 2014.
- VURUKONDA, S. S. K.P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.952-978, 22 mar. 2018.
- WANG H.X et al. Enrichment plant microbiota for a metagenomic library construction. **Environ Microbiol**, v. 10, p. 2684–2691, 2008.
- WILLIAMS, S. T. et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **J Gen Microbiol**, v. 129, p. 1743-1813, 1983
- ZABETAKIS, I et al. The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one in strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 311-314, 1999.
- ZHOU, Shuangqing et al. Complete genome sequence of *Streptomyces spongiicola* HNM0071T, a marine sponge-associated actinomycete producing staurosporine and echinomycin. **Marine Genomics**, v. 43, p.61-64, fev. 2019.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a taxonomia polifásica de isolados de *Streptomyces* sp. associativos da planta medicinal *Baccharis trimera*

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológicamente os isolados de *Streptomyces* quanto a coloração dos micélios aéreo e vegetativo, das colônias e as micromorfologias dos esporos;
2. Analisar os isolados de *Streptomyces* quanto a capacidade de desenvolvimento em meios com diferentes fontes de carbono;
3. Analisar filogeneticamente os isolados, por meio do sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal e da análise de sequências multilocus (MLSA) de cinco genes *housekeeping*.

3 ARTIGO

Taxonomia polifásica de *Streptomyces* sp. Associativos de *Baccharis trimera* (Carqueja)

Polyphasic Taxonomy of *Streptomyces* sp. Associated of *Baccharis trimera* (Carqueja)

Artigo a ser submetido ao periódico *Systematic and Applied Microbiology*

Taxonomia Polifásica de *Streptomyces* sp. Associativos de *Baccharis trimera* (Carqueja)

Alves, L.M.^{1*}; Oliveira, J.E.¹; Gutuzzo, G.O.¹; Jardim, A.C.¹; Oliveira, A.L.M.²;
Rodrigues, E.P.¹

¹Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM), Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

²Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

*Autor correspondente: Departamento de Biologia Geral - CCB. Universidade Estadual de Londrina - Campus Universitário. (e-mail: luana.moura93@gmail.com).

Resumo

Os *Streptomyces* destacam-se dos outros gêneros bacterianos por ser um excelente produtor de metabólitos secundários biologicamente ativos, aplicados em diversas áreas farmacológicas, industriais, agrícolas e ambientais, sendo produtores de 75% dos antibióticos conhecidos. Desenvolvem-se em uma variedade de ambientes, principalmente o solo, e são descritos em associações íntimas com plantas colonizando rizosfera e endosfera. As plantas medicinais constituem uma enorme fonte de diversidade de *Streptomyces*. A *Baccharis trimera*, planta medicinal, comumente utilizada para doenças hepáticas e digestivas, consistia um ambiente, até o momento, inexplorado quando a diversa população de *Streptomyces* associadas. O objetivo deste estudo foi realizar a taxonomia polifásica de 16 isolados de *Streptomyces* obtidos de associações com *Baccharis trimera*. Aplicou-se metodologias moleculares (sequenciamento do gene 16S rRNA e análise de sequência multilocus (MLSA) de 5 genes *housekeeping*), além de análises morfológicas e bioquímicas. Os resultados exibiram uma alta diversidade de espécies, os 16 isolados são pertencentes a 14 espécies diferentes, sendo que apenas 3 dos isolados foram identificados como pertencentes a espécies de *Streptomyces* já descritas, BTM036 e BTM412 representantes de *S. recifencis* e BTM281 da espécie *S. goshikiensis*, 1 (BTM304) apresentou resultados inconclusivos com a espécie *S. prunicolor* e 12 isolados (75%) apresentam resultados favoráveis filogeneticamente para a descrição de novas espécies de *Streptomyces*. Os isolados com este potencial foram isolados das diferentes associações com a planta. Os resultados confirmam que a planta medicinal *Baccharis trimera* representa um reservatório extremamente rico para o isolamento de uma diversidade significativa de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, incluindo novas espécies, que são fontes potenciais para a descoberta de compostos biologicamente ativos.

3.1 INTRODUÇÃO

Streptomyces são actinobactérias, gram-positivas com elevado teor de G+C no DNA (>60%), aeróbias e imóveis. Capazes de ocupar uma grande variedade de nichos na natureza e com alto potencial de produção de compostos biologicamente ativos (ANDERSON; WELLINGTON, 2001; LABEDA et al., 2012). Este gênero destaca-se por apresentar características morfológicas e fisiológicas diferentes dos padrões das demais bactérias, seja pela formação de micélio ou pela produção diversificada de metabólitos secundários, aproximadamente 75% dos antibióticos conhecidos foram isolados desse gênero, além de outros compostos de interesse biotecnológico e comercial (CHATER, 2006, BARKA et al., 2015).

Atualmente, o gênero *Streptomyces* possui mais de 800 espécies validadas (www.bacterio.net/streptomyces.html) e com o avanço das técnicas moleculares as avaliações têm se tornado cada vez mais criteriosas, sensíveis e precisas, possibilitando que novas espécies sejam rapidamente propostas e descritas, aumentando continuamente este número (LI et al., 2018, LABEDA et al., 2016).

A informação taxonômica é essencial para descrição das espécies, pois permite que os cientistas compreendam a biodiversidade e as relações entre organismos vivos de diferentes ecossistemas. A taxonomia de bactérias desempenha o papel de permitir a identificação confiável de estirpes microbianas a partir de espécimes clínicos ou ambientais (RAMASAMY et al., 2014). As espécies de *Streptomyces* são intimamente relacionadas entre si, devido a este fato a resolução filogenética em nível de espécie das estirpes desse gênero requer uma análise multifatorial, combinando análises genotípicas moleculares e de taxonomia convencional, denominada taxonomia polifásica. A associação de metodologias, análise do gene ribossomal 16S, a análise da sequência de multilocus (MLSA) de 5 genes *housekeeping* e a caracterização fenotípica (morfológica, bioquímica e quimiotaxômica) têm proporcionado uma resolução taxonômica satisfatória das espécies de *Streptomyces*, permitindo a reclassificação de espécies sinônimas e a

descrição de diversas novas espécies (LABEDA et al. 2012, GORAMASAMY et al., 2014, GOODFELLOW et al., 2017).

As espécies de *Streptomyces* são importantes habitantes saprofitos do solo, representam de 1,0 a 20% do total de células viáveis, no geral, estão relacionadas com a manutenção estrutural dos solos (ALBERTON, 2006, VETSIGIAN; JAJOO; KISHONY, 2011). No entanto, existe uma alta variedade de espécies deste gênero colonizando outros habitats, como ambientes aquáticos (por exemplo, *S. nanhaiensis*) (TIAN et al., 2011) e em associações com animais e plantas (por exemplo, *S. hyaluromycini* e *S. roietensis*, respectivamente) (HARUNARI et al., 2015, KAEWKLA, 2017). Após a descoberta das associações de *Streptomyces* colonizando tecidos internos de plantas, revelou-os como endofíticos, uma fonte promissora para descoberta de novas espécies e novos metabólitos com potenciais biotecnológicos (VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFANI, 2018).

As plantas são extensamente colonizadas por uma variedade de microrganismos, algumas dessas associações são simbiotes, enquanto outras são prejudiciais à planta (BRADER et al., 2014). As bactérias que são capazes de associarem-se benéficamente as plantas, em sua maioria, estão relacionadas com a produção de metabólitos, que interferem positivamente na vida das plantas, por exemplo, aumentando a aquisição de nutrientes ou estimulando os mecanismos de defesa das plantas contra patógenos (VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFANI, 2018).

A compreensão das interações planta-bactéria tem demonstrado à influência dessas associações na composição dos metabólitos secundários, tanto das plantas, quanto dos microrganismos (SCHMIDT et al., 2014). Com isto, o interesse em se caracterizar a microbiota de plantas medicinais, que são capazes de sintetizar compostos com ações terapêuticas, tem avançado atualmente e pode-se destacar dentre estes estudos as relações entre as plantas medicinais e actinobactérias (VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFANI, 2018, QIN et al., 2009).

Plantas do gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, possui mais de 500 espécies descritas, dentre estas a *Baccharis trimera*, popularmente conhecida como carqueja ou carqueja-amargosa, uma planta medicinal consumida a partir de infusões, principalmente para o tratamento de

desordens hepáticas e digestivas (BORELLA; FONTOURA, 2002, VERDI et.al., 2005). Esta planta distribui-se por diversos países da América do Sul, incluindo o Brasil (FABIANE et.al., 2008, CUZZI et.al. 2012; KARAM et al., 2013). Suas características são plantas arbustivas, ramificadas na base, caules, com expansões trialadas e dioicas, distinguíveis por suas inflorescências, sendo os machos de coloração branca e as fêmeas amarelas (BUDEL et al., 2003; Verdi et.al., 2005; KARAM et al., 2013).

Apesar de se conhecer a composição fitoquímica da *Baccharis trimera* e suas capacidades de ações terapêuticas, pouco se sabe sobre os microrganismos associados a essa planta. Vieira e colaboradores (2014) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos associados a *B. trimera* e seu potencial antimicrobiano, obtendo isolados de 25 táxons diferentes de fungos, sendo que 12,8% destes apresentaram atividade antimicrobiana contra ao menos um patógeno alvo.

Os *Streptomyces* associativos de plantas têm sido extensivamente estudados, por possuírem tanto o potencial para servir como agentes de biocontrole efetivos como para serem consideradas eficientes promotoras do crescimento de plantas. Os *Streptomyces* endofíticos já foram isolados de uma variedade de tipos de plantas, incluindo plantas de cultivo (trigo, arroz, tomate, milho, feijão, entre outras) e plantas medicinais, como *Aloe vera* (babosa) e *Curcuma phaeocaulis* (açafraão-da-terra) (QIN et al., 2009, BIAN et al., 2012, NAFIS et al., 2018

Diversos estudos, como Qin e colaboradores (2009), Du e colaboradores (2013), Wang e colaboradores (2008), entre outros, exploraram a diversidade destas bactérias em plantas medicinais, visando à compreensão de distribuição dos gêneros de actinobactérias do gênero *Streptomyces* ao longo do organismo vegetal, a caracterização taxonômica e descrição das espécies colonizadoras, enfatizando as possíveis novas estirpes isoladas e na análise do potencial de ação de novos metabólitos secundários.

Neste contexto, o interesse do nosso grupo de pesquisa foi realizar o isolamento de estirpes bacterianas associadas à planta medicinal *Baccharis trimera* (carqueja). Jardim (2016) isolou Actinobacterias do solo, rizosfera e endosfera de *B. trimera* de dois locais de reservas dos Campos Gerais do estado do Paraná, nas cidades de Ponta Grossa e Ortigueira, e iniciou a

caracterização e análise do potencial biotecnológico dessas estirpes. Como resultados iniciais obtidos do filo Actinobacteria foram identificados isolados representantes dos gêneros *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Conexibacter* e *Kocuria*.

Este estudo focou-se na realização da taxonomia polifásica dos isolados, do trabalho de Jardim (2016), e selecionou os representantes do gênero *Streptomyces* visando à possibilidade de descrição e proposição de novas espécies para o gênero, devido à grande relevância biotecnológica e os resultados promissores obtidos em nossos ensaios de laboratório para produção de antimicrobianos e compostos bioativos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Estirpes Utilizadas e Condições de Cultivo

Os isolados de *Streptomyces sp.* (TABELA 1) foram obtidos de interações associativas com *Baccharis trimera* L. (Carqueja) coletadas em Furnas Gêmeas (Reserva dos Campos Gerais, Ponta Grossa-PR) e no Morro do Mulato (RPPN Serra do Cadeado, Ortigueira-PR) em trabalho prévio (Jardim, 2016). Estes isolados compõem a coleção de bactérias do Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Tabela 1: Isolados de *Streptomyces sp.* utilizados neste estudo

Identificação	Habitat	Local de coleta*
BTM015	Endosfera	PG
BTM036	Rizosfera	PG
BTM281	Rizosfera	PG
BTM288	Rizosfera	PG
BTM294	Solo	PG
BTM295	Solo	PG
BTM298	Solo	PG
BTM300	Rizosfera	PG
BTM301	Solo	PG
BTM304	Solo	PG
BTM412	Solo	PG
BTM453	Endosfera	OT
BTM462	Solo	OT
BTM467	Solo	OT
BTM471	Solo	OT
BTM551	Rizosfera	OT

*Isolados obtidos por Jardim (2016) a partir de amostras de solo adjacente e de *B. trimera* (endosfera de raízes e rizosfera) coletadas em Ponta Grossa (PG) ou Ortigueira (OT).

Os isolados foram preservados em glicerol 30% à -20 °C. A reativação do estoque para avaliação da viabilidade e pureza, o cultivo e manutenção das estirpes foram realizadas utilizando o meio de cultivo ISP2 (4 g extrato de levedura, 10 g extrato de malte, 4 g glicose, 18 g ágar e 1000 mL água destilada, pH 7,2) (SHIRLING AND GOTTLIEB, 1966). Anteriormente a realização de todos os experimentos as estirpes foram observadas quanto às suas características morfológicas e pureza.

3.2.2 Caracterização Fenotípica

Os isolados de *Streptomyces sp.* foram crescidos em meio de cultura sólido ISP2 a 28 °C em incubadora BOD por até 21 dias, sendo a caracterização morfológica realizada a cada 7 dias. Foram observadas a coloração do micélio aéreo, dos esporos e do micélio de substrato (verso da placa de Petri) e a produção de pigmentos solúveis no meio de cultura ISP2.

A caracterização micromorfológica das hifas portadoras de esporos de *Streptomyces sp.* foi realizada por microscopia de luz, como descrito em Shirling e Gottlieb (1966), utilizando os critérios de avaliação determinados por esta metodologia. Os isolados foram cultivados em meio ágar-água (18 g ágar, 1000 mL água destilada, benomyl 50 µg/mL) por 21 dias a 28 °C em incubadora BOD. As superfícies das colônias foram observadas diretamente na placa de Petri com a objetiva de 4 e 10x e o arranjos dos esporos observados e classificados em tipo simples (cadeias retas, cadeias flexíveis, cadeias “reticulum-apertum” e cadeias em espirais) ou cadeias verticiladas (monoverticilo, monoverticilo espiral, biverticilo, biverticilo espiral) (FIGURA 1).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para analisar a caracterização estrutural das colônias e visualizar com detalhes a micromorfologia das hifas e cadeias de esporos. Para a análise por MEV, uma colônia de cada isolado, crescido em meio ISP2 por 14 dias, foi fixada por imersão em solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) e desidratadas em série de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram secas ao ponto crítico com CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e

observadas em microscópio electrónico de varredura (FEI Quanta 200, Holanda).

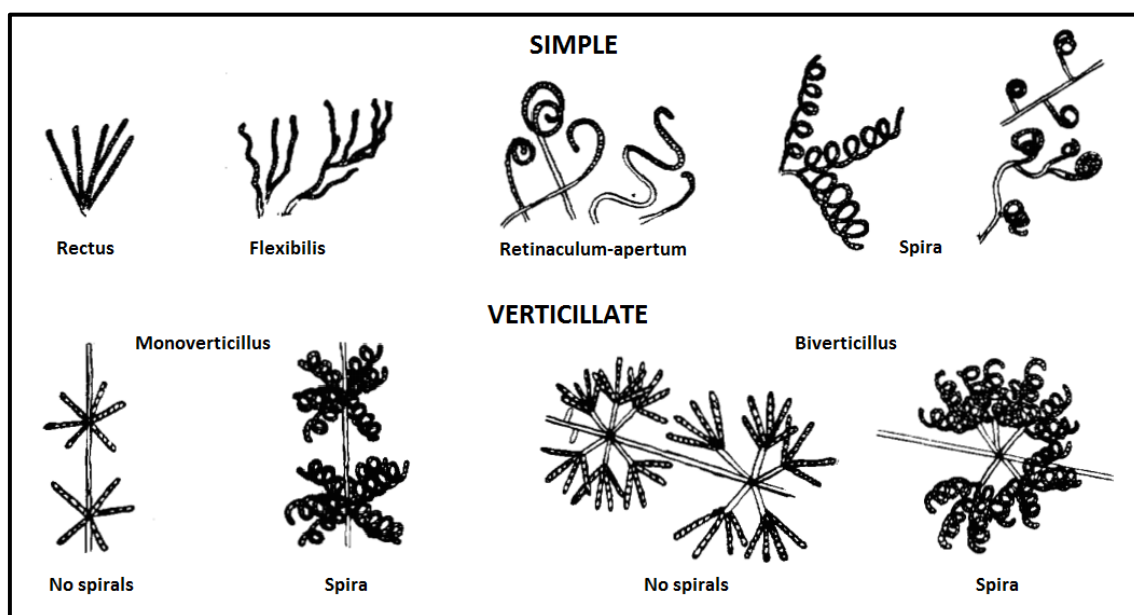


Figura 1 – Variedade de arranjos de esporos observados em *Streptomyces sp.* (Shirling e Gottlieb, 1966 editada pelo autor)

3.2.3 Caracterização Bioquímica

O teste de utilização de diferentes fontes de carbono foi realizado para caracterização bioquímica, de acordo com protocolo descrito por Shirling e Gottlieb (1966). Utilizou-se o seguinte meio básico: 2,64 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,38 g KH_2PO_4 , 5,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,00 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL Solução STS, 1000 mL água destilada q.s.p. e 18 g Ágar com pH 6,8 a 7,0. A solução de traços de sais (STS) foi preparada com a composição: 0,64 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,79 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 100 mL água destilada q.s.p.

Os carboidratos avaliados foram: L-arabinose, D-frutose, D-glicose (controle positivo), mio-inositol, D-manitol, D-rafinose, L-ramnose, sacarose e D-xilose. As soluções das fontes de carbono foram preparadas na concentração de 10% e então, esterilizadas por filtração (0,22 μm). A solução de cada uma das fontes individualmente foi adicionada ao meio básico para concentração final de 1%. Foram feitas triplicatas técnicas e como controles

negativos utilizou-se o meio básico sem adição de açúcares e meio de cultivo ágar-água.

Os isolados de *Streptomyces* sp. foram crescidos em meio sólido ISP2 por sete dias e os esporos utilizados para produção de inóculos que consistiu em uma suspensão saturada de esporos, preparada com duas alçadas (10 μ L) de esporos em 2 mL de água destilada estéril. Esta suspensão foi lavada 2x com água e em seguida, ressuspensa em 2 mL de água ultrapura para inoculação. Em cada placa de Petri contendo o meio básico e a fonte de carbono adicionou-se três gotas de inóculo (30 μ L) com alça calibrada e distribuímos conforme a Figura 2.

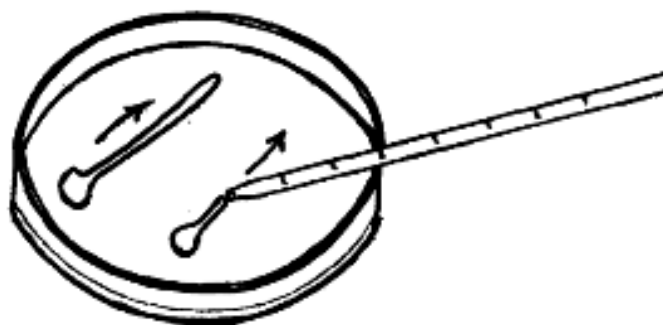


Figura 2 – Representação da distribuição do inóculo de *Streptomyces* sp. para o teste de utilização de fontes de carbono. (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966)

Os resultados foram avaliados da seguinte forma: utilização positiva (+), quando o crescimento na fonte de carbono testada foi igual ou maior que o crescimento em meio básico com adição de glicose (controle positivo) (FIGURA 3); utilização intermediária (+/-), quando o crescimento foi um pouco maior que o observado no controle negativo e muito menor que o crescimento no controle positivo (FIGURA 4); utilização negativa (-), crescimento similar ou menor que o controle negativo (FIGURA 5). Foram feitas avaliações aos 7, 14 e 21 dias de crescimento em estufa a 28 °C (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

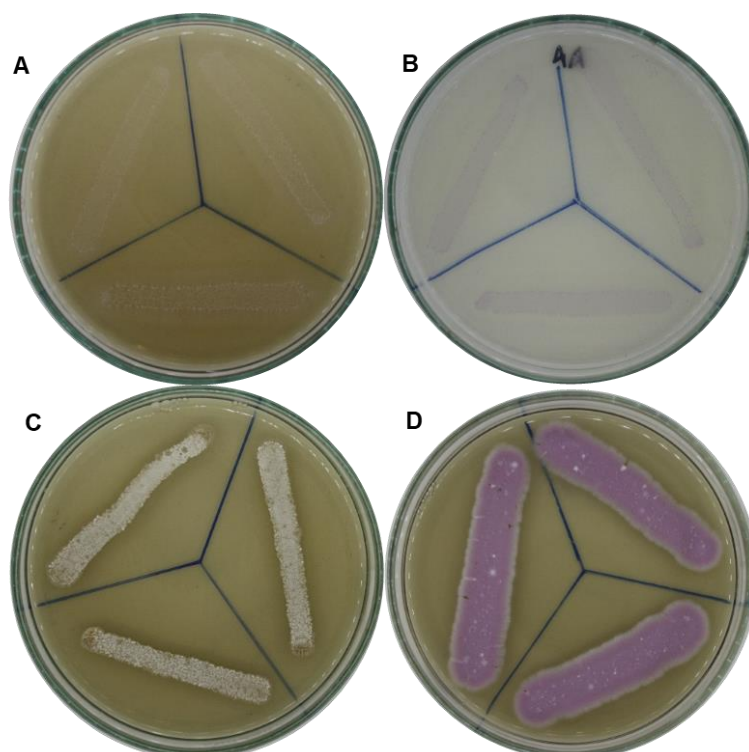


Figura 3 - BTM467, com 7 dias de crescimento. **A** - controle negativo meio básico, **B** - controle negativo ágar-água, **C** - controle positivo (meio básico com glicose) e **D** - meio básico com rafinose positiva. Observa-se variação na coloração da cadeia de esporos, branco no meio básico com glicose e roxa no meio com rafinose.

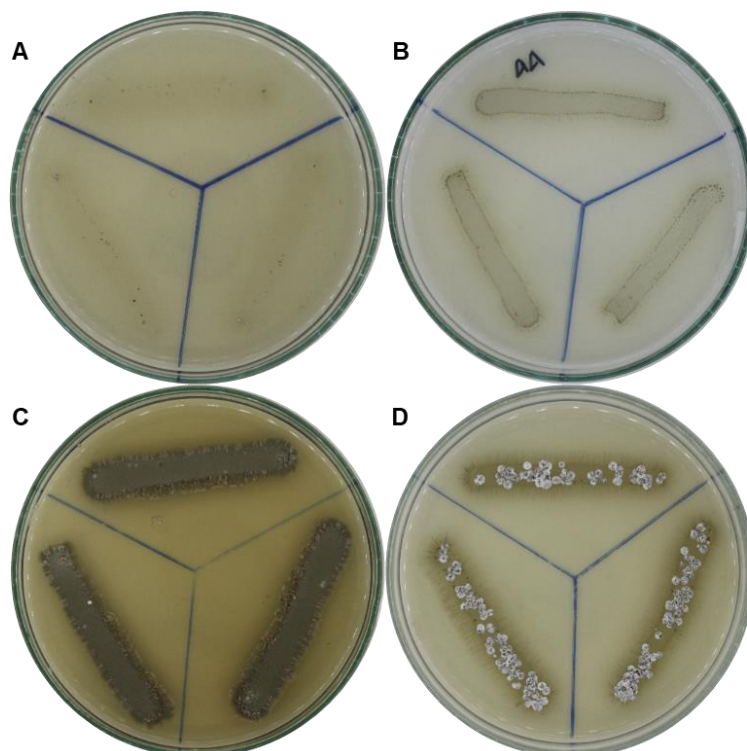


Figura 4 - BTM471, com 7 dias de crescimento. **A** - controle negativo meio básico, **B** - controle negativo ágar-água, **C** - controle positivo (meio básico com glicose) e **D** - meio básico com frutose com crescimento intermediário.

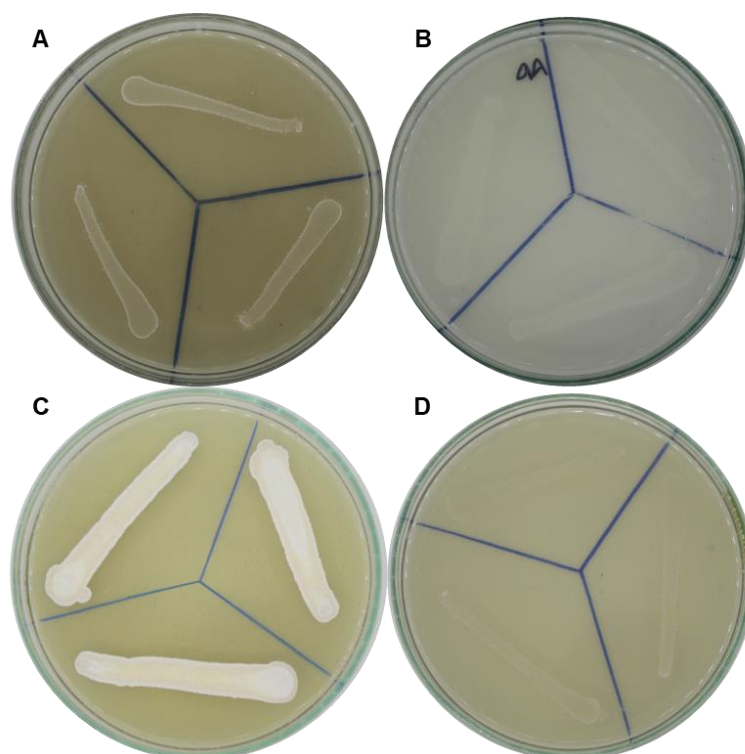


Figura 5 - BTM300, 7 dias de crescimento. **A** - controle negativos meio básico, **B** - controle negativo ágar-água, **C** - controle positivo (meio básico com glicose) e **D** - meio básico com arabinose sem crescimento (negativo).

Os dados morfológicos e bioquímicos das espécies-tipo selecionadas para este estudo foram obtidos na literatura e utilizados para comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

3.2.4 Caracterização Genotípica

Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada segundo Ausubel e colaboradores (2003), com algumas modificações. Colônias jovens (3 a 5 dias) crescidas em meio sólido ISP2 à 28 °C foram transferidas para microtubos, lavadas com 1 mL de água destilada estéril e centrifugadas a 10786 g por 5 minutos. O precipitado celular foi coletado e homogeneizado vigorosamente no vórtex por 5 minutos com 200 µL de tampão de lise (Triton 2%; SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0), 200 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e 150 mg de pérolas de vidro (0,5 - 1,0 mm). O lisado foi homogeneizado com 200 µL de tris-EDTA pH 8,0 (10:1) e, em

seguida, a fase aquosa foi separada por centrifugação (10786 g, 5 min, 4 °C) e transferida (350 µL) para outro microtubo. O DNA foi extraído uma vez com 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), centrifugado a 10786 g por 5 minutos a 4°C e a fase aquosa (350 µL) foi transferida para um novo microtubo. O DNA extraído foi tratado com 2 µL de enzima RNase (20 µg/mL) por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizado uma nova extração do DNA com 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi separada por centrifugação a 10786 g por 5 minutos a 4°C e transferida para um novo microtubo (350 µL). O DNA foi precipitado por 2 horas com 1 mL de etanol absoluto gelado a -20 °C. Após precipitação, o DNA foi centrifugado (10 minutos a 10786 g a 4°C), seco à temperatura ambiente, ressuscitado em 35 µL de tampão TE pH 8,0 (10:1) e armazenado a -20 °C.

Para analisar a pureza e quantificar o DNA, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris-Base, Ácido Bórico e EDTA 0,5M) comparadas com padrão de massa molecular (λ DNA; Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,6 µg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação (L-PIX EX, Loccus).

Amplificação dos genes 16S rRNA e *housekeeping*

Os fragmentos dos genes *housekeeping* e 16S rRNA foram amplificados a partir do DNA genômico pela técnica de PCR. Para amplificação do gene 16S rRNA, utilizou-se os primers 27F e 1492R (LANE, 1991). Para a análise de sequências multilocus foram amplificados os genes *atpD* (cadeia β da ATP sintase), *gyrB* (gene estrutural da subunidade β da DNA girase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase) e *trpB* (subunidade β da triptofano sintase) com os primers descritos por Guo e colaboradores (2008). As sequências dos primers utilizados neste estudo estão detalhados na Tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas utilizando GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega), seguindo as recomendações do fabricante para reações com volume final de 25 µL (10-20 ng de DNA genômico, 12,5 µL de GoTaq®, 10 pmol de cada primer e H₂O ultrapura q.s.p.). As condições de amplificação

variaram para o gene 16S rRNA (95°C por 2min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min) e *housekeeping* (95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, T °C por 30 s, 72°C por 90 s e extensão final a 72°C por 10 min), as diferentes temperaturas de anelamento dos primers dos genes *housekeeping* e os tamanhos dos produtos variaram de acordo com os pares de primers utilizados e estão detalhados na Tabela 2.

Os produtos da amplificação foram analisados e quantificados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo (0,6 µL/mL), visualizados e fotografados em sistema digital de fotodocumentação e comparados com padrão de massa molecular (λ DNA; Invitrogen).

Purificação de PCR e Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com 1 volume de acetato de amônia (7,5 M) e 3 volumes de etanol absoluto gelado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação por 15 minutos a 10786 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 3 volumes de etanol 70%. Após secagem a 37° C por 1 hora, os produtos de PCR foram ressuspensos em 20 µL de água ultrapura. Os fragmentos de DNA foram quantificados em gel de agarose 1% utilizando o padrão de massa molecular (λ DNA; Invitrogen).

As reações de sequenciamento foram realizadas em um sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystems) utilizando o kit de reação de sequenciamento *ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Read Reaction* (Applied Biosystems™). A mistura de reação (10 µL) continham 20 a 40 ng de DNA, 0,66 µL de BigDye, 10 pmol de primer (TABELA 2) e 2,34 µL de tampão. A reações foram realizadas em microplacas de 96 poços no termociclador a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 15 s, 50 °C por 30 s e 60°C por 90 s e uma extensão final a 60°C por 10 min. Após, 1 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço e os produtos de PCR foram precipitados por 15 min à temperatura ambiente. Após centrifugação (45 min a 2.200 g e 4 °C), os produtos de PCR foram lavados com 30 µL de 70% etanol, centrifugados (15 min a 1112 g e 4 °C),

secos por 1 h a 37°C e então, foram ressuspensos em 10 µL de formamida (High-Di™, Thermo Fisher Scientific) e desnaturados por 4 min a 95 °C. As amostras foram injetadas em um sequenciador usando polímero POP-7™ (Applied Biosystems) e os parâmetros de injeção padrão do equipamento.

Após o sequenciamento foram analisados os eletroferogramas obtidos de cada amostra, no programa BioEdit (HALL, 1999). Foram mantidas para as análises filogenéticas as sequências que possuíam mais de 600 nucleotídeos com boa resolução dos picos e baixo ruído ao longo da sequência no eletroferograma.

Análises das sequências

As sequências parciais dos genes 16S RNA ribossomal dos isolados de *Streptomyces* sp. obtidas do sequenciamento com os primers 27F e 1492R, foram utilizadas para a construção de *contigs*, editadas e revisadas para a formação de sequências únicas de nucleotídeos, utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências do gene 16S rRNA produzidas foram submetidas ao banco de dados *Ribosomal Database Project* para seleção das espécies-tipo (Type strain). Como grupo externo selecionou-se a espécie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Todas as sequências foram alinhadas e o alinhamento foi revisado e posteriormente, utilizado na construção das árvores filogenéticas usando o programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2011) e na construção da matriz de identidade de sequências no programa BioEdit (HALL, 1999).

Para realização das análises multilocus as sequências parciais dos genes *housekeeping* foram editadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e o programa BLAST-NCBI (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente, cada gene foi alinhado com as sequências parciais das espécies-tipo e do grupo externo, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. O tamanho das sequências de cada alinhamento foi normatizado e após a revisão, utilizadas na construção de árvores filogenéticas. Foram geradas árvores filogenéticas para cada um dos genes sequenciados e para análise multilocus as sequências dos genes *housekeeping* foram concatenadas formando sequências únicas e outra análise foi realizada concatenando o gene

16S rRNA e os genes *housekeeping*. As sequências foram alinhadas, editadas e revisadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e aplicadas para as árvores filogenéticas e matrizes de identidade de sequências.

As espécies-tipo (*Type strain*) foram selecionadas a partir do gene 16S rRNA utilizando RDP - *Sequence match*, banco de dados curado para o gene 16S rRNA disponível online (<https://rdp.cme.msu.edu/>), com score $\geq 0,9500$. O grupo externo (*outgroup*) *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi selecionado por pertencer à mesma ordem que o gênero *Streptomyces* sp. (Actinomycetales) e suas sequências foram extraídas do banco de dados Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), assim como as sequências dos genes 16S rRNA e *housekeeping* das espécies-tipo (ANEXO 1).

Todas as árvores filogenéticas foram construídas pelo método *Neighbor-Joining*, no programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2011), utilizando os modelos com menor valor de BIC (critério de informação bayesiano) e parâmetros gamma obtidos para cada análise de acordo com o sistema do programa. Utilizou-se de análises de *bootstrap* com 1000 repetições a fim de promover consistência e suporte aos ramos das árvores filogenéticas. Após o alinhamento dos dados foram produzidas matrizes de identidade de sequências pelo programa BioEdit (HALL, 1999) e estes resultados foram utilizados para comparação entre os isolados de *Streptomyces* sp. e as espécies-tipo relacionadas, descritas na literatura.

Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados para as ampliações por PCR e no sequenciamento dos diferentes genes.

Gene	Função*	Primers	Sequência (5'- 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>atpD</i>	Amp	<i>atpDPF</i> <i>atpDPR</i>	GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC GTGAACTGCTTGCGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA	998	63	GUO et al., 2008
	Seq	<i>atpDF</i>	ACCAAGGGCAAGGTGTTCAA			
<i>gyrB</i>	Amp	<i>gyrBPF</i> <i>gyrBPR</i>	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCGGCAAGTTCCGGC GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCCGGCTCCGCCAT	1305	65	
	Seq	<i>gyrBF-1</i>	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCA			
<i>recA</i>	Amp	<i>recAPF</i> <i>recAPR</i>	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC* GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG*	913	60	
	Seq	<i>recAPF</i>	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC			
<i>rpoB</i>	Amp	<i>rpoBPF</i> <i>rpoBPR</i>	GAGCGCATGACCACCAGGACGTGAGGC CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA	994	65	
	Seq	<i>rpoBPF</i>	GAGCGCATGACCACCAGGACGTGAGGC			
<i>trpB</i>	Amp	<i>trpBPF</i> <i>trpBPR</i>	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC	822	66	
	Seq	<i>trpBPF</i>	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA			
16S rRNA	Amp/seq	27f 1492r	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	~1500	55	LANE, 1991

* Amp - primers utilizados para a amplificação por PCR; Seq - primers utilizados para reação de sequenciamento.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização morfológica

As diferentes estirpes de *Streptomyces* são caracterizadas quanto a sua morfologia, esta auxilia na diferenciação de uma espécie para outra e são fundamentais na classificação das espécies do gênero. Os resultados morfológicos dos isolados de *Streptomyces* sp. associativos à *Baccharis trimera* foram comparados com dados morfológicos das espécies-tipo mais próximas, usadas nas análises genômicas, obtidos da literatura.

Em relação às observações macroscópicas, coloração do micélio de substrato, coloração de esporos e produção de pigmentos, houve variação entre os isolados de *Streptomyces* sp. (TABELA 3). O micélio de substrato apresentou tonalidades de creme a marrom para a maior parte dos isolados (BTM015, BTM036, BTM281, BTM300, BTM304, BTM412, BTM453, BTM462 e BTM471), entretanto, alguns apresentaram coloração diferenciada como preta, cinza e laranja (BTM288, BTM301, BTM551 e BTM467).

Quanto à coloração de esporos, percebe-se uma variação ao longo dos 21 dias de cultivo na maioria dos isolados. Durante o crescimento inicial das colônias as colorações variaram entre branco a marrom claro, que com o processo de esporulação se modificam para diferentes tonalidades de cinza (cinza claro, cinza escuro, cinza esverdeado), ou variações para coloração rosa (BTM294), salmão (BTM295 e BTM298) e roxo (BTM467) (TABELA 3). Foi possível observar nos isolados BTM 294, BTM301 e BTM 471, durante o período de incubação, a exsudação de gotículas metabólitos sobre as colônias (ANEXO 2).

A produção de pigmentos difusíveis no meio foi observada em 50% dos isolados (BTM 15, BTM 281, BTM 288, BTM 295, BTM 298, BTM 453, BTM 471 e BTM 551) sendo observada mudança de coloração do meio para amarelo escuro ou diferentes tonalidades de marrom.

A micromorfologia de hifas dos isolados avaliados neste estudo foi heterogênea quanto ao seu formato e assim como as características macroscópicas apresentaram variações, sendo classificadas em espirais, retilíneas ou flexíveis (ANEXO 2).

Tabela 3 – Caracterização morfológica dos isolados de *Streptomyces* sp. associados a *Baccharis trimera* e seu local de procedência na planta.

Isolados	Procedência	Micromorfologia de hifas	Cor da colônia	Cor do esporo	Cor do meio ISP2
BTM015	Endosfera	Flexível	bege	cinza/branco	marrom
BTM036	Rizosfera	Verticulada retilínea	marrom	branca/cinza escuro	-
BTM281	Solo	Espiral	marrom escuro	branca/cinza	marrom
BTM288	Rizosfera	Retilínea flexuosa	marrom/preto	branca/cinza	marrom
BTM294	Solo	Retilínea flexuosa	creme/bege	rosa/branca	-
BTM295	Solo	Retilínea em tufo	marrom	salmão/branca	amarelo escuro
BTM298	Solo	Retilínea em tufo	marrom	salmão	amarelo escuro
BTM300	Rizosfera	Retilínea	creme/bege	cinza claro	-
BTM301	Solo	Espiral em tufo	bege/marrom	cinza/branco	-
BTM304	Solo	Verticulada retilínea	creme/bege	branco/cinza	-
BTM412	Solo	Verticulada retilínea	marrom	branco/cinza escuro	-
BTM453	Endosfera	Flexível	marrom	cinza/branco	marrom claro
BTM462	Solo	Flexível	bege	branco	-
BTM467	Solo	Espiral	bege	roxo/branco	-
BTM471	Solo	Flexível	bege/marrom	branco/cinza	amarelo escuro
BTM551	Rizosfera	Espiral	marrom	cinza escuro	marrom

Análise da coloração da colônia, coloração de esporos e coloração do meio realizada ao longo da incubação dos isolados por 21 dias à 38°C, em meio ISP2. Micromorfologia de hifas realizada em meio ágar-água, após 21 dias de incubação à 38°C, visualizada por microscopia ótica (10X) e confirmada com MEV (15000X). (-) não houve variação na coloração do meio de cultura.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu confirmar a classificação dos arranjos de esporos formados pelas diferentes colônias de *Streptomyces*, observadas por microscopia ótica, além de visualizar com detalhes a micromorfologia das hifas outros detalhes como a liberação de matriz extracelular por algumas colônias (BTM 304 e BTM 462), a compactação da comunidade bacteriana, o formato dos esporos e a presença de vesículas nos esporos dos isolados BTM 288 e BTM 453 foram observadas (ANEXO 2).

3.3.2 Teste da Utilização de Fontes de Carbono

Todos os isolados deste estudo foram analisados bioquimicamente pelo teste de utilização de fontes de carbono (TABELA 4). Os dezesseis isolados estiveram de acordo com relação aos controles positivo e negativos. Houve variação quanto a utilização das diferentes fontes de carbono (glicose, arabinose, frutose, inositol manitol, rafinose, ramnose, sacarose e xilose) dentro do grupo de isolados do estudo. Apenas a glicose (controle positivo) dentre todos os açúcares testados foi positiva para todas as estirpes, os demais variam entre positivo (+), intermediário (+/-) ou negativo (-).

As estirpes BTM288, BTM304, BTM462 e BTM551 foram capazes de utilizar todas as fontes testadas. Percebe-se que algumas estirpes conseguem utilizar algumas fontes de carbono para se desenvolver, mas não de forma eficiente (crescimento intermediário), como os isolados BTM294, BTM295, BTM298 e BTM471 para o açúcar D-frutose, BTM301 e BTM471 durante seu crescimento em L-arabinose. O isolado BTM281 utilizou como fonte de carbono apenas o açúcar glicose, permanecendo com crescimento negativo durante os 21 dias do experimento para as demais fontes de carbono.

Tabela 4 – Teste de utilização de carbono dos isolados de *Streptomyces* sp.

ISOLADO	Controle- (AA)	Controle- (M. Básico)	Controle+ (Glicose)	Arabinose	Frutose	Inositol	Manitol	Rafinose	Ramnose	Sacarose	Xilose
BTM015	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
BTM036	-	-	+	+	+	-	+	+	+/-	+	+
BTM281	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BTM288	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BTM294	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-	+
BTM295	-	-	+	-	+/-	-	+	-	-	-	-
BTM298	-	-	+	-	+/-	-	+	-	-	-	-
BTM300	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
BTM301	-	-	+	+/-	+	+	+	-	+	-	+
BTM304	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BTM412	-	-	+	+	+	-	+	+	+/-	+	+
BTM453	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
BTM462	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BTM467	-	-	+	+	+	+/-	-	+	-	-	+
BTM471	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+
BTM551	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Crescimento positivo; (+/-) Crescimento intermediário; (-) Sem Crescimento. Isolados crescidos em meio básico contendo uma única fonte de carbono, avaliados a cada 7 dias durante a incubação de 21 dias à 38°C.

Durante o experimento foram observadas mudanças na coloração da cadeia de esporos e liberação de pigmentos solúveis no meio, variando entre fontes de carbono diferentes. A exemplo temos o isolado BTM467 (FIGURA 3) que apresentou esporos com coloração branca nos meios com glicose e arabinose e coloração roxa nos meios com inositol, rafnose, frutose e xilose. Liberação de pigmentos foi observada no isolado BTM304, que produziu um composto de coloração azul que se difundiu no meio de cultivo para todas as fontes de carbono analisadas.

3.3.3 Análise do gene 16S rRNA

As sequências do gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces sp.* variaram de 1366 a 1415 nucleotídeos (nt) entre os isolados (TABELA 5). Estas sequências foram alinhadas, editadas e normatizadas para segmentos de 1365 nt. Estas sequências foram utilizadas para a seleção de 128 espécies-tipo mais próximas (*similarity score* ≥ 0.9000), no *Ribosomal Database Project*, e posteriormente todos os segmentos foram utilizados em conjunto para o alinhamento múltiplo e construção de relações filogenéticas (ANEXO 3). Foi utilizado como *outgroup* a sequência do gene 16S rRNA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, (ANEXO 1). Das 128 espécies-tipo selecionadas inicialmente optou-se por incluir na análise filogenética apenas aquelas que possuíam, na matriz de identidade, valor acima de 98,5% com pelo menos um isolado BTM deste estudo. O valor de identidade ($>98,5\%$) está de acordo com Stackebrandt e Ebers (2006), que restabeleceram os parâmetros necessários para taxonomia de espécies bacterianas, baseados nas análises genômicas de hibridização DNA-DNA, porcentagem de G+C no genoma e identidade do gene 16S rRNA. Neste mesmo, foi definido que duas estirpes podem pertencer a mesma espécie se possuírem valores maiores que 98,5% de identidade de sequências do gene 16S rRNA. Com base neste parâmetro, foram selecionadas 87 espécies-tipo (ANEXO 1) e construiu-se a árvore filogenética e a matriz de identidade possibilitando melhor resolução filogenética dos isolados BTM.

Tabela 5 – Tamanho das sequências dos genes obtidos do sequenciamento de cada isolado

Isolados	16S rRNA*	<i>rpoB</i>	<i>recA</i>	<i>trpB</i>	<i>gyrB</i>	<i>atpD</i>
BTM015	1373	779	840	629	711	722
BTM036	1370	681	830	730	692	720
BTM281	1372	710	837	729	721	720
BTM288	1373	776	831	757	721	720
BTM294	1366	702	839	740	723	721
BTM295	1368	699	839	738	721	721
BTM298	1369	699	826	739	720	720
BTM300	1415	700	833	730	720	722
BTM301	1368	701	825	749	722	718
BTM304	1375	700	775	719	-	716
BTM412	1372	664	777	735	721	724
BTM453	1406	699	832	738	721	722
BTM462	1375	709	830	629	722	722
BTM467	1369	703	836	738	721	724
BTM471	1379	698	830	-	721	725
BTM551	1371	690	815	729	721	721

(*) Sequências obtidas após construção dos contigs com os primers 27F e 1492R. (-) Sequenciamento de baixa qualidade, não adicionado no estudo.

Com base na árvore filogenética do gene 16S rRNA (FIGURA 6) e na matriz de similaridade de sequências (TABELA 6), pode-se observar as estirpes BTM462 e BTM471 são mais distantes filogeneticamente das demais linhagens, inclusive das espécies-tipo de *Streptomyces sp.*, formando grupos de ramos isolados sem posicionamento preciso devido a baixos valores de *bootstrap* (grupo 9 e grupo 10, respectivamente). As demais estirpes BTM constituíram com as espécies-tipo 8 grupos, suportados com valores de *bootstrap* $\geq 50\%$. O grupo 1 foi constituído pelos isolados BTM015, BTM301, BTM453 e as espécies-tipo *S. panaciradicis*, *S. graminisoli*, *S. rhizophilus* e *S. gramineus*. Os valores de similaridade de sequência foram 99,4% entre BTM015 e *S. panaciradicis*, 96,2% entre BTM301 e *S. graminisoli* e 99,9% entre BTM453 e *S. gramineus*. O grupo 2 foi composto pelo isolado BTM551 e as espécies *S. kaempferi*, *S. mirabilis* e *S. olivochromogenes* (valor de *bootstrap*, 77%), sendo mais similar a *S. kaempferi* (valor de identidade, 99,1%). O grupo 3 (valor de *bootstrap*, 66%) foi formado pelo isolado BTM288 e as espécies *S. canus*, *S. ciscausicus*, *S. phaeopurpurens* e *S. griseorubiginosus*, com maior similaridade (99,1%) com a espécie *S. griseorubiginosus*. O grupo 4 (valor de *bootstrap*, 100%) foi constituído pelos

isolados BTM036 e BTM412 e as espécies *S. griseoluteus*, *S. recifenses* e *S. seoulensis*. Os isolados neste grupo mostraram entre si valor de similaridade de 100% e ambas foram mais próximas a espécie *S. recifenses* (99,9% de similaridade). O isolado BTM304 e as espécies *S. chartreusis*, *S. prunicolor* e *S. graminifolli* formaram o grupo 5 (valor de *bootstrap*, 50%) sendo mais próximo (99,7% de similaridade de sequências) com a espécie *S. prunicolor*. O grupo 6 (valor de *bootstrap*, 56%) foi composto pelo isolado BTM281 e as espécies *S. colombiensis*, *S. goshikiensis*, *S. sporoverrucosus* e *S. lavendulae*, sendo a sequência de BTM281 100% similar àquela de *S. goshikiensis*. O grupo 7 (valor de *bootstrap*, 69%) foi formado pelos isolados BTM294, BTM295 e BTM298 e as espécies tipo *S. cirratus* e *S. vinaceus*, os isolados apresentaram para as duas espécies-tipo os mesmos valores de similaridade de sequências, BTM294 (99,7%), BTM295 (100%) e BTM298 (99,8%) e grupo 8 (valor de *bootstrap*, 73%) formado pelo isolado BTM300, BTM467 (98,6% de identidade entre si) e as espécies *S. mauvecolor*, *S. xanthochromogenes* e *S. michiganensis*, ambos os isolados possuem maior similaridade com *S. mauvecolor* (99% e 99,6%, respectivamente).

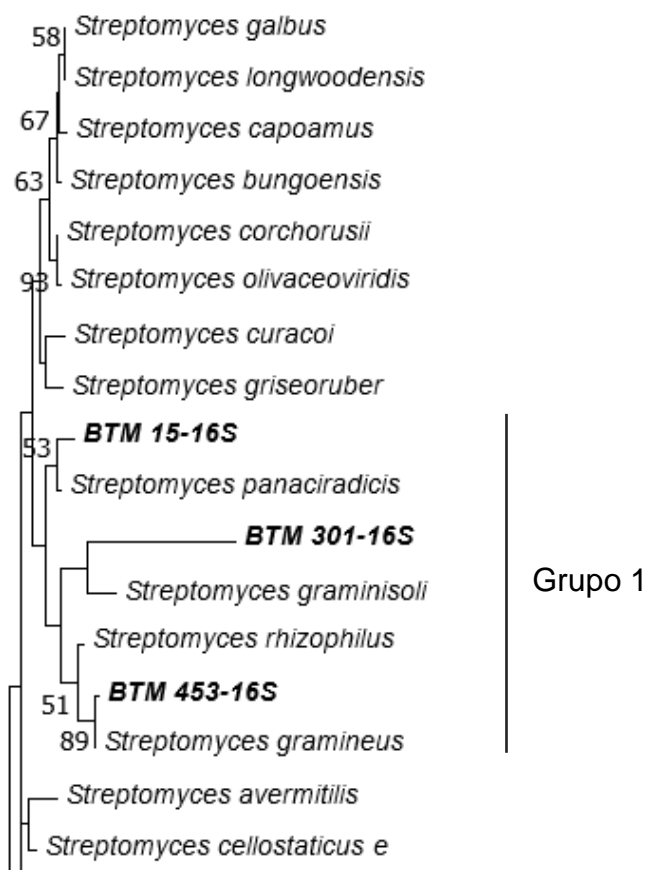


Figura 6a – Árvore filogenética do gene 16S rRNA (continua)

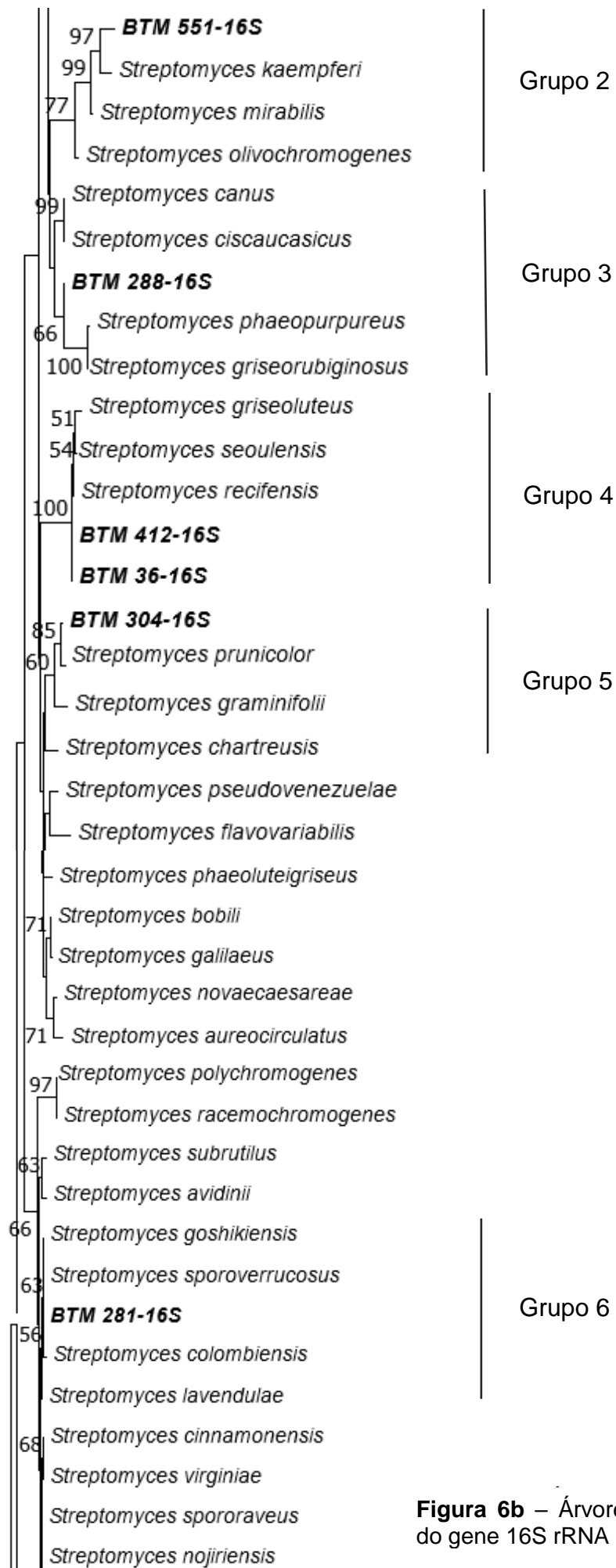
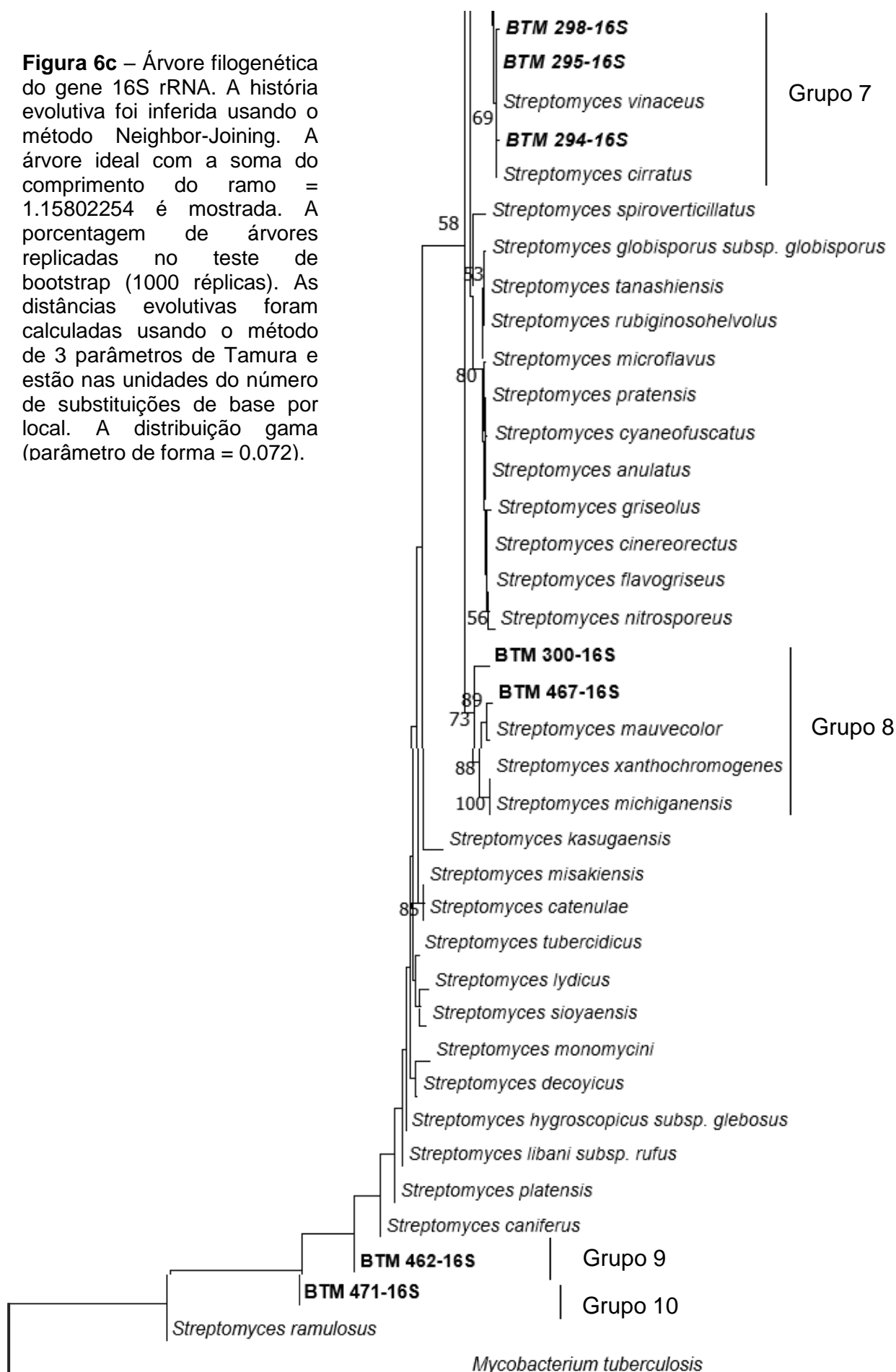


Figura 6b – Árvore filogenética do gene 16S rDNA (continua)

Figura 6c – Árvore filogenética do gene 16S rRNA. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 1.15802254 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas no teste de bootstrap (1000 réplicas). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 3 parâmetros de Tamura e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A distribuição gama (parâmetro de forma = 0.072).



Streptomyces sp. diferencia-se de outros gêneros bacterianos por possuir bactérias com alto nível de similaridade com relação ao gene 16S rRNA, em alguns casos espécies diferentes, mas estritamente relacionadas compartilham similaridade >99% para o gene (LABEDA et. al. 2012). Nos grupos formados na árvore filogenética e a matriz de similaridade do gene 16S rRNA observou-se que os isolados BTM apresentaram com as espécies-tipo valores >99% de similaridade, sendo, portanto, altamente relacionadas, com exceção do BTM301 que possui 96,2% como maior valor de similaridade com *S. graminilosi* (TABELA 7). As estirpes que se alocaram isoladamente na árvore filogenética construída foram comparadas com as espécies-tipo posicionadas mais próximas, BTM462 e BTM471 apresentaram entre si similaridade de 99,9% e com a espécie-tipo *S. caniferus* 99,7% e 99,8%, respectivamente.

Tabela 6 - Matriz de identidade de sequências (%) do gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* sp. e de espécies-tipo dos grupos formados na árvore filogenética do gene 16S rRNA.

Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1 BTM015-16S	ID																								
2 BTM036-16S	97,	ID																							
3 BTM281-16S	97,	97,	ID																						
4 BTM288-16S	7	8	8	ID																					
5 BTM294-16S	98,	98,	98,	98,																					
6 BTM295-16S	1	0	2	1	ID																				
7 BTM298-16S	97,	97,	99,	98,	0	ID																			
8 BTM300-16S	4	6	4	0	98	99,																			
9 BTM301-16S	97,	97,	99,	98,	99,	99,	ID																		
10 BTM304-16S	7	8	7	2	7	99,8	98,	ID																	
11 BTM412-16S	8	9	5	4	6	99,8	98,	98,	ID																
12 BTM453-16S	97,	97,	98,	97,	98,	98,	98,	98,	95,	93,	ID														
13 BTM462-16S	4	7	2	1	1	98,3	2	ID																	
14 BTM467-16S	94,	94,	95,	95,	95,	95,4	5	8	ID																
15 BTM471-16S	9	8	3	4	1	95,4	5	8	98,	97,	95,	ID													
16 BTM551-16S	97,	97,	98,	99,	98,	98,	98,	97,	94,	97,	94,	97,	97,	ID											
17 S. gramineus	8	9	4	1	0	98,2	4	2	5	ID															
18 S. rhizophilus	97,	97,	98,	97,	97,	97,	97,	97,	94,	97,	97,	97,	97,	97,	ID										
19 S. colombiensis	7	100	8	0	6	97,8	9	7	8	9	ID														
20 S. phaeopurpureus	98,	98,	97,	96,	97,	97,	97,	96,	95,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	ID									
21 S. canus	3	0	3	9	1	97,3	4	8	3	1	0	ID													
22 S. caniferus	96,	96,	96,	96,	96,	96,8	8	1	1	5	7	9	ID												
23 S. goshikiensis	97,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	98,	94,	97,	97,	96,	97,	97,	97,	97,	ID								
24 S. goshikiensis	1	2	9	1	7	97,9	8	7	0	4	2	8	6	ID											
	0	8	0	5	7	96,9	9	1	1	6	8	0	9	7	ID										
	97,	97,	96,	97,	96,	96,	96,	97,	94,	97,	97,	96,	96,	97,	96,	96,	97,	ID							
	4	2	5	7	5	96,7	8	4	3	0	2	3	2	6	3	ID									
	98,	98,	97,	97,	97,	97,	97,	96,	95,	97,	98,	99,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	ID						
	2	1	4	0	1	97,4	5	9	3	2	1	9	8	8	9	2	ID								
	98,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	95,	97,	97,	99,	96,	97,	96,	96,	99,	99,	ID						
	5	7	8	3	6	97,8	9	4	3	7	7	2	8	0	8	4	3	ID							
	97,	97,	99,	98,	99,	99,	99,	98,	95,	98,	97,	97,	96,	97,	97,	96,	97,	97,	97,	ID					
	7	8	9	1	4	99,6	4	1	3	3	8	3	9	8	0	5	4	7	ID						
	97,	97,	97,	99,	97,	97,	97,	96,	95,	98,	97,	96,	96,	96,	96,	97,	96,	96,	96,	97,	ID				
	3	4	7	0	3	97,5	7	3	3	5	4	2	2	5	2	1	3	5	6	ID					
	97,	98,	98,	99,	97,	98,	97,	95,	98,	98,	96,	96,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	97,	98,	98,	ID			
	7	2	2	1	8	98,0	2	1	2	8	2	9	5	0	6	7	0	1	2	7	ID				
	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	97,	95,	96,	96,	96,	99,	97,	99,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,
	8	6	8	4	5	96,8	8	0	0	5	6	8	7	5	8	2	8	7	8	1	96,5	ID			
	97,	97,	98,	99,	99,	99,	99,	98,	95,	98,	97,	97,	96,	97,	97,	96,	97,	97,	97,	99,	97,	97,	96,	96,	96,
	7	8	100	2	4	99,7	5	2	3	4	8	3	9	9	0	5	4	8	9	7	98,2	8	ID		

2		97,	97,	99,	98,	99,	99,	98,	95,	98,	97,	97,	96,	97,	96,	96,	97,	97,	99,	97,	96,	99,				
4	<i>S. vinaceus</i>	7	8	7	2	7	100	8	3	4	2	8	3	8	9	9	7	4	8	6	5	98,0	8	7	ID	
2		97,	99,	97,	97,	97,	97,	97,	95,	97,	99,	97,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	96,	97,	97,	
5	<i>S. griseoluteus</i>	4	7	6	8	4	97,6	7	4	1	7	7	8	6	0	7	0	9	4	6	1	98,0	5	6	6	
2		97,	99,	97,	97,	97,	97,	97,	95,	97,	99,	97,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	97,	96,	97,	97,	
6	<i>S. seoulensis</i>	4	7	7	9	5	97,7	9	4	1	9	7	8	5	0	5	0	9	4	7	3	98,2	4	7	7	
2	<i>S.</i>	97,	97,	99,	98,	99,	99,	98,	95,	98,	97,	97,	96,	97,	96,	96,	97,	97,	99,	97,	97,	99,	97,	96,	99,	99,
7	<i>sporoverrucosus</i>	7	7	9	1	4	99,6	4	1	2	3	7	2	8	8	9	5	3	7	8	6	98,2	8	9	6	
2		97,	99,	97,	97,	97,	97,	97,	94,	97,	99,	97,	96,	97,	96,	97,	98,	97,	97,	97,	97,	97,	96,	97,	97,	
8	<i>S. recifensis</i>	6	9	7	9	5	97,7	9	6	8	9	9	9	6	1	7	1	0	6	7	3	98,2	5	7	7	
2		96,	96,	96,	96,	96,	96,	97,	95,	96,	96,	96,	99,	97,	99,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	99,	96,	96,	
9	<i>S. decoyicus</i>	9	6	8	5	6	96,8	8	0	0	5	6	9	4	4	5	1	8	7	8	1	96,5	4	8	8	
3		97,	97,	98,	98,	98,	98,	97,	95,	99,	97,	97,	96,	97,	96,	97,	98,	97,	98,	98,	98,	98,	96,	98,	98,	
0	<i>S. prunicolor</i>	6	8	3	8	1	98,3	5	1	4	7	8	0	4	3	5	9	1	6	2	5	98,5	3	3	3	
3		97,	97,	97,	97,	97,	97,	99,	93,	97,	97,	96,	97,	99,	97,	97,	96,	97,	97,	96,	97,	97,	97,	97,	97,	
1	<i>S. mauvecolor</i>	1	5	9	1	6	97,8	7	0	9	4	5	8	5	7	6	7	8	0	8	5	97,3	4	9	8	
	<i>S.</i>																									
3	<i>xanthochromogenes</i>	97,	97,	97,	97,	97,	97,	98,	94,	97,	97,	96,	97,	99,	97,	97,	96,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	97,	97,	
2		4	4	7	4	4	97,7	5	7	0	4	4	6	1	0	2	9	7	8	6	7	97,4	1	7	7	
3		97,	98,	98,	99,	97,	98,	97,	95,	98,	98,	96,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	98,	98,	98,	98,	96,	98,	98,	
3	<i>S. ciscaucasicus</i>	7	2	2	1	8	98,0	2	1	2	8	2	9	5	0	6	7	0	1	2	7	100	5	2	0	
3		98,	97,	96,	97,	96,	97,	96,	96,	97,	98,	96,	96,	96,	96,	96,	98,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	96,	
4	<i>S. graminisoli</i>	3	0	8	0	7	96,9	1	3	2	8	0	7	7	2	8	3	6	6	8	4	96,8	6	8	9	
3		97,	96,	97,	96,	96,	97,	96,	95,	96,	96,	97,	99,	97,	99,	96,	97,	96,	97,	96,	97,	96,	99,	97,	97,	
5	<i>S. ramulosus</i>	1	5	2	3	9	97,1	1	9	4	4	5	1	5	4	6	2	0	9	2	0	96,4	4	2	1	
3		97,	98,	98,	98,	98,	98,	97,	95,	98,	98,	97,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	98,	98,	98,	98,	96,	98,	98,	
6	<i>S. chartreusis</i>	6	5	4	8	2	98,4	5	5	2	9	5	3	8	6	9	3	4	9	3	1	98,6	8	4	4	
3		97,	97,	97,	97,	97,	97,	98,	94,	97,	97,	96,	97,	99,	97,	97,	96,	96,	97,	96,	97,	96,	97,	97,	97,	
7	<i>S. michiganensis</i>	4	4	7	4	4	97,7	5	7	0	4	4	6	1	0	2	9	7	8	6	7	97,4	1	7	7	
3		97,	97,	97,	98,	96,	97,	97,	94,	97,	97,	96,	96,	97,	96,	99,	96,	96,	97,	97,	97,	96,	97,	97,	97,	
8	<i>S. mirabilis</i>	8	8	1	1	8	97,1	2	9	5	6	8	8	5	9	5	2	8	9	0	6	98,1	4	1	1	
3	<i>S.</i>	97,	97,	97,	99,	97,	97,	96,	95,	98,	97,	96,	96,	96,	96,	97,	96,	96,	97,	99,	99,	99,	96,	97,	97,	
9	<i>griseorubiginosus</i>	4	4	7	1	4	97,6	7	4	4	6	4	3	2	6	3	2	4	6	7	9	98,8	2	7	6	
4		96,	97,	99,	97,	98,	98,	97,	94,	97,	97,	96,	96,	97,	96,	95,	96,	97,	99,	96,	96,	99,	96,	99,	98,	
0	<i>S. lavendulae</i>	9	1	1	4	7	98,9	8	5	6	5	1	6	3	1	4	8	7	1	0	8	97,4	2	1	9	
4	<i>S.</i>	97,	97,	97,	98,	97,	97,	97,	95,	98,	97,	96,	96,	97,	96,	98,	96,	96,	97,	98,	98,	96,	97,	97,	97,	
1	<i>olivochromogenes</i>	7	9	7	8	4	97,7	8	4	1	2	9	5	2	6	3	7	6	7	6	2	98,5	2	7	7	
4		97,	97,	96,	97,	96,	96,	97,	94,	97,	97,	96,	97,	97,	97,	99,	96,	96,	96,	97,	96,	96,	96,	96,	96,	
2	<i>S. kaempferi</i>	2	2	7	7	6	96,8	8	4	9	0	2	2	0	6	1	1	2	4	6	3	97,7	9	7	8	
4		99,	98,	97,	98,	97,	98,	97,	95,	97,	98,	98,	96,	97,	96,	97,	98,	98,	97,	97,	97,	97,	96,	97,	97,	
3	<i>S. panaciradicis</i>	4	2	8	2	7	97,9	0	9	0	9	2	1	7	2	8	5	2	5	7	4	98,1	6	8	9	
4		97,	98,	98,	98,	97,	98,	97,	95,	99,	98,	97,	96,	97,	96,	96,	97,	97,	98,	98,	98,	98,	96,	98,	98,	
4	<i>S. graminifolii</i>	2	3	1	6	9	98,1	2	1	5	3	3	6	8	5	8	7	6	1	0	0	98,3	7	1	1	
4		97,	97,	99,	98,	99,	99,	98,	95,	98,	97,	97,	96,	97,	96,	96,	97,	97,	99,	97,	97,	97,	96,	99,	97,	
5	<i>S. cirratus</i>	7	8	7	2	7	100	8	3	4	2	8	3	8	9	9	7	4	8	6	5	98,0	8	7	100	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	

Matriz de similaridade de seqüências obtida após o alinhamento dos fragmentos do gene 16S rRNA dos isolados e das espécies-tipo mais próximas, no programa BioEdit.

(Continua)

Tabela 6 - Matriz de identidade de sequências (%) do gene 16S rRNA dos isolados de *Streptomyces* sp. e de espécies-tipo dos grupos formados na árvore filogenética do gene 16S rRNA.

	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45		
25	ID																						
26	99,7	ID																					
27	97,5	97,7	ID																				
28	99,7	99,7	97,7	ID																			
29	96,5	96,4	96,8	96,5	ID																		
30	97,6	97,7	98,2	97,7	96,3	ID																	
31	97,3	97,3	97,8	97,4	97,4	97,1	ID																
32	97,1	97,1	97,6	97,3	97,1	97,2	99,3	ID															
33	98,0	98,2	98,2	98,2	96,5	98,5	97,3	97,4	ID														
34	96,8	96,8	96,8	96,9	96,6	96,7	96,1	96,4	96,8	ID													
35	96,5	96,3	97,1	96,5	99,1	96,2	97,4	97,1	96,4	96,8	ID												
36	98,3	98,5	98,3	98,5	96,8	98,8	97,6	97,4	98,6	96,7	96,7	ID											
37	97,1	97,1	97,6	97,3	97,1	97,2	99,3	100	97,4	96,4	97,1	97,4	ID										
38	97,6	97,6	97,0	97,7	96,3	97,4	98,2	98,2	98,1	96,5	96,5	97,8	98,2	ID									
39	97,2	97,4	97,7	97,4	96,2	98,5	96,6	96,8	98,8	96,5	96,1	98,2	96,8	97,7	ID								
40	96,8	97,0	99,0	97,0	96,2	97,4	97,1	96,9	97,4	96,2	96,6	97,7	96,9	96,3	96,8	ID							
41	97,7	97,9	97,6	97,9	96,1	98,0	97,6	97,7	98,5	96,4	96,2	98,4	97,7	99,3	98,3	96,8	ID						
42	97,1	97,0	96,6	97,1	96,8	96,9	97,7	97,9	97,7	96,2	97,0	97,3	97,9	99,2	97,4	95,9	98,7	ID					
43	97,9	97,9	97,7	98,1	96,7	97,7	97,5	97,9	98,1	98,2	96,8	97,8	97,9	98,1	97,5	97,1	97,7	97,5	ID				
44	98,1	98,2	98,0	98,2	96,8	99,1	97,5	97,1	98,3	96,8	96,6	98,9	97,1	97,3	98,1	97,4	97,9	96,7	97,4	ID			
45	97,6	97,7	99,6	97,7	96,8	98,3	97,8	97,7	98,0	96,9	97,1	98,4	97,7	97,1	97,6	98,9	97,7	96,8	97,9	98,1	ID		

3.3.4 Análise de Sequências Multilocus (MLSA)

MLSA dos genes *Housekeeping*

As análises multilocus (MLSA) dos isolados BTM de *Streptomyces* sp. foram realizadas com cinco genes *housekeeping*, os genes *atpD*, *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *trpB*, conforme Guo e colaboradores (2008). A análise dos genes *gyrB* do BTM304 e *trpB* do BTM 471 ainda não foram finalizadas, pois o sequenciamento gerou sequências de baixa qualidade e necessitam ser refeitos. As sequências obtidas dos genes *rpoB*, *recA*, *atpD*, *gyrB* e *trpB* dos isolados deste estudo e das estirpes de espécies-tipo selecionadas (ANEXO 1), foram alinhadas, normatizadas e editadas para a construção de árvore filogenética de cada gene isoladamente (ANEXO 4), posteriormente as sequências foram concatenadas em sequências únicas de 2449 nucleotídeos, alinhadas e utilizadas na construção da árvore filogenética MLSA (FIGURA 7) e matriz de identidade de sequências (ANEXO 5).

A análises filogenéticas dos genes *housekeeping* possibilitaram avaliar a relação dos isolados com as espécies-tipo já descritas. Na árvore filogenética os isolados estudados formaram 10 agrupamentos, porém, as estirpes BTM300, BTM453, BTM462 e BTM551, ficaram posicionadas em grupos da árvore filogenética com baixos valores de *bootstrap* (< 50%). Observa-se pela matriz de identidade de sequências do MLSA (ANEXO 5) a alta similaridade entre algumas espécies-tipo do gênero *Streptomyces*.

Com base nos agrupamentos formados pelos isolados BTM e as espécies-tipo de *Streptomyces* sp. foi observado a proximidade filogenética dos isolados BTM com 29 espécies de *Streptomyces* já descritas. O grupo A (valor de *bootstrap*, 97%) foi constituído por BTM288, *S. canus*, *S. ciscaucasicus*, *S. pseudovenezuelae*, *S. phaeopurpureus*, *S. griseorubiginosus*, sendo BTM288 altamente relacionada com *S. pseudovenezuelae* (valor *bootstrap* no ramo, 73% e valor de similaridade, 96,8%). Grupo B é formado por BTM453, BTM551, *S. mirabilis*, *S. aureocirculatus* e *S. prunicolor*, possuindo entre si similaridade de 97,6%. O grupo C (valor de *bootstrap*, 85%) é composto por BTM015, BTM301 e as espécies *S. globosus*, *S. graminisoli*, *S. gramineus* e *S. rhizophilus* os isolados possuem entre si 92,3% de similaridade, e com as espécies-tipo o BTM015 possui maior similaridade com *S. graminisoli* e o

BTM301 com *S. globosus*, 95,4% e 93,1%, respectivamente. Constituído por BTM036, BTM412, *S. seoulensis*, *S. griseoluteus* e *S. recifenses* foi formado o grupo D (valor de *bootstrap*, 97%), entre si os isolados do estudo apresentam 99,7% de valor de similaridade de sequências e ambas se assemelham mais a *S. recifensis* (valor de similaridade, 99,4%). O grupo E contém o isolado BTM300 e a espécie *S. tanashiensis* com similaridade de sequência MLSA de 90,8%.

Diferente do observado para o gene 16S rRNA as estirpes BTM294, BTM295 e BTM298 não permaneceram agrupadas para a análise MLSA, BTM294 ficou alocado ao grupo F (valor de *bootstrap*, 95%) com as espécies tipo *S. katrae*, *S. polychromogenes* e *S. racemochromogenes*, e maior identidade com *S. racemochromogenes* (valor de similaridade, 95,8%). O grupo G (valor de *bootstrap*, 99%) foi constituído por BTM281, *S. goshikiensis* e *S. sporoverrucosus* com valores de similaridade de sequências de 99,4%, para ambas as espécies. Formando o grupo H temos os isolados BTM295 e BTM298 (99,4% similares entre si) com as espécies-tipo *S. cirratus* e *S. colombiensis*, ambos os isolados possuem maior proximidade (95,9% de similaridade) com *S. colombiensis*. O isolado BTM467, *S. mauvecolor*, *S. xantochromogenes* e *S. michiganensis*, constituem o grupo I (valor de *bootstrap*, 99%), sendo BTM467 mais relacionada com *S. mauvecolor* (valor de *bootstrap* do ramo, 99% e valor de similaridade, 97,6%). O último grupo construído na árvore de MLSA dos genes *housekeeping*, grupo J, foi formado por BTM462, *S. libani subsp. libani*, *S. nigrescens* e *S. decoyicus*, possuindo maior similaridade com *S. decoyicus* (valor de identidade, 95,2%).

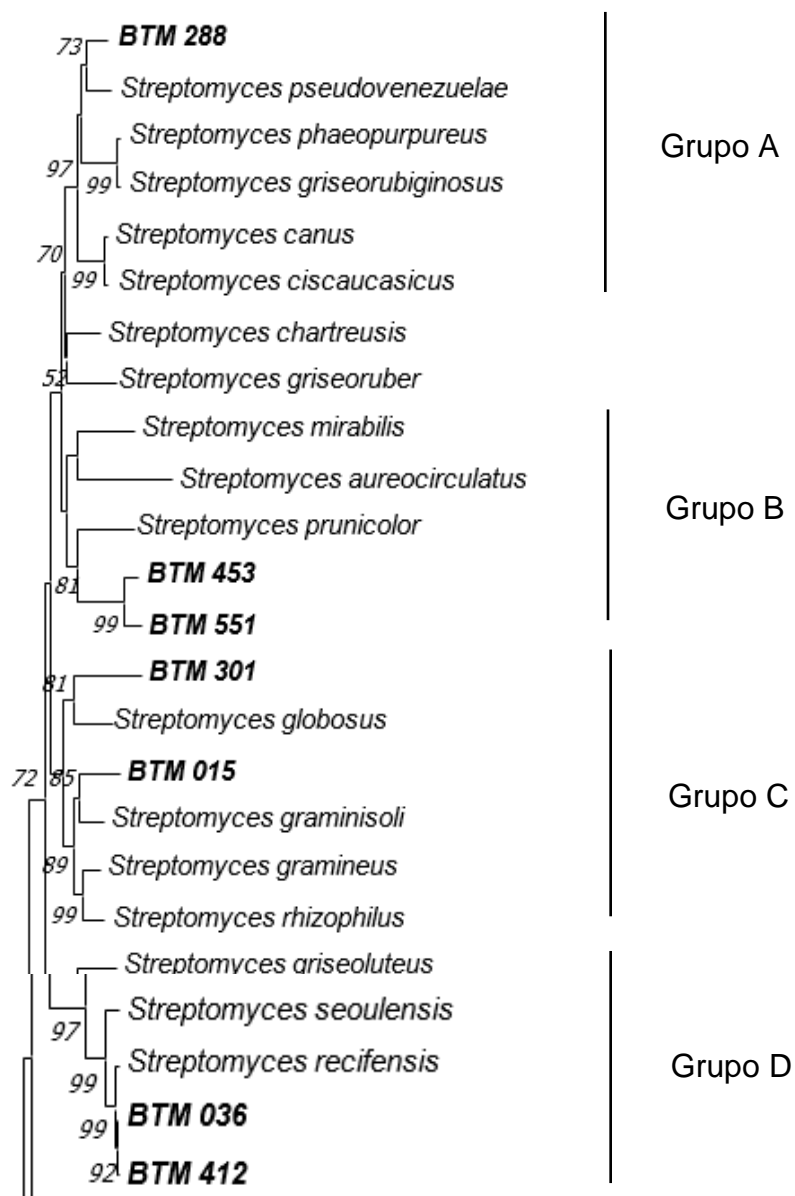


Figura 7a – Árvore filogenética de MLSA com 5 genes *housekeeping* (continua).

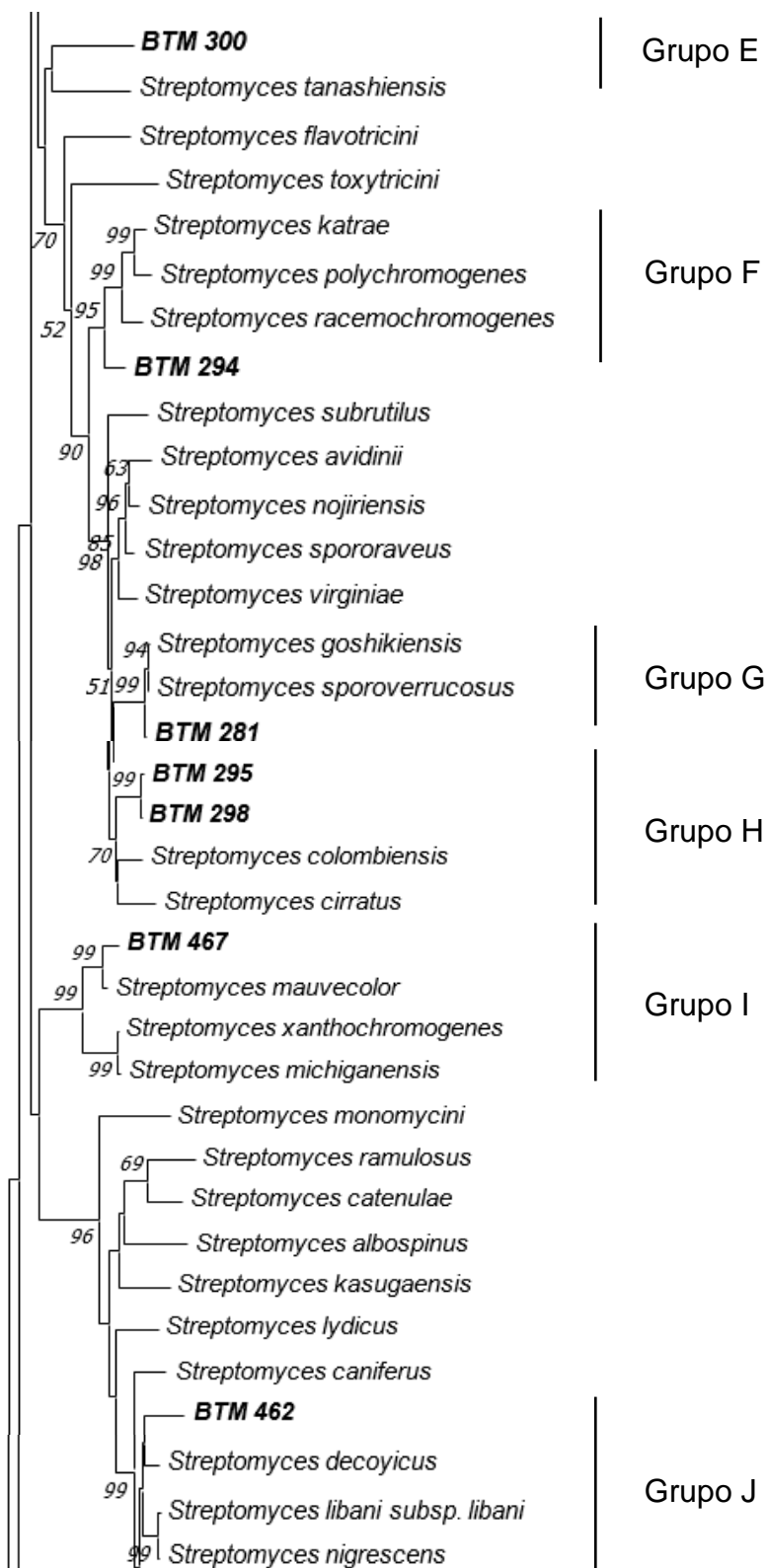


Figura 7b – Árvore filogenética de MLSA com 5 genes *housekeeping* (continua).

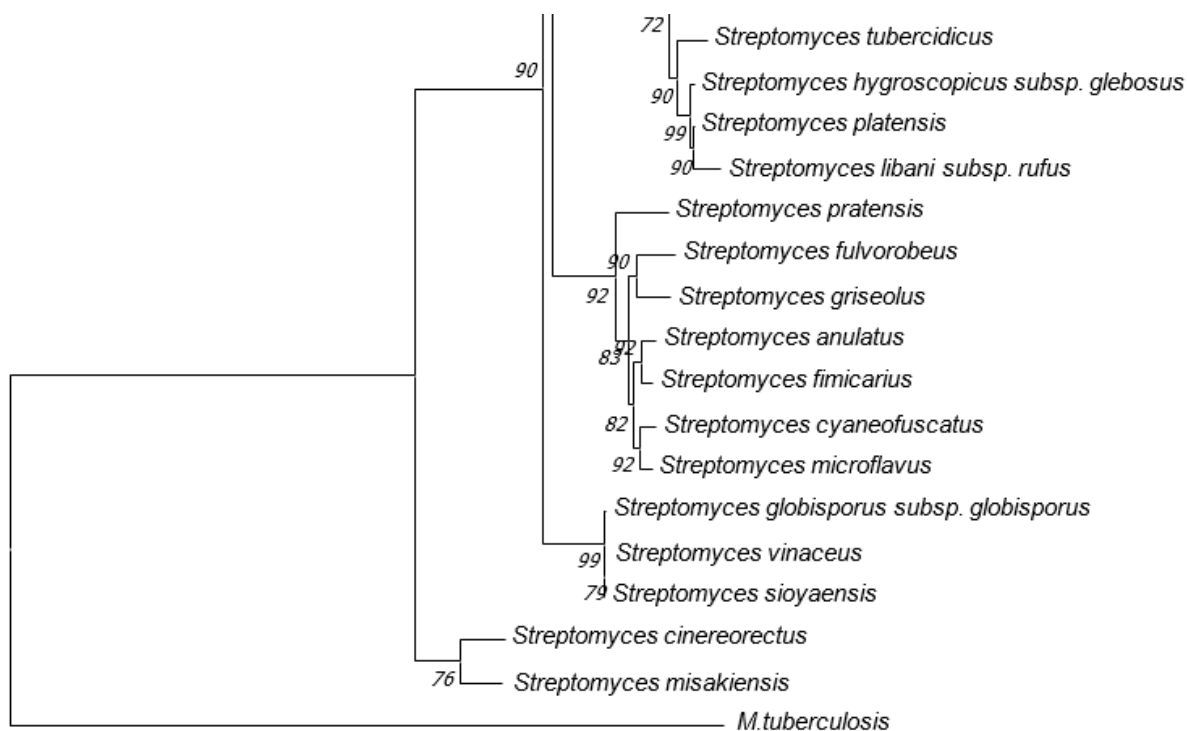


Figura 7c – Árvore filogenética da análise de sequências multilocus (MLSA) de 5 genes *housekeeping* (*recA*, *trpB*, *rpoB*, *gyrB* e *atpD*). A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 3.63815018 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas no teste de bootstrap (1000 réplicas). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1944).

Análise MLSA Genes *housekeeping* e 16S rRNA

A construção da árvore filogenética e matriz de identidade foram realizadas após concatenação dos genes *housekeeping* *rpoB*, *recA*, *trpB*, *gyrB*, *atpD* e gene 16S rRNA (ANEXO 6), no programa MEGA7 e BioEdit, formando sequências de únicas com 3814 nucleotídeos, dos isolados de estudo e das espécies tipo de *Streptomyces* sp.

Os grupos formados com os isolados de *Streptomyces* do estudo na árvore filogenética formada com os 6 genes, foram semelhantes ao observado na árvore de MLSA dos genes *housekeeping*.

Os dados obtidos das relações filogenéticas existentes entre os isolados BTM e as espécies-tipo foram utilizados, avaliando-se com os padrões de corte definidos para o gene 16S rRNA (>98,5%) e para análise MLSA (≥99,3%), para inferir quais dos isolados BTM são representantes de grupos de espécies validadas e quais possivelmente sejam candidatos a novas espécies (TABELA 7).

Tabela 7 - Relações filogenéticas entre os isolados de *Streptomyces* sp. associados a *Baccharis trimera* e as espécies-tipo mais próximas.

Isolado	Procedência	Grupo árvore 16S rRNA	Espécie-tipo mais relacionada**	Grupo árvore MLSA	Espécie-tipo mais relacionada**	Candidato a nova espécie?
BTM015	Endosfera	grupo 1	<i>S. panaciradicis</i> (99,4%)	grupo C	<i>S. graminilosi</i> (95,4%)	Sim
BTM036	Rizosfera	grupo 4	<i>S. recifensis</i> (99,9%)	grupo D	<i>S. recifensis</i> (99,4%)	<i>S. recifenses</i>
BTM281	Solo	grupo 6	<i>S. goshikiensis</i> (100%)	grupo G	<i>S. goshikiensis</i> (99,4%)	<i>S. goshikiensis</i>
BTM288	Rizosfera	grupo 3	<i>S. griseorubuginosus</i> (99,1%)	grupo A	<i>S. pseudovenezuelae</i> (96,8%)	Sim
BTM294	Solo	grupo 7	<i>S. cirratus</i> ; <i>S. vinaceus</i> (99,7%)	grupo F	<i>S. racemochromogenes</i> (95,8%)	Sim
BTM295	Solo	grupo7	<i>S. cirratus</i> ; <i>S. vinaceus</i> (100%)	grupo H	<i>S. colombiensis</i> (95,9%)	Sim
BTM298	Solo	grupo 7	<i>S. cirratus</i> ; <i>S. vinaceus</i> (99,8%)	grupo H	<i>S. colombiensis</i> (95,9%)	Sim
BTM300	Rizosfera	grupo 8	<i>S. mauvecolor</i> (99%)	grupo E	<i>S. tanashiensis</i> (90,8%)	Sim
BTM301	Solo	grupo 1	<i>S. graminilosi</i> (96,2%)	grupo C	<i>S. globosus</i> (93,1%)	Sim
BTM304	Solo	grupo 5	<i>S. prunicolor</i> (99,7%)	-	<i>S. prunicolor</i> * (97,1%)	
BTM412	Solo	grupo 4	<i>S. recifensis</i> (99,9%)	grupo D	<i>S. recifensis</i> (99,3%)	<i>S. recifensis</i>
BTM453	Endosfera	grupo 1	<i>S. gramineus</i> (99,9%)	grupo B	<i>S. kaempferi</i> (95,1%)	Sim
BTM462	Solo	grupo 9	<i>S. caniferus</i> (99,7%)	grupo J	<i>S. decoyicus</i> (95,2%)	Sim
BTM467	Solo	grupo 8	<i>S. mauvecolor</i> (99,7%)	grupo I	<i>S. mauvecolor</i> (97,6%)	Sim
BTM471	Solo	grupo 10	<i>S. caniferus</i> (99,8%)	-	<i>S. caniferus</i> * (95,5%)	Sim
BTM551	Rizosfera	grupo 2	<i>S. kaempferi</i> (99,1%)	grupo B	<i>S. kaempferi</i> (96,8%)	Sim

(**) valores de similaridade obtidos das matrizes de similaridade de sequências do gene 16S rRNA e MLSA. (*) Similaridade de sequências da análise MLSA realizada com a concatenação de 4 genes *housekeeping*.

3.4 DISCUSSÃO

As relações filogenéticas das espécies de *Streptomyces* foram baseadas nas árvores filogenéticas e na similaridade de sequências do gene 16S rRNA, considerando o limiar >98,5% como o primeiro parâmetro para que duas estirpes possam pertencer a mesma espécie. A análise MLSA das estirpes de *Streptomyces* foi proposta como uma metodologia mais acessível para avaliar a filogenia e a taxonomia das bactérias. Há uma forte correlação entre os dados das metodologias de HDD e MLSA (STACKEBRANDT; EBERS, 2006, THOMPSON et al., 2013). O valor de corte de 70% de HDD corresponde a uma distância MLSA de cinco genes de 0,007 que se refere à similaridade de 99,3% de sequências de nucleotídeos concatenadas (THOMPSON, 2013, LABEDA et al., 2016). Neste estudo, as sequências parciais de cinco genes *housekeeping* (*rpoB*, *trpB*, *atpD*, *gyrB* e *recA*) e o gene 16S rRNA foram usadas para construção de árvores filogenéticas de sequências concatenadas. Foram consideradas mesmas espécies, quando comparadas as espécies-tipo, a princípio, as estirpes que possuem os parâmetros de similaridade do gene 16S rRNA (> 98,5%) e identidade de sequências MLSA com valor $\geq 99,3\%$. De forma complementar as características morfológicas e bioquímicas foram observadas e comparadas para o posicionamento das estirpes.

Dentre os dezesseis isolados associados à *Baccharis trimera* os resultados das análises filogenéticas são promissores para a proposição de novas espécies bacterianas do gênero *Streptomyces*. Inicialmente, a análise filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA indicou que as linhagens BTM são intimamente relacionadas com as espécies-tipo, com valores de similaridade superiores a 99%. No entanto, nesta primeira análise o isolado BTM301 já se mostrou distante das espécies existentes e demais isolados, sendo mais próximo a *S. graminisoli* com valor de similaridade de sequência 96,2%, abaixo do limite delineado para pertencer a mesma espécie. A análise de sequências multilocus (MLSA) realizada com cinco alelos gênicos (*atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *trpB* e *recA*) mostrou que as estirpes BTM036, BTM281 e BTM412 estão fortemente relacionadas com as espécies-tipo e foram classificadas. Pertencentes a espécies *S. recifensis* temos os isolados BTM036 e BTM412 e

o isolado BTM281 classificado como *S. goshikiensis*. Os outros treze isolados estudados se distinguiram das espécies-tipo, não apresentando resultados MLSA ($\geq 99,3\%$) que os classificassem dentro de espécies existentes, sendo candidatos a descrição de novas espécies (TABELA 7).

Os isolados de *Streptomyces* BTM036 e BTM412 pertencem à mesma espécie, ambos apresentaram os mesmos perfis morfológicos e bioquímicos, e são geneticamente iguais com valor de similaridade de sequências de 100% para o gene 16S rRNA (grupo 4) e com matriz de MLSA de 99,8% (grupo D). As estirpes foram classificadas pertencentes à espécie *Streptomyces recifensis* (*type strain* NBRC 12813) (MORAIS et al., 1957), inicialmente isolada do solo de Recife-PE, Brasil, com valores de similaridade entre os isolados e a espécie-tipo de 99,9% e 99,4%, para o gene 16S rRNA e MLSA, respectivamente. Os isolados compartilham com *S. recifensis*, a morfologia de esporos retilínea, coloração de esporos cinza e sem liberação de pigmentos para o meio de cultura. Capaz de se desenvolver em quase todas as fontes de carbono, exceto inositol e com crescimento intermediário em L-ramnose, semelhante a *S. recifensis*. Nota-se que mesmo pertencentes à mesma espécie, os isolados foram coletados de locais diferentes, sendo BTM036 epifítico de raiz e BTM412 isolado do solo, ambos de amostras oriundas de Ponta Grossa, demonstrando a capacidade desta estirpe de se desenvolver em diferentes ambientes e de realizar associações com plantas.

A estirpe *Streptomyces* BTM281, isolada do solo de Ponta Grossa, possui alta similaridade genética com as espécies *S. goshikiensis* (*type strain* NRRL B-5428) (NIIDA, 1966) e *S. sporoverrucosus* (*type strain* NRRL B-16379^T) (PREOBRAZHENSKEYA et al., 1986), isolados do solo do Japão e Jammu (Índia), respectivamente. Labeda e colaboradores (2016) propôs que as duas espécies devam ser consideradas sinônimas, pois apresentam distâncias $\leq 0,007$ na árvore filogenética de máxima verossimilhança de MLSA dos 5 genes *housekeeping*. Geneticamente o isolado BTM281 pode ser classificado pertencente a espécie *Streptomyces goshikiensis*, com 100% de valor de similaridade do gene 16S rRNA (grupo 6) e 99,4% no MLSA (grupo D), sendo morfológicamente semelhante com a espécie-tipo descrita por Faheem e colaboradores (2015) caracterizada por apresentar esporos de coloração cinza e micélio de substrato marrom, cadeia de esporos em espiral e capacidade de

desenvolvimento em D-glicose e não apresentar crescimento nas outras fontes de carbono testadas.

Os isolados de *Streptomyces* BTM304 e BTM471, obtidas dos solos de Ponta Grossa e Ortigueira, respectivamente, não puderam ser analisados pela metodologia MLSA, com 5 genes *housekeeping*, devido à baixa qualidade de sequências obtidas no sequenciamento dos genes *gyrB* e *trpB*. No entanto, realizou-se a análise de similaridade de sequências considerando os dados obtidos da concatenação de 4 genes para cada isolado. Os resultados mostraram que BTM304 é altamente relacionada à espécie *S. prunicolor* (*type strain* NBRC 13075) (PRIDHAM et al., 1958), inicialmente isolada do solo da Rússia, com a qual o isolado BTM304 apresentou 99,7% de similaridade de sequência do gene 16S rRNA (grupo 5) e 97,1% de identidade no MLSA. Apresentou também, as mesmas características morfológicas e bioquímicas, com cadeia de esporos retilínea e capacidade de desenvolvimento em todas fontes de carbono, embora tenha permanecido, até o momento, abaixo do limiar ($\geq 99,3\%$) para ser considerada a mesma espécie, a análise futura com a concatenação do gene *gyrB* nos revelará se o isolado BTM304 pertence a espécie *S. prunicolor* ou se é o representante de uma nova espécie altamente relacionada com a espécie-tipo já descrita.

Já para o isolado BTM471, com alta similaridade de sequência do gene 16S rRNA com *S. caniferus* (*type strain* NBRC 15389) 99,8% (PREOBRAZHENSKEYA et al., 1986), não se espera que a concatenação do gene *trpB* para a análise MLSA de 5 genes, aumente significativamente a similaridade das sequências concatenadas (95,5% com 4 genes). O isolado BTM471 difere da espécie-tipo morfológicamente e bioquimicamente, quanto a sua capacidade de desenvolvimento no teste de utilização de carbono e por desenvolver-se em cadeias de esporos espirais.

Dentre os isolados BTM doze (75%) foram avaliados como candidatos a pertencerem a novas espécies do gênero *Streptomyces* (BTM 015, BTM 288, BTM 294, BTM 295, BTM 298, BTM 300, BTM 301, BTM 453, BTM 462, BTM 467, BTM 471 E BTM 551). Estes isolados relacionaram-se filogeneticamente com espécies-tipo que foram isoladas de solo, rizosfera e endofíticas, não-patogênicas e com capacidade de produção de metabólitos secundários bioativos conhecidos, como *S. goshikiensis*, *S. cirratus* e *S. mauvecolor*.

Assim como foi observado por Labeda e colaboradores (2012), existe uma boa correlação entre a filogenia do gene 16S com as características morfológicas e bioquímicas das espécies de *Streptomyces*. Os isolados do estudo e as espécies já descritas, dentro dos grupos de espécies, assemelharam-se taxonomicamente, principalmente quanto a coloração e os arranjos dos esporos (ANEXO 7). Uma combinação de outras metodologias, morfológicas, bioquímicas e genômicas, como características das colônias em outros meios de cultura, FAME, perfil *fingerprinting* (-BOX), % molar de G+C do genoma e sequenciamento de genes do metabolismo secundário, serão realizadas para a melhor caracterização dos isolados, a fim de descrever com clareza as novas espécies.

O estudo da microbiota bacteriana de *Baccharis trimera* foi iniciado por Jardim (2016), um trabalho pioneiro, com isso pouco sabe-se sobre os microrganismos associados a esta planta medicinal. Diversos trabalhos semelhantes explorando nichos, até então, não estudados são realizados, como em plantas medicinais, ambientes marinhos, solos desérticos, em associações com animais, e em todos os casos quanto a sua microbiota, estes destacam o isolamento de uma variedade de umas novas estirpes para o gênero *Streptomyces*, demonstrando o potencial de diversidade bacteriana ainda não explorado para o gênero. E como produtores de compostos biologicamente ativos a importância destes novos membros como possíveis novas fontes de produtos de importância comercial (QIN et al., 2009; KUMAR et al., 2013).

Estudos paralelos realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina têm avaliado o potencial metabólico dos isolados das actinobactérias isoladas de *Baccharis trimeira*, dos isolados considerados possíveis novas espécies neste estudo temos dois endofíticos de raiz (BTM 015 e BTM 453), três isolados da rizosfera (BTM 288, BTM 300 e BTM 551) e sete isolados do solo (BTM 294, BTM 295, BTM 298, BTM 301, BTM 462, BTM 467 e BTM 471), destes 8 (BTM 15, BTM 288, BTM 294, BTM 300, BTM 301, BTM 462, BTM 467 e BTM 471) apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um patógeno avaliado (*Fusarium oxysporum*, *Sclerotinea sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas*, *Curtobacterium*).

A *Baccharis trimera* além de suas ações terapêuticas comprovadas como planta medicinal é uma promissora fonte para novos isolados do gênero *Streptomyces*, que possuem ações antagonistas contra patógenos e devem ser estudados, para compreensão das relações planta-bactérias existentes entre os organismos e também exploração dos metabólitos secundários produzidos, que podem representar novas classes de moléculas com funções biológicas de interesse para áreas clínicas, farmacológicas, agronômicas e ambientais.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos fornecem evidências de que a planta medicinal *Baccharis trimera* é uma rica e inovadora fonte de actinobactérias do gênero *Streptomyces*.

A caracterização morfológica e bioquímica dos isolados destacaram a alta variedade entre as 16 estirpes BTM, sendo dentre eles apenas 4 isolados capazes de formarem dois grupos por apresentarem para todas as análises da taxonomia polifásica as mesmas características (BTM036 com BTM412 e BTM295 com BTM298). A análise genética destes isolados dos grupos revelou-os como pertencem as mesmas espécies de *Streptomyces*.

As metodologias selecionadas para classificação filogenética das estirpes de *Streptomyces*, relevaram o elevado nível de diversidade dos 16 isolados estudado. A análise do gene 16S rRNA mostrou a alta correlação dos isolados com as espécies-tipo (>99% de similaridade), com exceção do BTM301, que indicou ser candidato a uma nova espécie bacteriana.

A análise de sequências multilocus esclareceu as relações filogenéticas dos isolados com as espécies-tipo. Com os dados foram possíveis inferir que 3 isolados (BTM 036, BTM 281 e BTM 412) foram identificados como pertencentes a espécies-tipo validadas, 1 isolado (BTM 304) sugere fortemente pertencer a *S. prunicolor* e 12 dos isolados deste estudo (75%) não apresentaram os parâmetros necessários para serem classificados dentro dos grupos de espécies existentes, sendo considerados candidatos a pertencer a novas espécies do gênero *Streptomyces*. Mostrando que *Baccharis trimera* é uma fonte promissora de possíveis novas espécies bacterianas com potencial biotecnológico.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho iniciou o estudo taxonômico de Actinobactérias do gênero *Streptomyces* isolados de associações com a planta medicinal *Baccharis trimera*, os resultados de taxonomia polifásica 16 isolados possibilitaram a classificação dentro de espécies validadas e revelaram 12 estirpes promissoras, candidatas a novas espécies para o gênero. Outros 14 isolados do gênero *Streptomyces*, que fazem parte da coleção de microrganismos do laboratório LAGEM, estão sendo caracterizados pelas mesmas metodologias aqui descritas para o posicionamento filogenético e seleção de espécimes potencialmente novas.

Todos os isolados que nestes estudos foram classificados como possíveis novas espécies serão submetidas as metodologias e normas exigidas para a descrição de novas bactérias (descrito no item 1.5).

Os isolados de *Streptomyces* importantes produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos. Os candidatos a novas espécies de *Streptomyces* serão avaliados quanto a sua capacidade metabólica para produção de compostos secundários com ação antimicrobiana contra patógenos e estes metabólitos submetidos a análises de compostos para a classificação de possíveis novas moléculas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, A. S., WELLINGTON, E.M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p.797-814, 1 maio 2001. Microbiology Society.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Current protocols in molecular biology, New York: John Wiley, p. 4755, 2003
- BARKA, Essaid Ait et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p.1-43, 25 nov. 2015.
- BONA, C. M. de et al. Estaquia de três espécies de Baccharis. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p.223-226, fev. 2005.
- BONTEMPS, Cyril et al. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. **Fems Microbiology Letters**, v. 342, n. 2, p.157-167, 4 abr. 2013.
- BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e teor de flavonoides em amostras de Baccharis trimera (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p.63-67, dez. 2002.
- BRADER, G. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 27, p.30-37, jun. 2014.
- BRAGINA, A. et al. Sphagnum mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. **The ISME journal**, v. 6, n. 4, p. 802, 2012.
- BRENNER, D. J.; STALEY, J. T.; KRIEG, N. R.. Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. **Bergey's Manual Of Systematics Of Archaea And Bacteria**, p.1-9, 14 set. 2015.
- BUDEL, J. M. et al. Macro and microscopical identification of four species of Baccharis from trimera group. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p.42-43, 2003.
- CAO, L. et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters In Applied Microbiology**, v. 39, n. 5, p.425-430, nov. 2004.
- CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p.171-198, mar. 2010.
- CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out : a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics, **Philosophical transactions of the royal society** , n. 361, p. 761–768, fev 2006.
- CLAESSEN, D.; JONG, W. DE; DIJKHUIZEN, L.; WO, H. A. B. Regulation of *Streptomyces* development : reach for the sky!, **Elsevier**, v. 14, n. 7, p. 313-319, 2006.
- COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M.. Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots Justin. **Applied And Environmental Microbiology**, Australia, v. 9, n. 69, p.5603-5608, set. 2003.

CUZZI, C. et al. Endophytic fungi of the “vassourinha” (*Baccharis dracunculifolia* D. C. - Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p.135-139, jun. 2012.

DELAMUTA, J. R. M. et al. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 698-710, 2012.

DU, H; SU, J; YU, L; ZHANG, Y. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants. **Wei Sheng Wu Xue Bao** v. 53, p. 15–23, 2013.

EGAMBERDIEVA, D. et al. Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1887-1897, 28 set. 2017.

FABIANE, K. C. et al. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.197-203, jun. 2008.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GOODFELLOW, M. et al. *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus* Pridham et al. 1958. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.1-16, 6 jun. 2017.

GUO, Y.; ZHENG, W.; RONG, X.; HUANG, Y., A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 58, p. 149–159, 2008.

GUPTA K.C.; CHOPRA I.C. *Streptomyces katrae* - a new species of *Streptomyces* isolated from soil. **Indian Journal of Microbiology**, v. 3, p. 1-4, 1963.

HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Of Microbiology**, v. 43, n. 10, p.895-914, out. 1997.

HARUNARI, Enjuro et al. *Streptomyces hyaluromycini* sp. nov., isolated from a tunicate (*Molgula manhattensis*). **The Journal Of Antibiotics**, v. 69, n. 3, p.159-163, 4 nov. 2015.

HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M.. "Estudo das Relações Filogenéticas de Estirpes de Rizóbios através da Metodologia Multilocus Sequence Analysis (MLSA) com Identificação de Espécies Novas". In: **In Anais do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - VSIMBBTEC [Blucher Biochemistry Proceedings]**. p. 401. São Paulo: Blucher, 2015.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K., Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients., **Applied And Environmental Microbiology** v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HOPWOOD, D. A., Soil To Genomics : The Streptomyces Chromosome, **Annual Review of Genetics**, n 40, p. 1–23, 2006.

HOUDE, P., Critical evaluation of DNA hybridization studies in avian systematics, **National Museum of Natural Histor**, Washington, p. 17–32, 1987.

HUANG, Chih-hung et al. The telomeres of Streptomyces chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 5, p.905-916, jun. 1998.

IDRIS, H. et al. Streptomyces aridus sp. nov., isolated from a high altitude Atacama Desert soil and emended description of Streptomyces noboritoensis Isono et al. 1957. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 5, p.705-717, 9 fev. 2017.

IKEDA, Haruo et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 5, p.526-531, 14 abr. 2003.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Baccharis in Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2015.

KAEWKLA, Onuma; FRANCO, Christopher Milton Mathew. Streptomyces roietensis sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of jasmine rice, Oryza sativa KDML 105. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 11, p.4868-4872, 1 nov. 2017.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (Baccharis trimera): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v. 15, n. 2, p.280-286, dez. 2013.

KHAMNA S; YOKOTA A; PEBERDY JF; LUMYONG S. Indole-3-acetic acid production by Streptomyces sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **EurAsia J BioSci** 4, v. 4, p. 23-32, 2010.

KHUCHAROENPHAISAN, K.; SRIPAHOJ, N.; SINMA,K. Isolation and Identification of Actinomycetes from Termite's Gut against Human Pathogen. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, p. 68-73, 2012.

KIM, M. et al. Reconstruction of a high-quality metabolic model enables the identification of gene overexpression targets for enhanced antibiotic production in Streptomyces coelicolorA3(2). **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p.1185-1194, 23 abr. 2014.

KÖBERL, M. et al. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 400, 2013.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 5, p.504-509, out. 2007.

- KOSHIYAMA, H. Cirramycin, a new antibiotic. **Journal of Antibiotics Ser. A**, v. 16, n. 2, p. 59-66, 1963.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, 2013.
- KUSTER, E. Simple Working Key for the Classification and Identification of Named Taxa Included in the International Streptomyces Project. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, n. 3, p.139-148, 1 jul. 1972.
- LABEDA, D. P. DNA-DNA hybridization in the systematics of Streptomyces. **Elsevier**, Peoria, n. 115, p.249-253, 1992.
- LABEDA, D. P. et al. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 4, p.563-583, 30 dez. 2017.
- LABEDA, D. P. et al. Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 3, p.894-900, 25 nov. 2013.
- LABEDA, D. P. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p.2525-2531, 26 nov. 2010.
- LABEDA, D. P.; GOODFELLOW, M.; BROWN, R.; et al. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae., **Springer**, n. 101, p. 73–104, 2012.
- LAMBERT, D. H.; LORIA, R.. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 4, p.393-396, 1 out. 1989.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175, 1991
- LANOOT, B.; VANCANNEYT, M.; DAWYNDT, P.; CNOCKAERT, M.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; LIU, Z.; SWINGS, J. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 27, p. 84-92, 2004.
- LEBLOND, P.; FISCHER, G.; BERGER, F.; et al. The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA., **Molecular Microbiology**, v.19, p. 261–271, 1996.
- LEE, H.-j.; HAN, S.-i.; WHANG, K.-s.. *Streptomyces gramineus* sp. nov., an antibiotic-producing actinobacterium isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 4, p.856-859, 27 maio 2011.

LEE, H.-j.; WHANG, K.-s. *Streptomyces graminisoli* sp. nov. and *Streptomyces rhizophilus* sp. nov., isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 5, p.1546-1551, 29 jan. 2014.

LI H.B.; WONG C.C.; CHENG K.W.; CHEN F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT - Food Sci Technol.** v. 41, p. 385–390, 2008.

LI, L. et al. *Streptomyces desertarenae* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a desert sample. **Antonie van Leeuwenhoek**, p.1-8, 17 set. 2018.

LORIA, R.; KERS, J.; JOSHI, M.. Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p.469-487, set. 2006.

MORAIS, J.O.F.; LIMA, O.G.; MAIA, M.H.D. Novo estudo sobre *Nocardia recifei* e sua designacao como *Streptomyces recifensis*. **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco**, v. 15, p. 239-253, 1957.

MURASE, M. Peptimycin, a product of *streptomyces* exhibiting apparent inhibition against Ehrlich carcinoma. **Journal of Antibiotics Ser. A**, v. 14, n. 3, p. 113-118, 1961.

NIIDA, T. In: SHIRLING (E.B.) and GOTTLIEB (D.): Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313-340, 1966.

NISTE, M. et al. Stress Factors Affecting Symbiosis Activity and Nitrogen Fixation by *Rhizobium* Cultured in vitro. **Proenvironment, Romania**, v. 6, p.42-45, 2013.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **Eur. J. Soil Biol.**, 45:106-113, 2009.

OLIVEIRA, D. P. et al. Estudo do perfil microbiológico da matéria-prima e do produto acabado de *Rhamnus purshiana* e *Baccharis trimera* obtidos de diferentes farmácias de manipulação na cidade de Divinópolis-MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, Minas Gerais, v. 97, n. 0, p.30-44, maio 2016.

PARK, D.H., et al. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53, 2049–2054, 2003

PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 265-272, 2010.

PHONGSOPITANUN, Wongsakorn et al. *Streptomyces verrucosisporus* sp. nov., isolated from marine sediments. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 9, p.3607-3613, 1 set. 2016.

PREOBRAZHENSAYA, T.P.; GAUSE, G.F.; SVESHNIKOVA, M.A.; TEREKHOVA, L.P.; MAXIMOVA, T.S. Genera *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and *Chainia*. **A guide for the determination of actinomycetes**. Nauka, Moscow, URSS, 1983.

- PRIDHAM, T. G.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. **Applied microbiology**, v. 6, n. 1, p. 52, 1958.
- PRIDHAM, T.G. New names and new combinations in the order Actinomycetales Buchanan 1917. **Bulletin of the United States Department of Agriculture**, v. 1424, p. 1-55, 1970.
- PROCÓPIO, R. E. L. et al. Antibiotics produced by Streptomyces. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p.466-471, set. 2012.
- QIN, S. et al. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p.6176-6186, 31 jul. 2009.
- RAMASAMY, D. et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2, p.384-391, 1 fev. 2014.
- RAMASAMY, D.; MISHRA, A. K.; LAGIER, J.; et al. Review A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2014, p. 384–391, 2017.
- REIS JÚNIOR, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, p. 985-994, 2000.
- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 106, n. 45, p.19126-19131, 23 out. 2009.
- RONG, X.; GUO, Y. HUANG, Y. 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. solvifaciens. **Systematic And Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p.314-322, ago. 2009.
- 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 Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 3, p.696-703, 5 ago. 2009.
- RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the Streptomyces hygrosopicus clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic And Applied microbiology**, v. 35, n. 1, p.7-18, fev. 2012.
- SALAMONI, S. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de Streptomyces e estudo de produção de moléculas bioativas., **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2009
- SANTHANAM, R. et al. Streptomyces erringtonii sp. nov. and Streptomyces

kaempferi sp. nov., isolated from a hay meadow soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 79-87, 2013.

SCHMIDT, Ruth et al. Effects of bacterial inoculants on the indigenous microbiome and secondary metabolites of chamomile plants. **Frontiers In Microbiology**, v. 5, p.1-14, 2014.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D.. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p.313-340, 1 jul. 1966.

SLABBINCK, B. et al. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. **Systematic And Applied Microbiology**, v. 32, n. 3, p.163-176, maio 2009.

SOCRANSKY S.S., et al. Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 352–362,2004.

SONG, J. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p.203-209, 1 jan. 2004.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiol Today** v. 33, p. 152–155, 2006.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol.** v. 28, p. 2731–2739, 2011

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

THOMPSON, C. C et al. Microbial genomic taxonomy. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p.913-924, 2013.

TIAN, X.-p. et al. *Streptomyces nanhaiensis* sp. nov., a marine streptomycete isolated from a deep-sea sediment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 4, p.864-868, 27 maio 2011.

TORRES, L. M. B. et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p.617-619, nov. 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, jun. 2005.

VERGINER, M. et al. Monitoring the plant epiphyte *Methylobacterium extorquens* DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. **Fems Microbiology Ecology**, v. 74, n. 1, p.136-145, 7 set. 2010.

VETSIGIAN, K.; JAJOO, R.; KISHONY, R. Structure and Evolution of *Streptomyces* Interaction Networks in Soil and In Silico. **Plos Biology**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.1-12, 25 out. 2011.

VIEIRA, M. L. A. et al. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 12, p.847-856, dezembro. 2014.

VURUKONDA, Sai Shiva Krishna Prasad; GIOVANARDI, Davide; STEFANI, Emilio. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.952-978, 22 mar. 2018.

WAKSMAN, S. A.;HENRICI, A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **J Bacteriol**, n 46, p. 337-341, 1943.

WANG P, et al. Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica*, v. 12, p. 477–490, 2014.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; et al. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLO**, v. 37, n.4, p. 463–464, 1987.

WILLIAMS, S. T., GOODFELLOW, M., ALDERSON, G., WELLINGTON, E. M. H., SNEATH, P. H. A. & SACKIN, M. J., Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **J Gen Microbiol**, v. 129, p. 1743-1813, 1983

WITT, D.; STACKEBRANDT, E.. Unification of the Genera *Streptoverticillum* and *Streptomyces*, and Amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339. **System. Appl. Microbiol.**, New York, n. 13, 1943.

ZABETAKIS, I.; MOUTEVELIS-MINAKAKIS, P.; GRAMSHAW, J. W. The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one in strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 311-314, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1 - Códigos de acesso das sequências das espécies-tipo selecionadas, no banco de dados Genbank.

Espécies	Código espécie-tipo	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>trpB</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>
<i>S. albospinus</i>	AS 4.1628	AY999753	FJ406258	FJ406314	FJ406369	FJ406146	FJ406202
<i>S. amritsarensis</i>	MTCC 11845	GQ906975	***	***	***	***	***
<i>S. anulatus</i>	ATCC 11523	DQ026637	KT385164	KT388786	KT389136	KT384467	KT384816
<i>S. aureocirculatus</i>	IFO_13018	AY999861	KT385173	KT388795	KT389145	KT384476	KT384825
<i>S. avermitilis</i>	MA 4680	NR074747	***	***	***	***	***
<i>S. avidinii</i>	NBRC 13429	AB184395	KT385176	KT388798	KT389148	KT384479	KT384828
<i>S. bobili</i>	NBRC 13199	AB184328	KT385187	KT388809	KT389159	KT384490	KT384839
<i>S. bungoensis</i>	NBRC 15711	AB184696	KT385189	KT388811	KT389161	KT384492	KT384841
<i>S. caniferus</i>	NBRC 15389	AB184640	FJ406255	FJ406311	FJ406366	FJ406143	FJ406199
<i>S. canus</i>	NRRL B-3980	AY999775	KT385197	KT388819	KT389169	KT384500	KT384849
<i>S. capoamus</i>	NRRL B-3632	AB045877	KT385198	KT388820	KT389170	KT384501	KT384850
<i>S. catenulae</i>	DMS 40258	AJ621613	FJ406264	FJ406320	FJ406375	FJ406152	FJ406208
<i>S. cellostaticus</i>	DMS 40189	HG941927	***	***	***	***	***
<i>S. celluloflavus</i>	NBRC 13780	AB184476	***	***	***	***	***
<i>S. chartreusis</i>	NBRC 12753	AB184839	KT385204	KT388826	KT389176	KT384507	KT384856
<i>S. cinereorectus</i>	NBRC 15395	AB184646	EF661753	EF661774	EF661795	EF661711	EF661732
<i>S. cinnamomensi</i>	NBRC 15873	AB184707	KT385212	KT388834	KT389184	FJ652675	FJ652729
<i>S. cirratus</i>	AS 4.1679	AY999794	EF055043	EF055098	EF055153	EF031301	EF054988
<i>S. ciscaucasicus</i>	NBRC 12872	AB184208	KT385217	KT388839	KT389189	KT384520	KT384869
<i>S. colombiensis</i>	NRRL B-1990	DQ026646	KT385474	KT389092	KT389441	KT384772	KT385120
<i>S. corchorusii</i>	NBRC 13032	AB184267	KT385227	KT388849	KT389199	KT384530	KT384879
<i>S. curacoii</i>	NBRC 12761	AB184841	KT385229	KT388851	KT389201	KT384532	KT384881
<i>S. cyaneofuscatus</i>	NBRC 13190	AB184860	EF055033	EF055088	EF055143	EF031291	EF054980
<i>S. decoyicus</i>	AS 4.1861	AY999883	FJ406271	FJ406327	FJ406382	FJ406159	FJ406215
<i>S. fimicarius</i>	NRRL ISP-5322	AY999784	KT385247	KT388868	KT389218	KT384549	KT384898
<i>S. flavogriseus</i>	CBS 101.34 ^T	AJ494864	GU979270	GU979344	GU979418	GU979307	GU979381
<i>S. flavotricini</i>	NRRL B-5419	AY999915	KT385252	KT388873	KT389223	KT384554	KT384903
<i>S. flavovariabilis</i>	NRRL B-16367	EF178691	***	***	***	***	***
<i>S. fulvorobeus</i>	NBRC 15897	AB184711	EF055068	EF055123	EF055178	EF031326	EF055013
<i>S. galbus</i>	DSM 40089	X79852	KT385258	KT388879	KT389229	KT384560	KT384909
<i>S. galilaeus</i>	AS 4.1320	AB045878	EF055019	EF055074	EF055129	EF031277	EF054966

<i>S. goshikiensis</i>	NRRL B-5428	EF178693	KT385269	KT388890	KT389240	KT384571	KT384920
<i>S. globosus</i>	LMG 19896 ^T	AJ781330	EF661759	EF661780	EF661801	EF661717	EF661738
<i>S. globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i>	NRRL_B-2872	EF178686	EF661758	EF661779	EF661800	EF661716	EF661737
<i>S. gramineus</i>	NRRL B-24999	HM748598	KT385488	KT389106	KT389455	KT384786	KT385134
<i>S. graminisoli</i>	NRRL B-59126	HQ267975	KT385489	KT389107	KY000626	KT384787	KT385135
<i>S. graminifolii</i>	JL-22	HQ267984	-	-	-	-	-
<i>S. griseolus</i>	NBRC 3415	AB184768	EF055057	EF055112	EF055167	EF031315	EF055002
<i>S. griseoluteus</i>	JCM 4765	AY999751	KT385279	KT388901	KT389250	KT384581	KT384930
<i>S. griseoruber</i>	NBRC 12873	AB184209	***	GU383766	***	GU383342	***
<i>S. griseorubiginosus</i>	LMG 19941	AJ781339	EF661760	EF661781	EF661802	EF661718	EF661739
<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>glebosus</i>	NBRC 13786	AB184479	FJ406270	FJ406326	FJ406381	FJ406158	FJ406214
<i>S. hokutonensis</i>	R1-NS-10	AB808756	***	***	***	***	***
<i>S. kaempferi</i>	I37 ^T	HE591382	KT385490	KT389108	KT389456	KT384788	KT385136
<i>S. kasugaensis</i>	NRRL B-24288	AB024441	KT385306	KT388927	KT389276	KT384607	KT384956
<i>S. katrae</i>	NBRC 13447	AB184409	KT385307	KT388928	KT389277	KT384608	KT384957
<i>S. lavendulae</i>	NRRL B-1230	D85116	KT385318	KT388939	KT389288	KT384619	KT384968
<i>S. libani</i> subsp. <i>libani</i>	DSM 40555 ^T	AB184414	FJ406281	FJ406337	FJ406392	FJ406169	FJ406225
<i>S. libani</i> subsp. <i>rufus</i>	LMG 20087	AJ781351	FJ406277	FJ406333	FJ406388	FJ406165	FJ406221
<i>S. lydicus</i>	ATCC 25470	Y15507	FJ406248	FJ406304	FJ406359	FJ406136	FJ406192
<i>S. longwoodensis</i>	NBRC 14251	AB184580	KT385329	KT388949	KT389298	KT384629	KT384978
<i>S. mauvecolor</i>	NBRC 13854	AB184532	KT385338	KT388958	KT389307	KT384638	KT384987
<i>S. michiganensis</i>	NBRC 12797	AB184153	KT385341	KT388961	KT389310	KT384641	KT384990
<i>S. microflavus</i>	NRRL B-1229	DQ445795	KT385324	KT388944	KT389293	KT384624	KT384973
<i>S. mirabilis</i>	NBRC 13450	AB184412	KT385345	KT388965	KT389314	KT384645	KT384994
<i>S. misakiensis</i>	IFO 12891	AB217605	KT385346	KT388966	KT389315	KT384646	KT384995
<i>S. monomycini</i>	NRRL B-24309	DQ445790	FJ406292	FJ406347	FJ406403	FJ406180	FJ406236
<i>S. nigrescens</i>	NRRL B-12176 ^T	DQ442530	FJ406247	FJ406303	FJ406358	FJ406135	FJ406191
<i>S. nitrosporeus</i>	NRRL B-1316	EF178680	EF661762	EF661783	EF661804	EF661720	EF661741
<i>S. nojiriensis</i>	LMG 20094	AJ781355	EF055062	EF055117	EF055172	EF031320	EF055007
<i>S. novaecaesareae</i>	NBRC 13368	AB184357	KT385366	KT388985	KT389334	KT384665	KT385015
<i>S. olivaceoviridis</i>	NBRC 13066	D44191	KT385367	KT388986	KT389335	KT384666	KT385016
<i>S. olivochromogenes</i>	DSM 40451	AY094370	KT385369	KT388988	KT389337	KT384668	KT385018
<i>S. panaciradicis</i>	1MR-8	KF971876	-	-	-	-	-

<i>S. phaeoluteigriseus</i>	ISP 5182 ^T	AJ391815	KT385382	KT389002	KT389351	KT384681	KT385031
<i>S. phaeopurpureus</i>	NRRL B-2260	DQ026666	KT385383	KT389003	KT389352	KT384682	KT385032
<i>S. platensis</i>	DSM 40041	AB045882	KT385387	KT389007	KT389356	KT384686	KT385036
<i>S. polychromogenes</i>	NBRC 13072	AB184292	KT385389	KT389009	KT389358	KT384688	KT385038
<i>S. pratensis</i>	AS 4.1868	AY999894	EF055058	EF055113	EF055168	EF031316	EF055003
<i>S. prunicolor</i>	NBRC 13075	DQ026659	KT385392	KT389012	KT389360	KT384691	KT385041
<i>S. pseudovenezuelae</i>	NBRC 12904	AB184233	KT385396	KT389016	KT389364	KT384695	KT385045
<i>S. racemochromogenes</i>	NRRL B-5430	DQ026656	KT385399	KT389019	KT389367	KT384698	KT385048
<i>S. ramulosus</i>	AS 4.1434	DQ026662	FJ406252	FJ406308	FJ406363	FJ406140	FJ406196
<i>S. recifensis</i>	NBRC 12813	AB184165	KJ137065	KJ996751	KJ137099	KJ137031	KJ137048
<i>S. rhizophilus</i>	NRRL B-59132	HQ267989	KT385491	KT389109	KT389457	KT384789	KT385137
<i>S. rubiginosohelvolus</i>	NBRC 12912	AB184240	EF661768	EF661789	EF661810	EF661726	EF661747
<i>S. seoulensis</i>	NBRC 16668	AB249970	KJ137066	KJ996564	KJ137100	KJ137032	KJ137049
<i>S. sioyaensis</i>	AS 4.1306	DQ026654	FJ406244	FJ406300	FJ406355	FJ406132	FJ406188
<i>S. spiroverticillatus</i>	NBRC 3931	AB184814	EF055046	EF055101	EF055156	EF031304	EF054991
<i>S. spororaveus</i>	LMG 20313	AJ781370	KT385428	KT389047	KT389396	KT384727	KT385076
<i>S. sporoverrucosus</i>	NRRL B-16379 ^T	DQ442544	KT385429	KT389048	KT389397	KT384728	KT385077
<i>S. subrutilus</i>	DSM 40445	X80825	EF055048	EF055103	EF055158	EF031306	EF054993
<i>S. tanashiensis</i>	IFO_12919	AY999856	EF055063	EF055118	EF055173	EF031321	EF055008
<i>S. tubercidicus</i>	AS 4.1414	AJ621612	FJ406249	FJ406305	FJ406360	FJ406137	FJ406193
<i>S. toxytricini</i>	NRRL B-5426 ^T	DQ442548	KT385442	KT389060	KT389409	KT384740	HQ823607
<i>S. vinaceus</i>	AS 4.1305	AB184394	EF055018	EF055073	EF055128	EF031276	EF054965
<i>S. virginiae</i>	AS 4.1530	AB184175	EF055032	EF055087	EF055142	EF031290	EF054979
<i>S. xanthochromogenes</i>	NRRL B-5410 ^T	DQ442559	KT385465	KT389083	KT389432	KT384763	KT385111
<i>S. xanthophaeus</i>	NRRL B-5414 ^T	DQ442560	***	***	***	***	***
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv	NR102810	NP217253	NP215181	NP216128	NP215826	NP214519

(***) sequências obtidas a partir de genomas completos; (-) espécie-tipo sem dados genéticos dos genes *housekeeping* publicados.

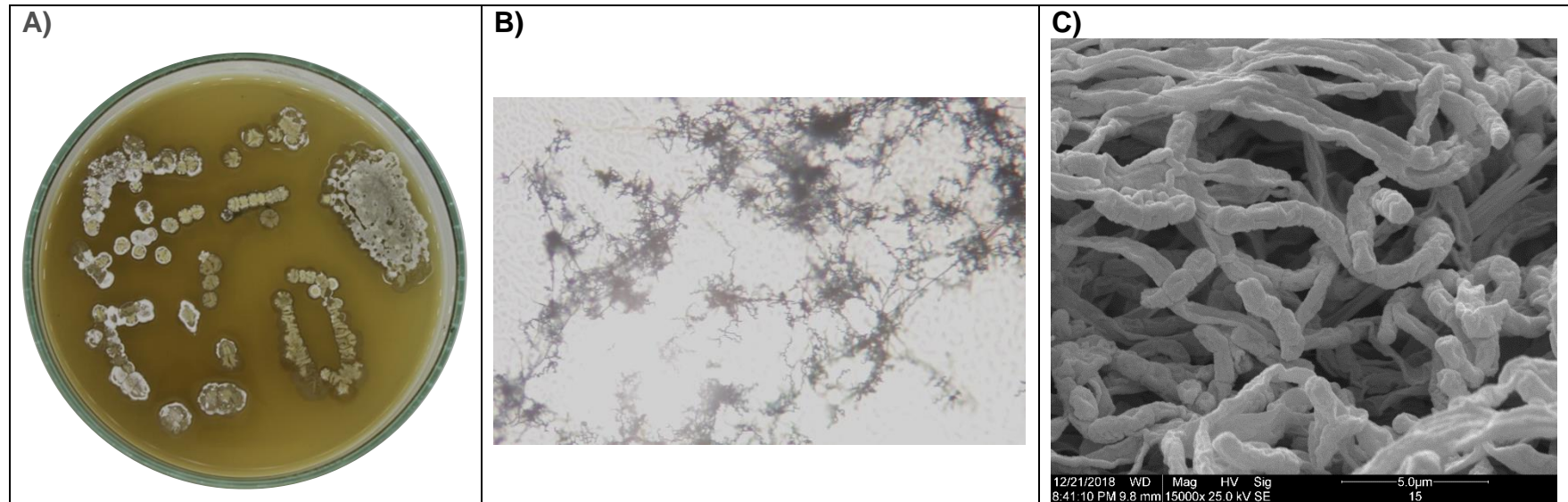
ANEXO 2 - Análises morfológicas dos isolados de *Streptomyces* associados à *Baccharis trimera*.

Figura 1. Caracterização morfológica do isolado BTM015 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando colônia em fase inicial da esporulação com micélio aéreo aparente de coloração bege, esporos brancos e cinza claro e liberação de pigmento difusível marrom; **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos flexíveis; **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto retino-flexível.

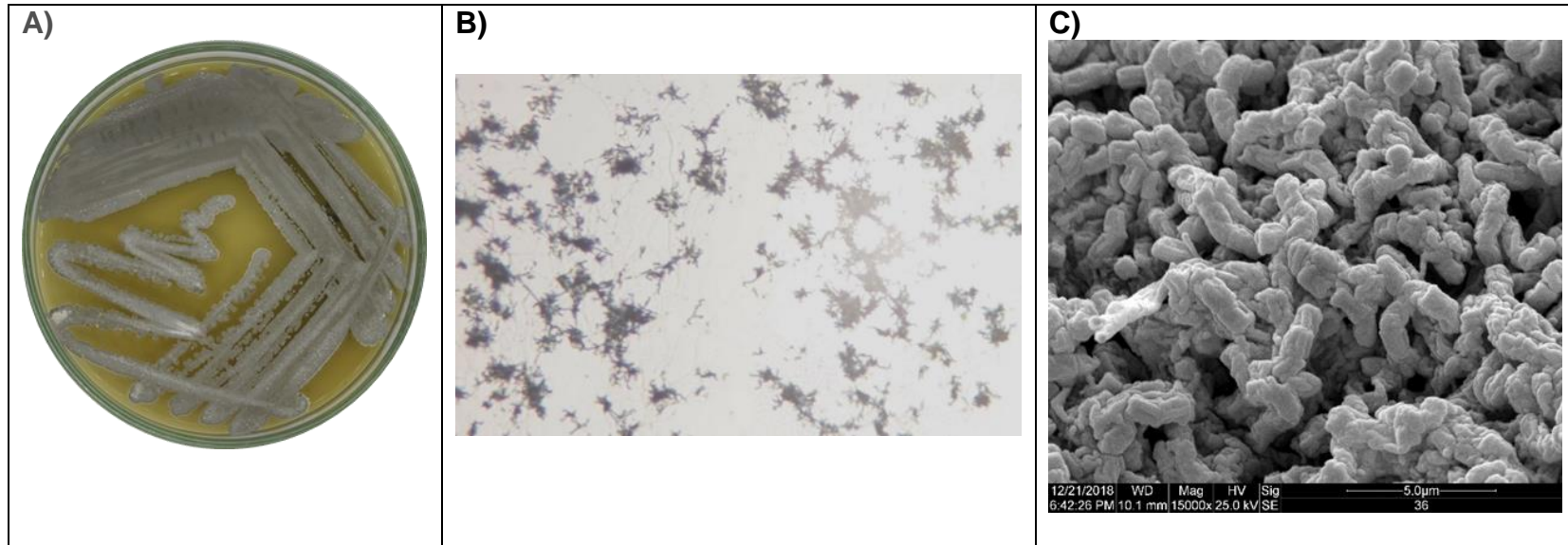


Figura 2. Caracterização morfológica do isolado BTM036 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aparente, esporos brancos e cinza, sem liberação de pigmento difusível (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilíneos. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando os esporos com aspecto compacto.

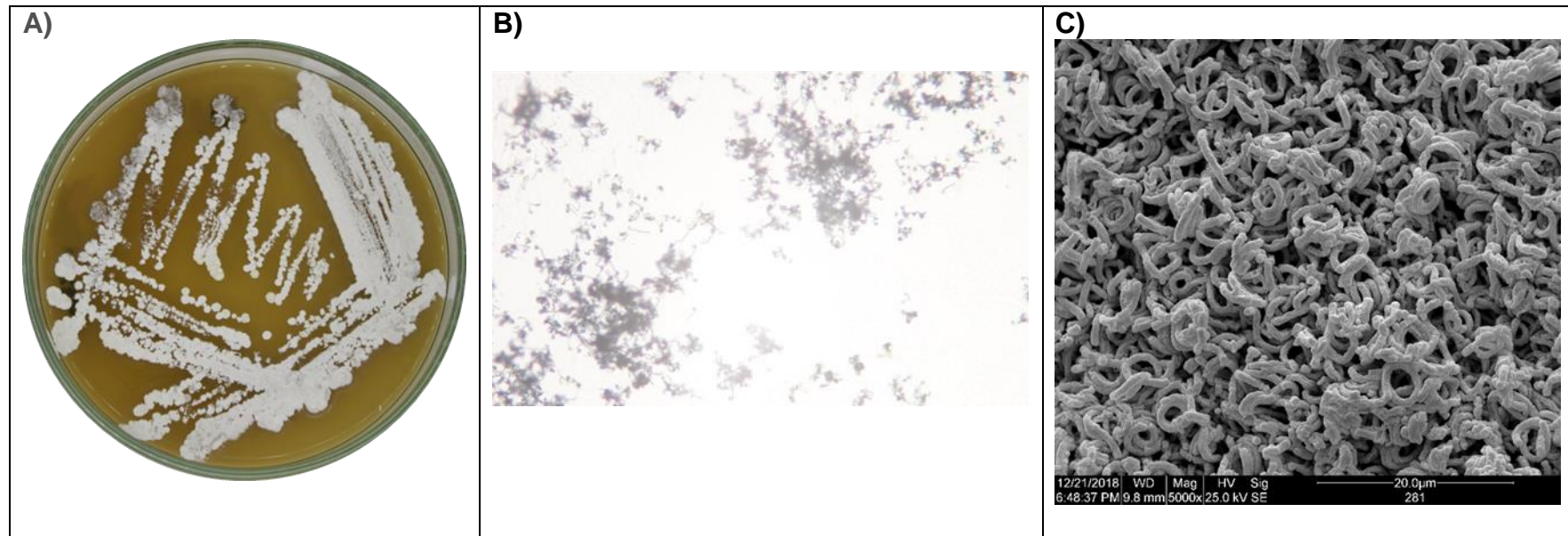


Figura 3. Caracterização morfológica do isolado BTM281 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aparente, esporos brancos e cinza, sem liberação de pigmento difusível, neste período (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos espirais. **C)** MEV (5000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto espiral.

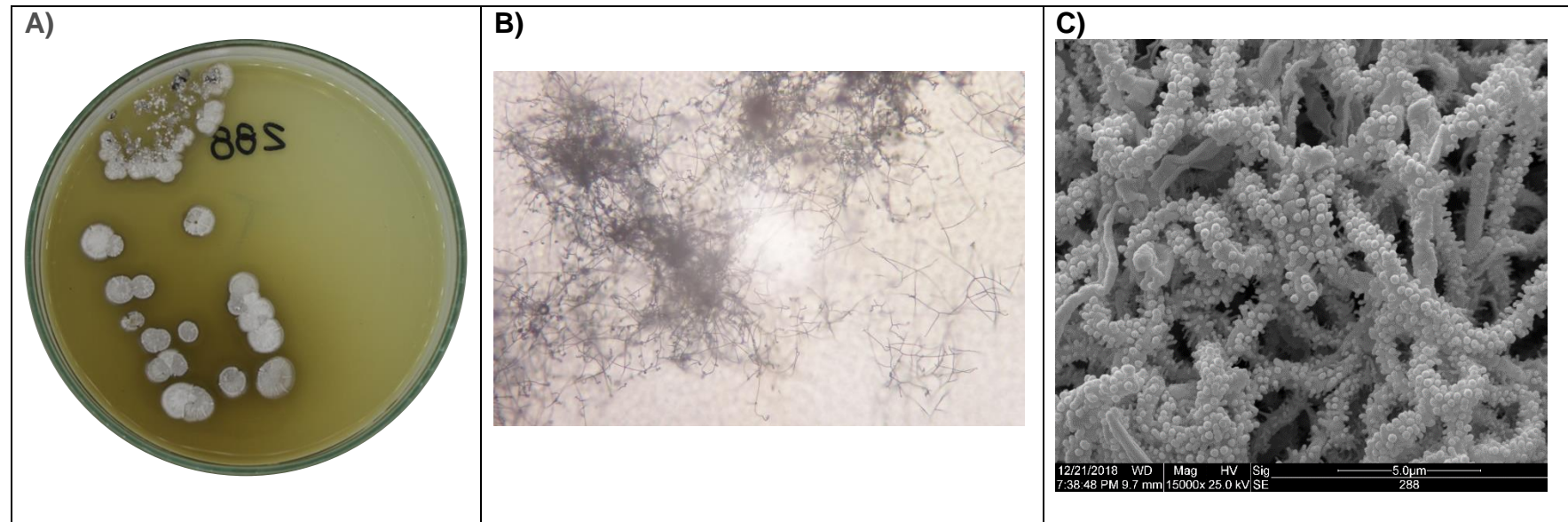


Figura 4. Caracterização morfológica do isolado BTM288 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, esporos cinzas claro com início de escurecimento (pontos cinza escuro), com liberação de pigmento difusível (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos flexíveis. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto pseudohifas com vesículas.

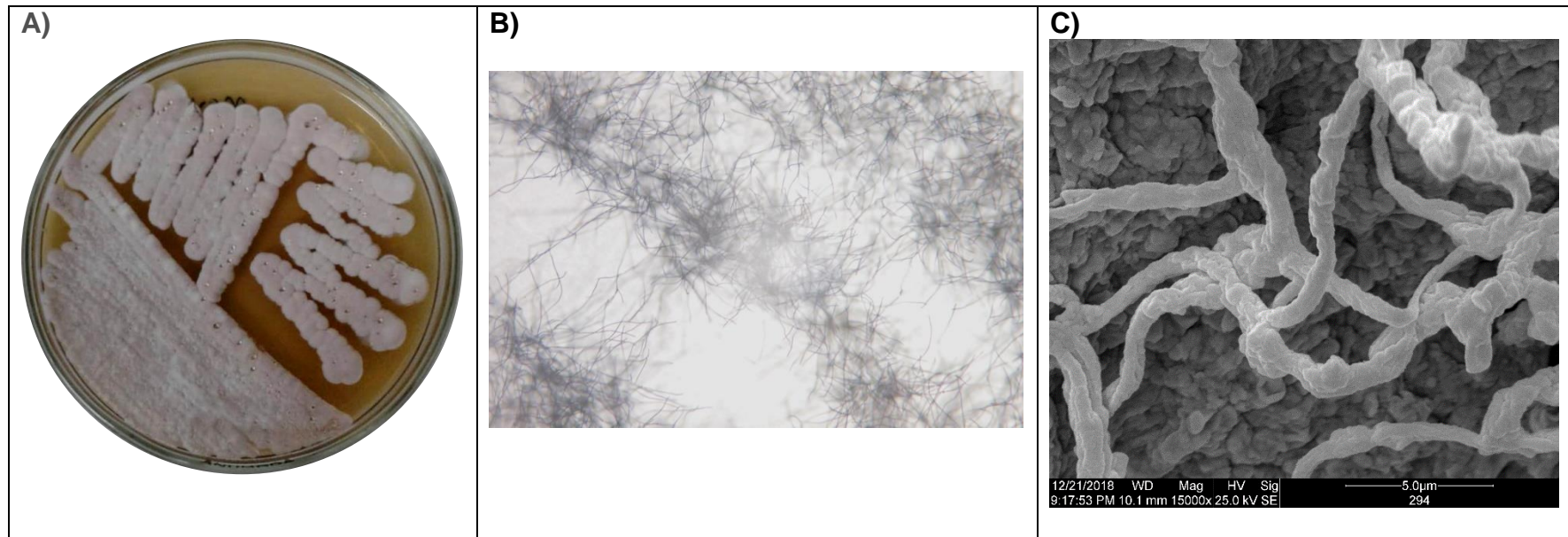


Figura 5. Caracterização morfológica do isolado BTM294 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, esporos brancos e rosas, com exsudação de metabólitos secundários (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilínea flexuosa; **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto verticulado retilíneo.

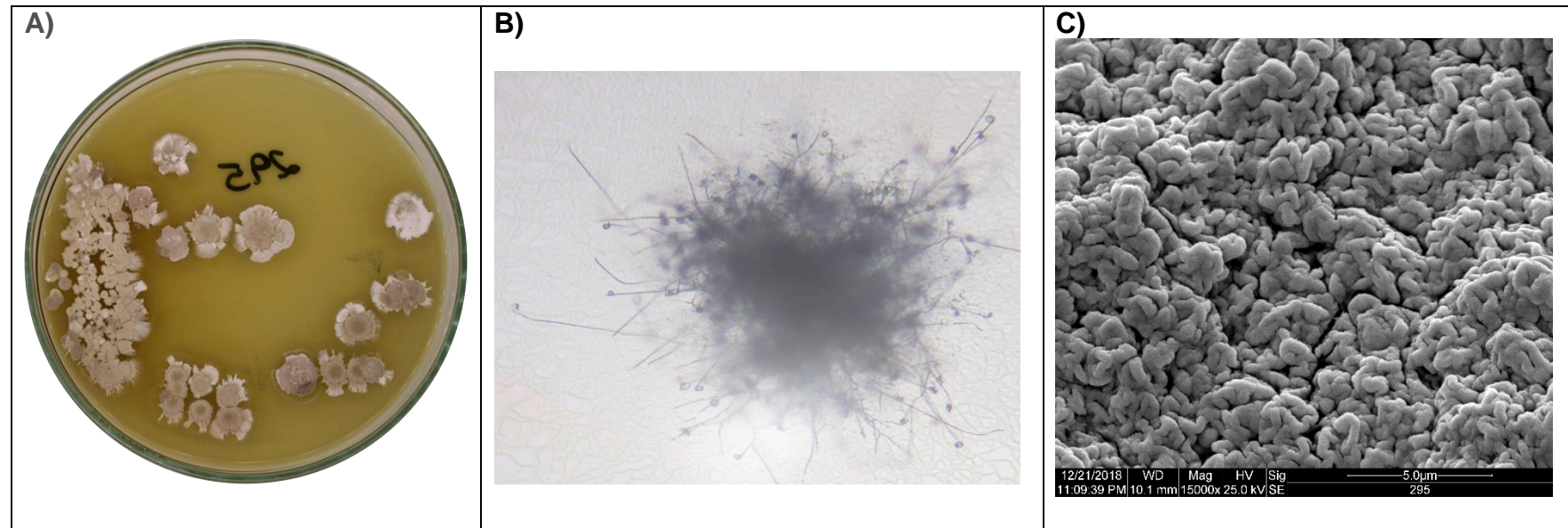


Figura 6. Caracterização morfológica do isolado BTM295 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, esporos brancos e rosas, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilínea em tufo. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto compactos.

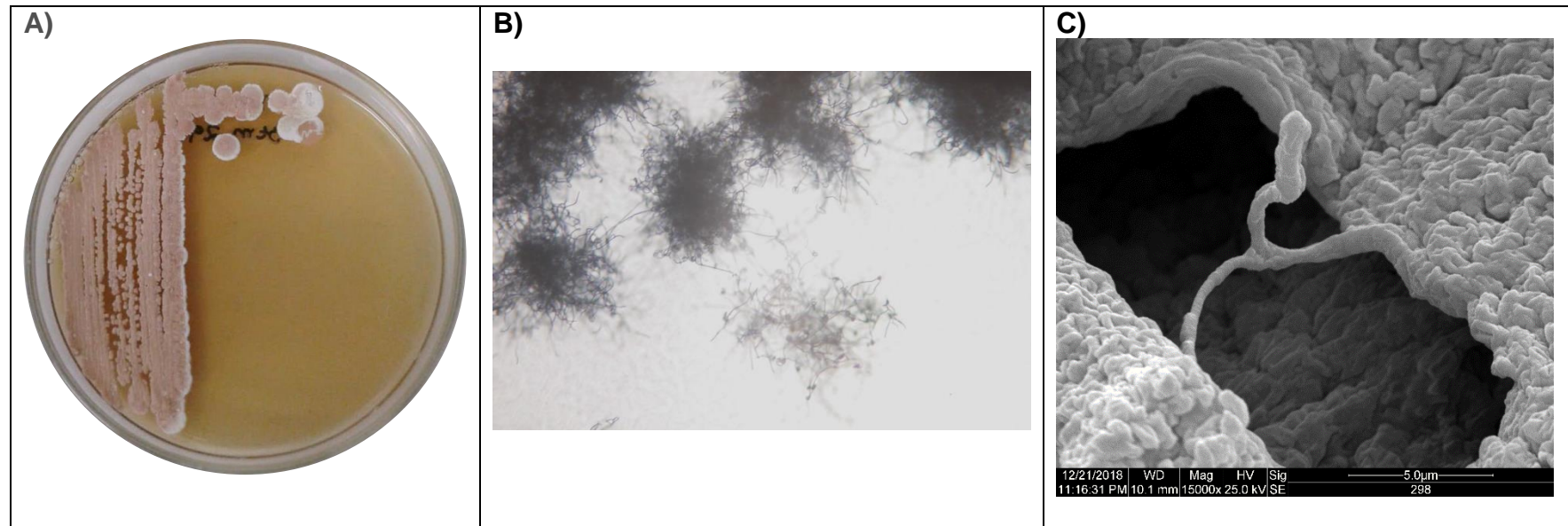


Figura 7. Caracterização morfológica do isolado BTM298 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, esporos brancos e rosas, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilínea em tufo. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto compacto.

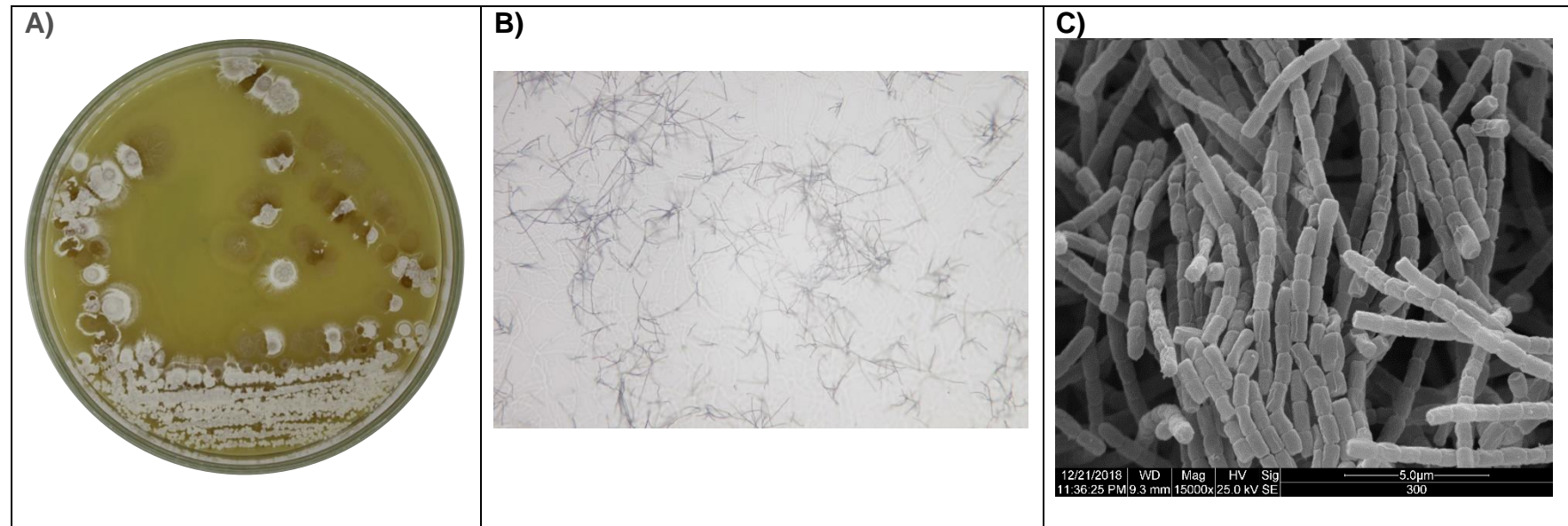


Figura 8. Caracterização morfológica do isolado BTM300 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, com micélio aéreo aparente, bege com esporos acinzentados, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilíneos. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto retilíneo.

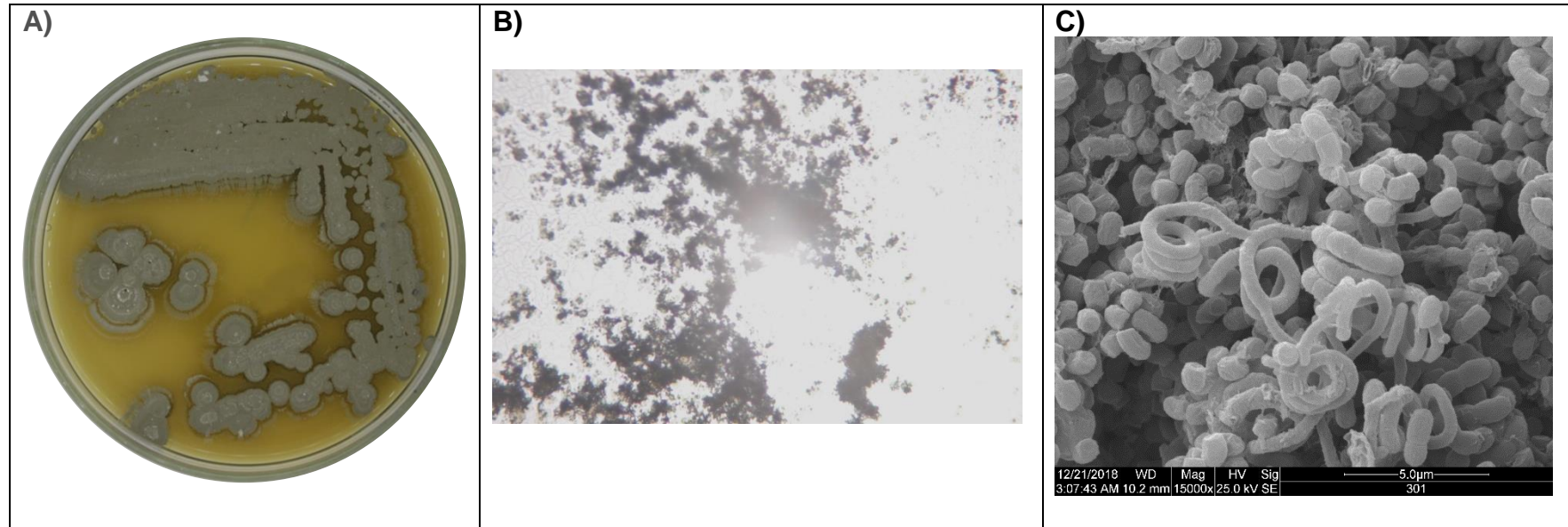


Figura 9. Caracterização morfológica do isolado BTM301 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, com esporos cinza escuro, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos espirais. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto espiral e esporos soltos.



Figura 10. Caracterização morfológica do isolado BTM304 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, com esporos brancos e acinzentados, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilínea. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto retilíneo. Liberação de grande quantidade de matriz extracelular.

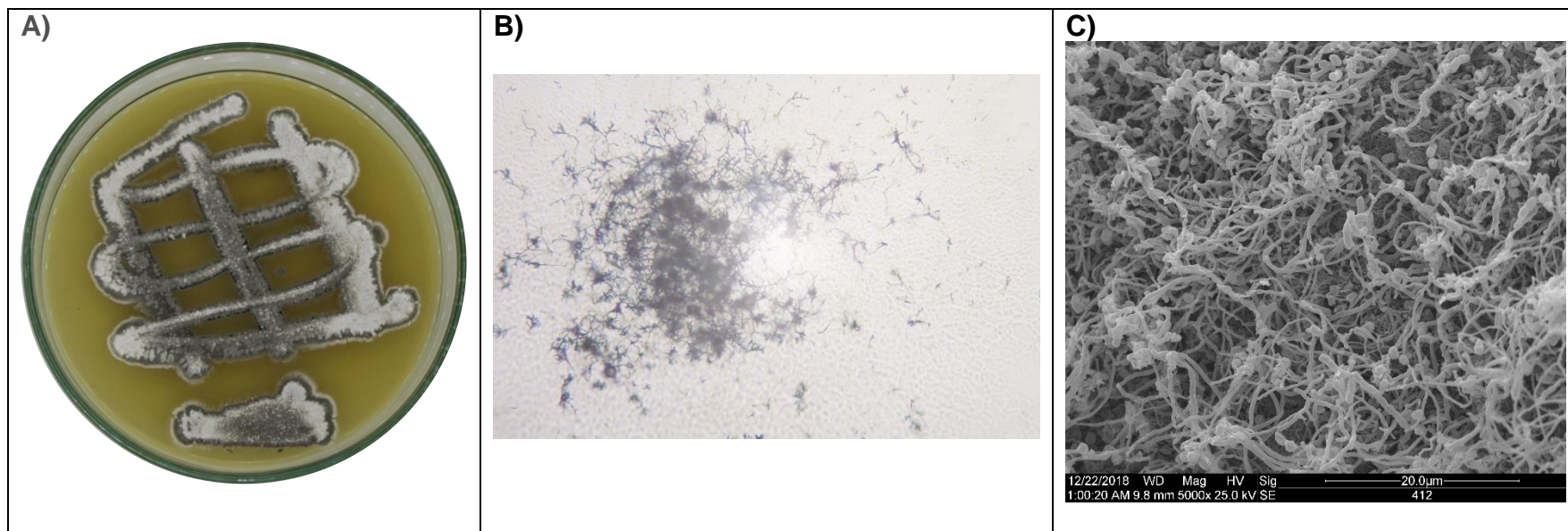


Figura 11. Caracterização morfológica do isolado BTM412 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, com esporos brancos e cinza, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos retilínea. **C)** MEV (5000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto retilíneo.

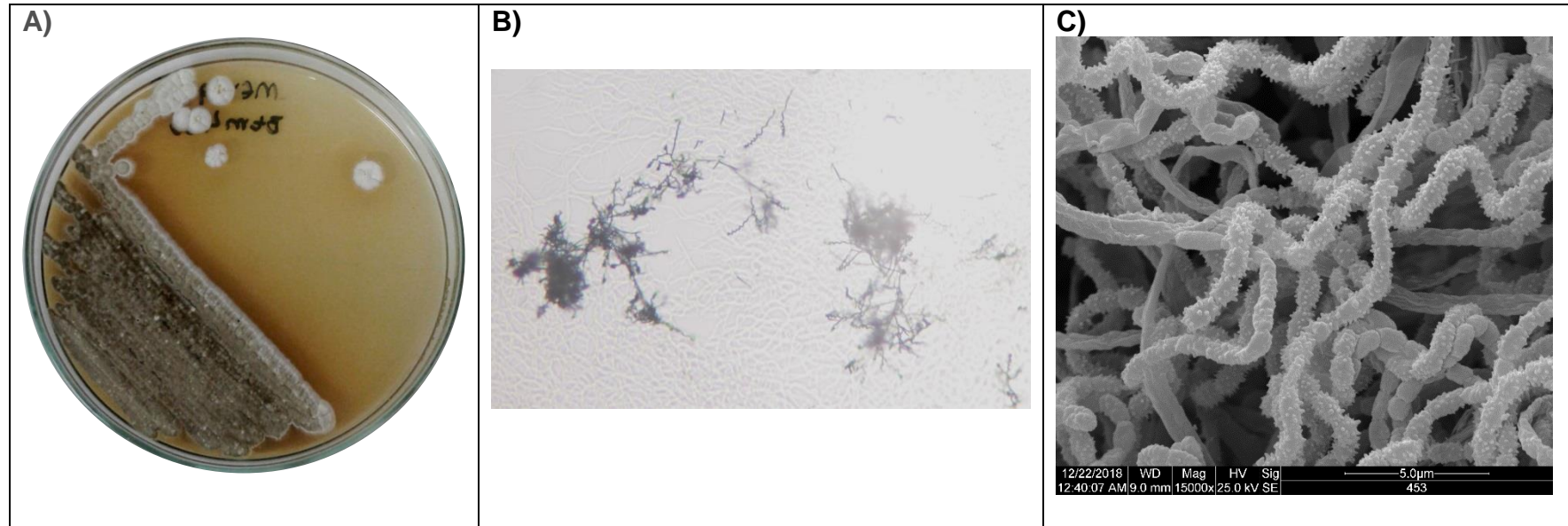


Figura 12. Caracterização morfológica do isolado BTM453 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, com esporos brancos e cinza escuro, com liberação de pigmentos difusíveis marrom (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos espirais. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas com vesículas.

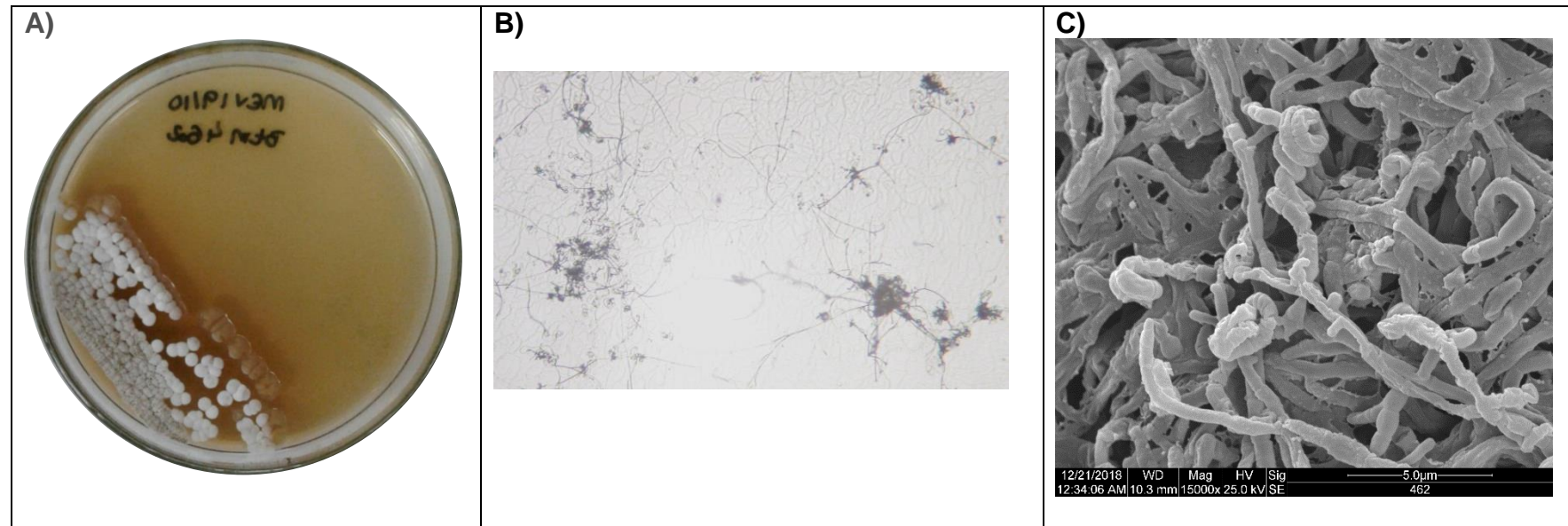


Figura 13. Caracterização morfológica do isolado BTM462 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, com micélio aéreo aparente bege, esporos brancos, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos flexíveis. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto flexível. Matriz extracelular aparente.

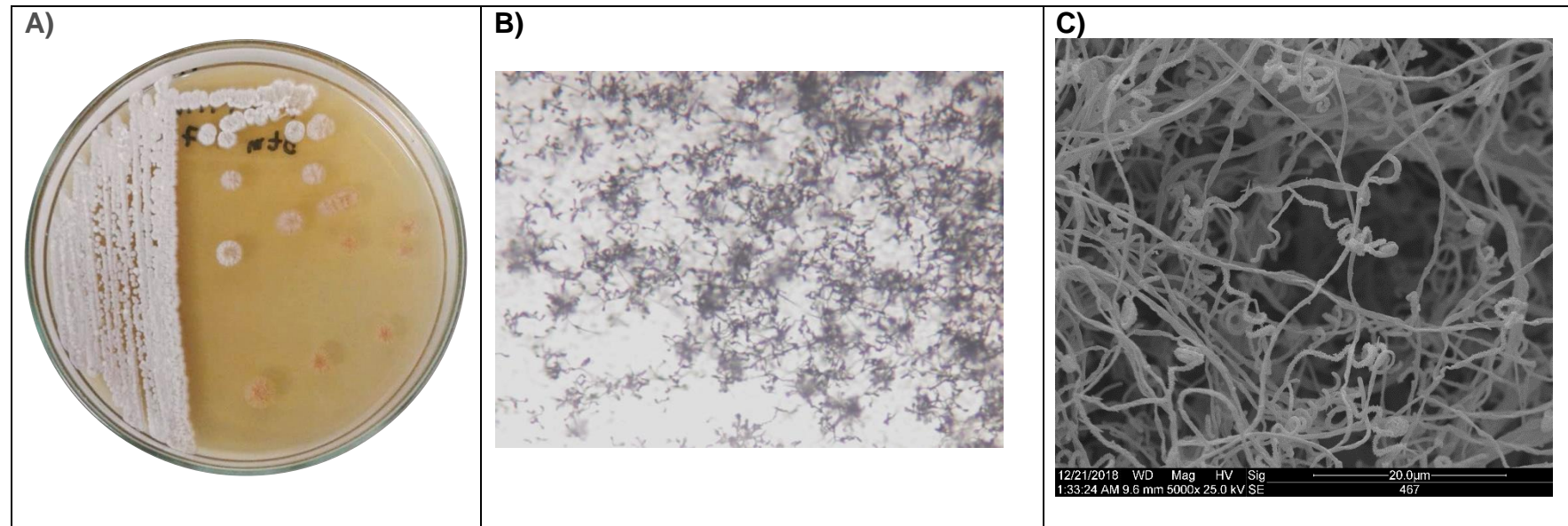


Figura 14. Caracterização morfológica do isolado BTM467 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, com micélio aéreo aparente creme, com esporos brancos, sem liberação de pigmentos difusíveis (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos espirais. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto espiral.

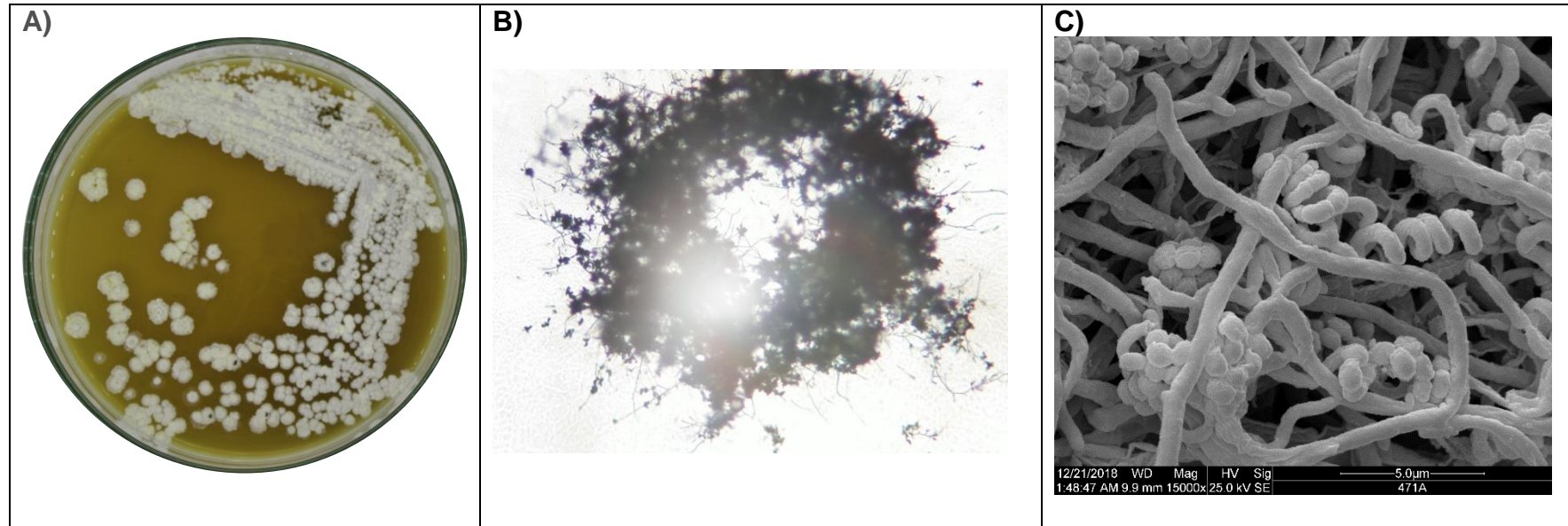


Figura 15. Caracterização morfológica do isolado BTM471 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após 21 dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, com esporos brancos e acinzentados, com liberação de pigmentos amarelo no meio e exsudação de metabólito secundário amarelo na superfície das colônias. **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos espirais. **C)** MEV (15000X) da colônia após 15 dias de crescimento em meio ISP2, evidenciando as hifas de aspecto espiral.

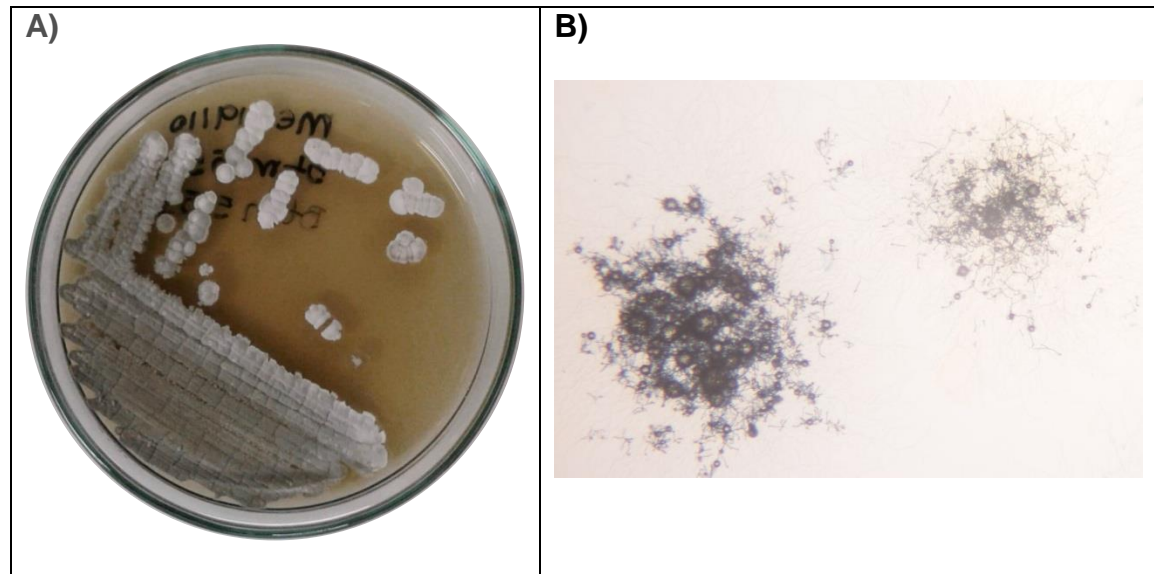
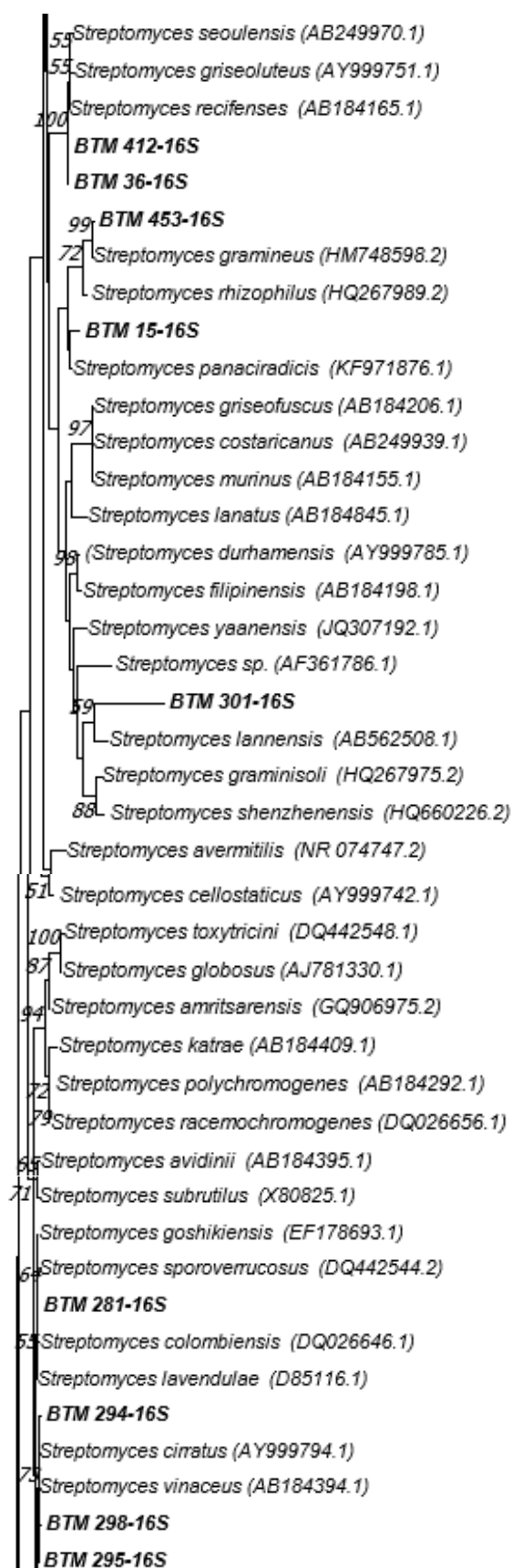
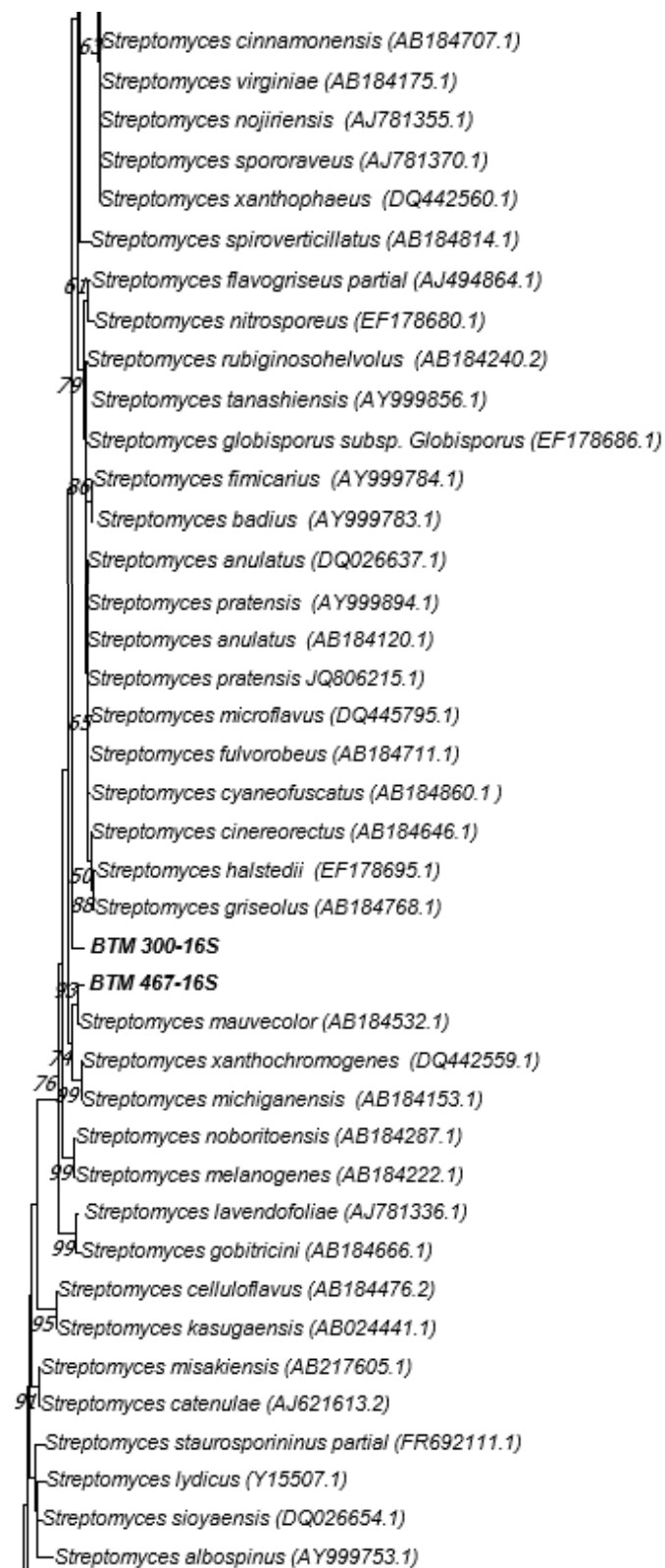


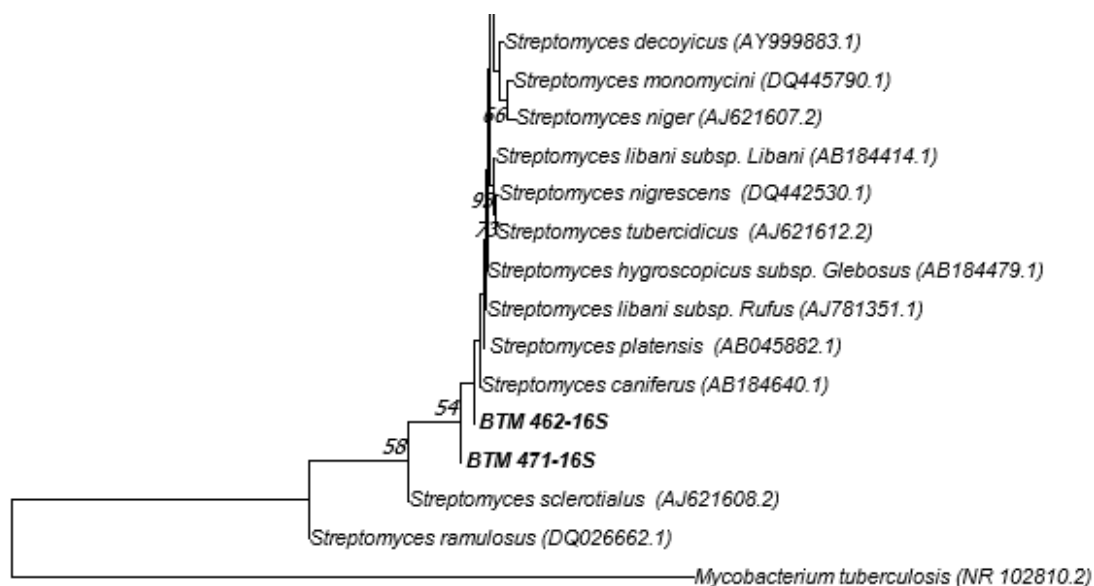
Figura 16. Caracterização morfológica do isolado BTM551 de *Streptomyces* sp. **A)** Vista superior da colônia após sete dias de crescimento em meio ISP2, sem micélio aéreo aparente, com esporos brancos e cinzas, com liberação de pigmentos difusíveis marrom (vista de cima da placa de Petri). **B)** Caracterização micromorfológica da colônia cultivada em meio ágar-água por sete dias por microscopia de luz (aumento de 10X), evidenciando a cadeia de esporos espirais.

ANEXO 3 - Árvore filogenética do gene 16S rRNA com 128 espécies-tipo de *Streptomyces* sp.



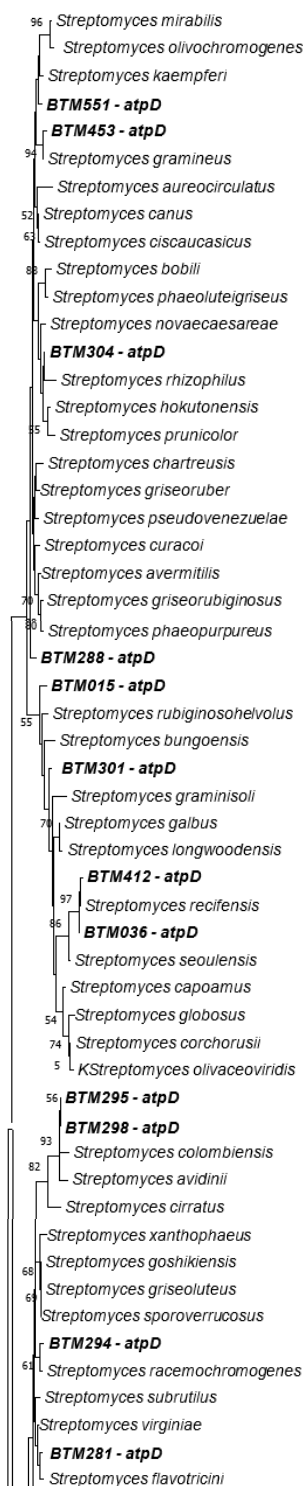




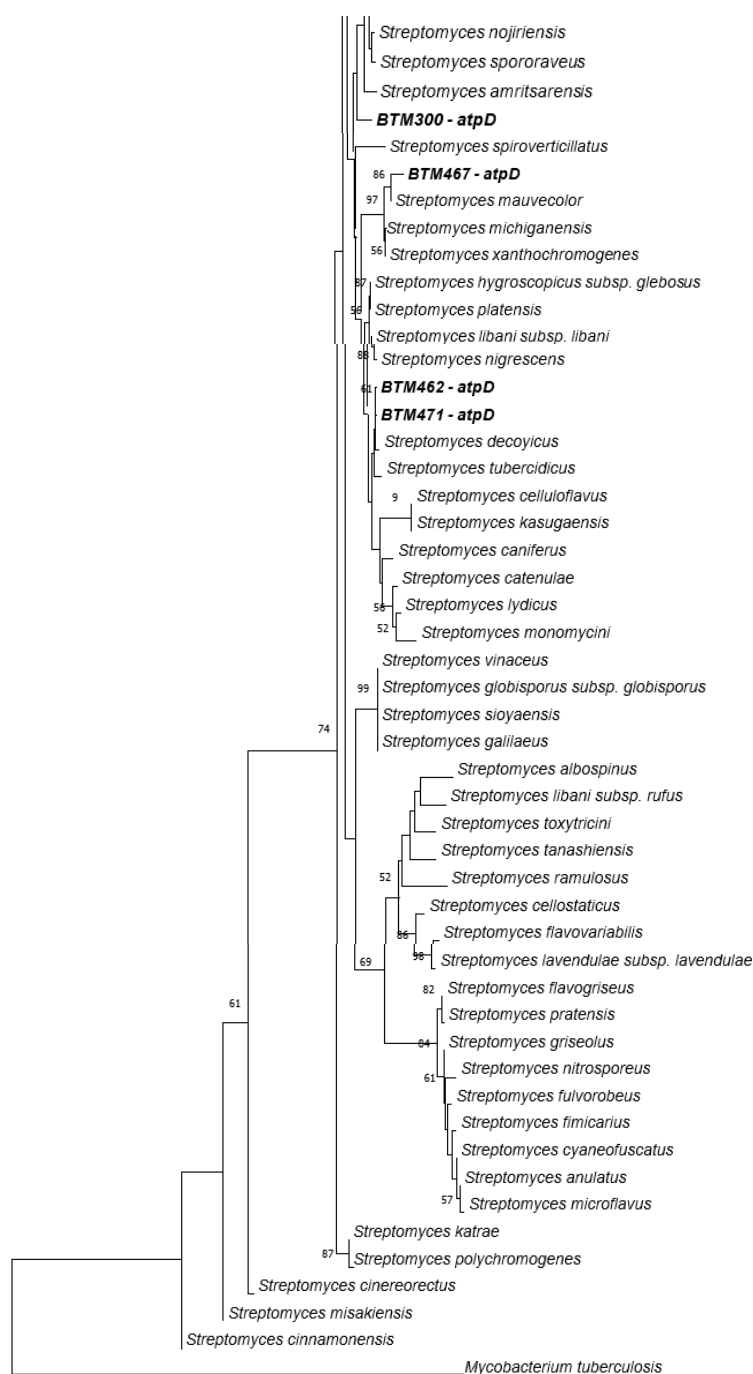


Anexo 3 - A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 1.33475812 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,0785).

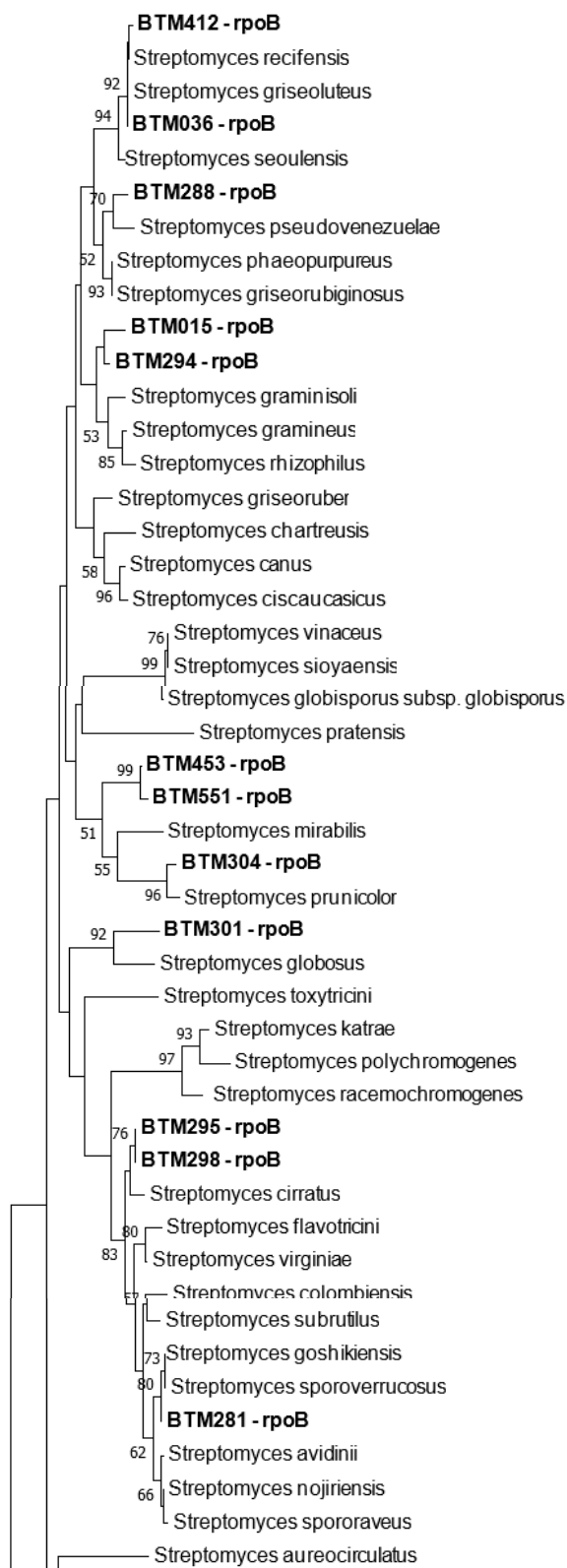
ANEXO 4 - Árvores filogenéticas dos genes *housekeeping atpD*, *rpoB*, *recA*, *trpB* e *gyrB*.



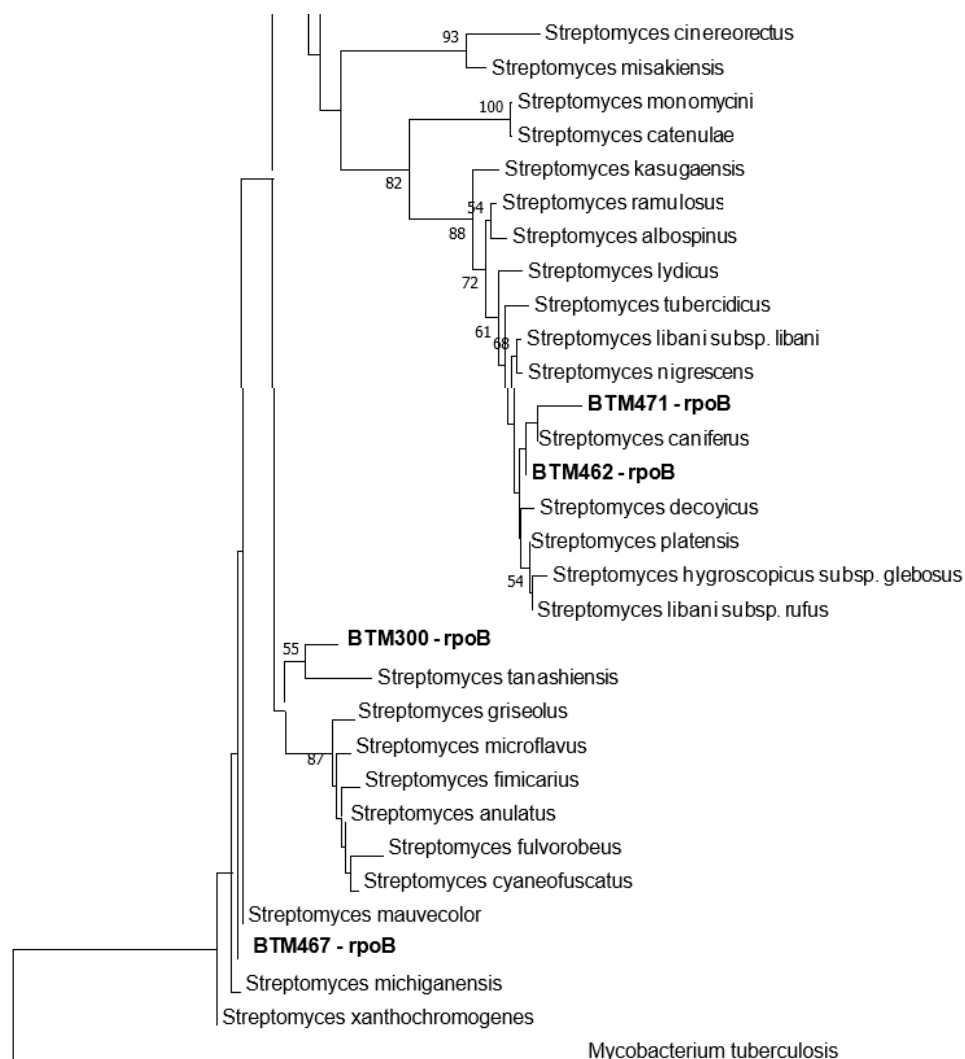
Anexo 4 (A) – Árvore filogenética do gene *atpD* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp.



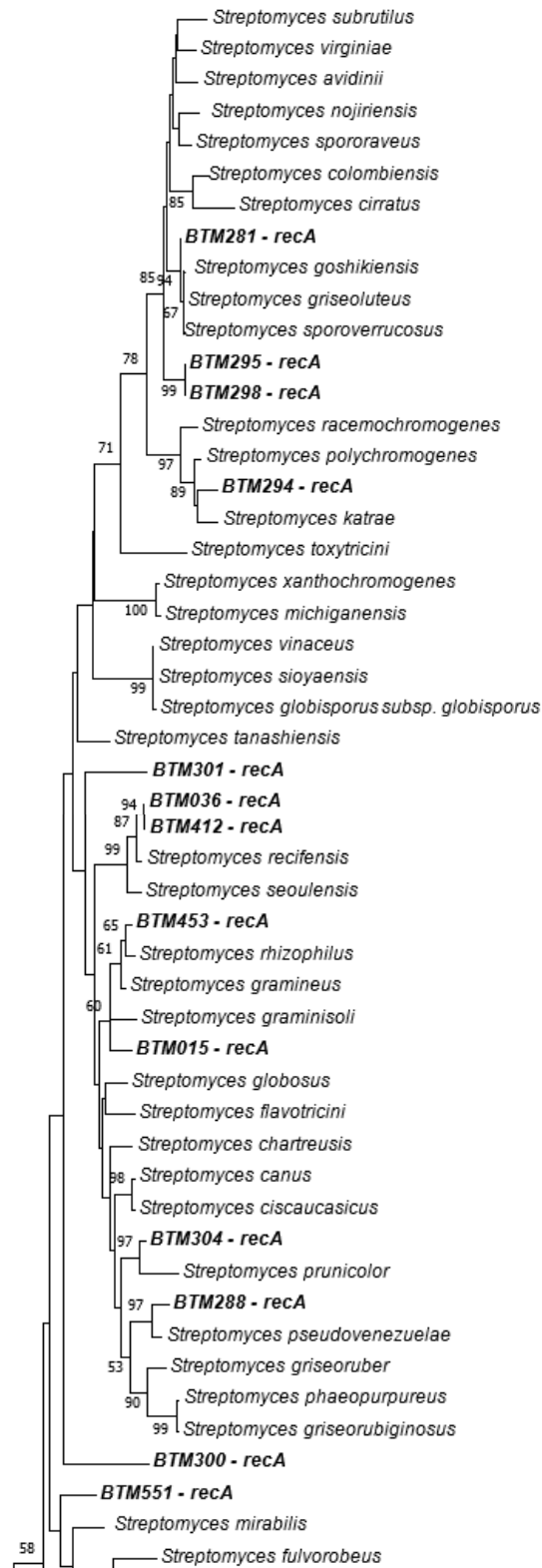
Anexo 4 (A) – Árvore filogenética do gene *atpD* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 2.57216236 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-Nei e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1636).



Anexo 4 (B) – Árvore filogenética do gene *rpoB* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp.



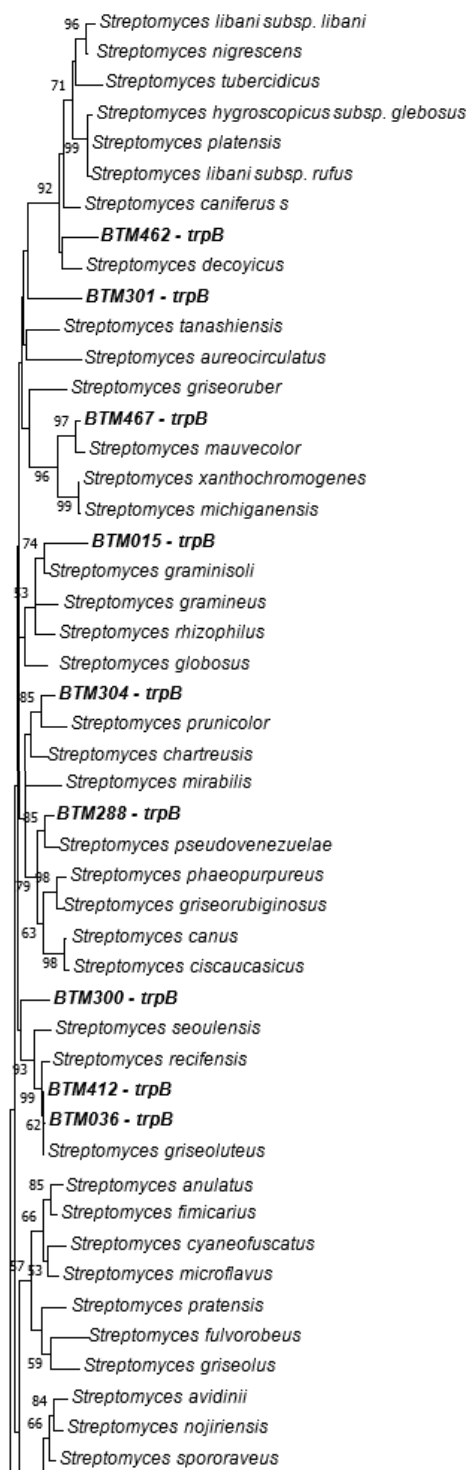
Anexo 4 (B) – Árvore filogenética do gene *rpoB* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 2,78514011 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1959).



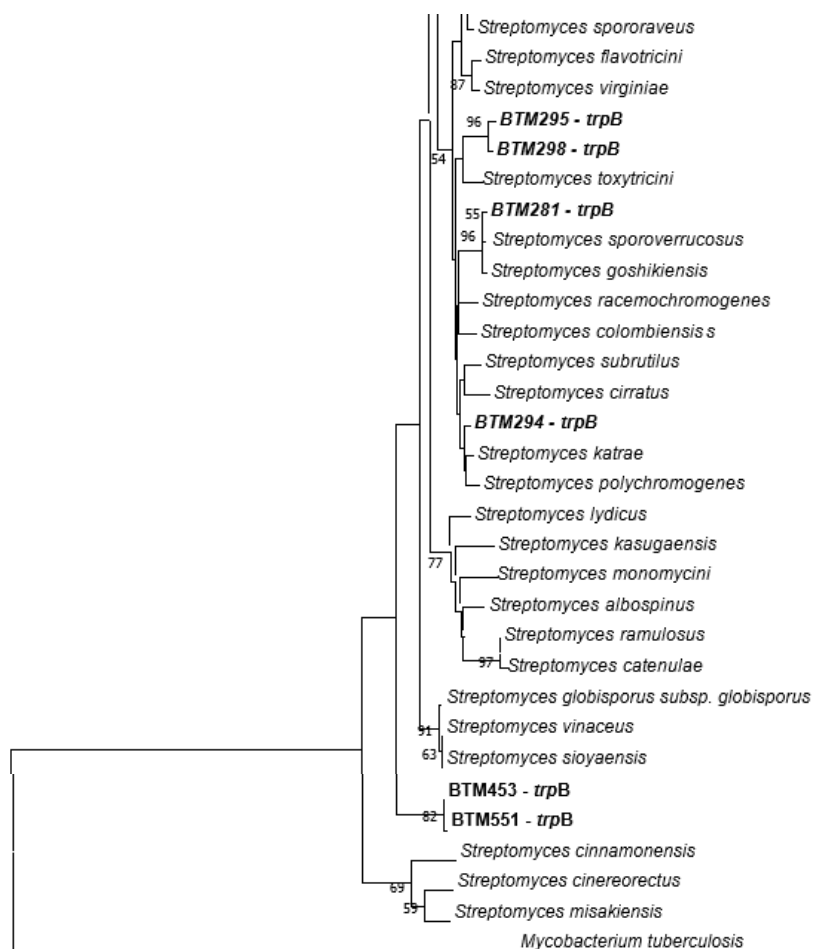
Anexo 4 (C) – Árvore filogenética do gene *recA* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp.



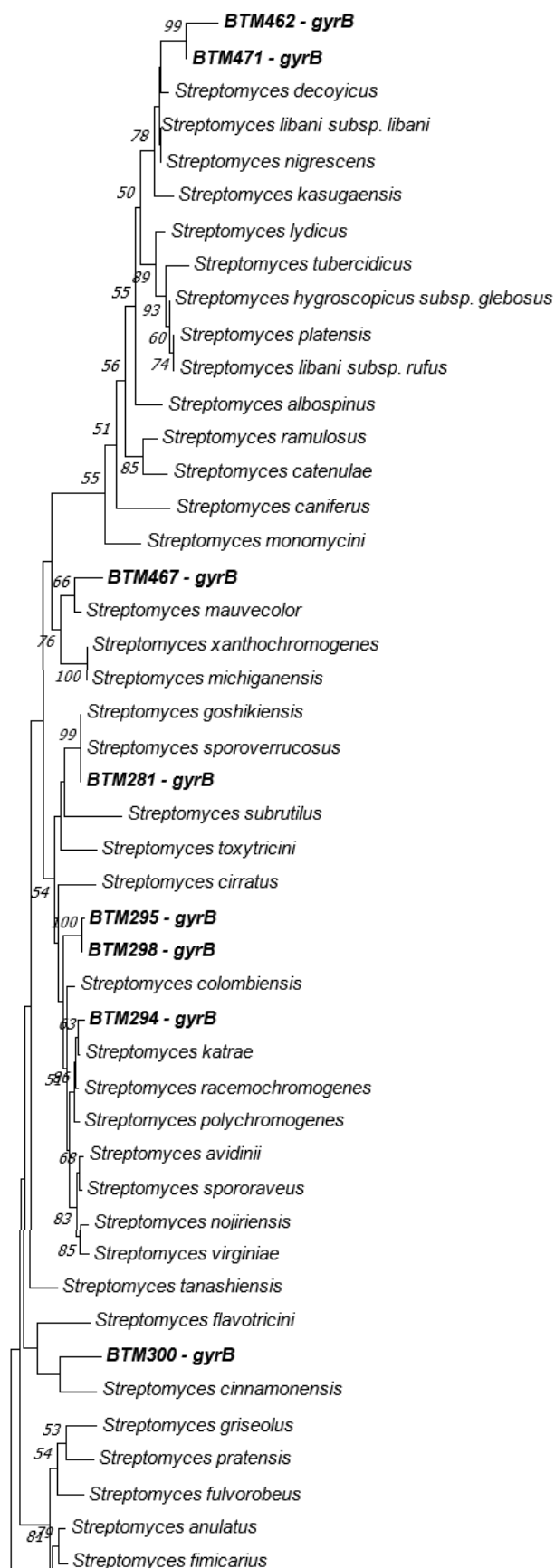
Anexo 4 (C) – Árvore filogenética do gene *recA* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 2.60313817 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1771).



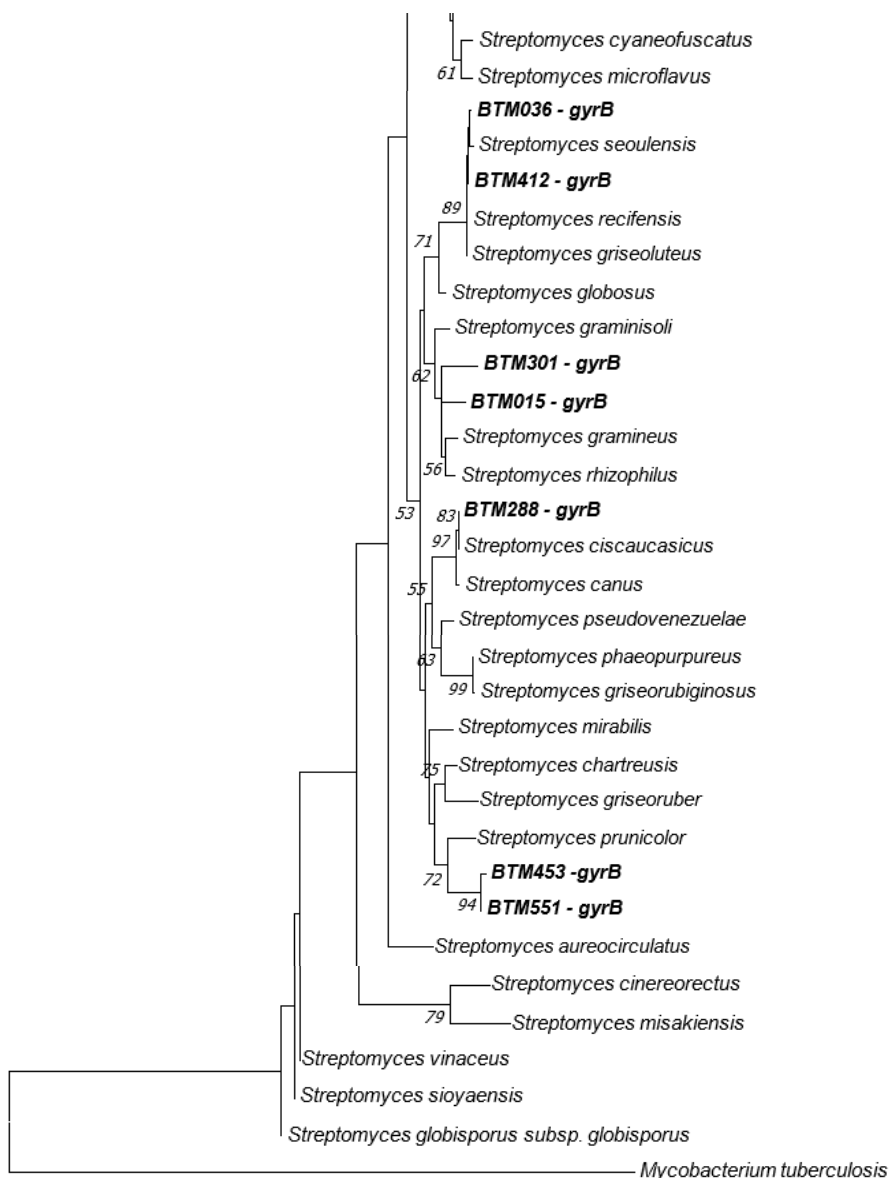
Anexo 4 (D) – Árvore filogenética do gene *trpB* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp.



Anexo 4 (D) – Árvore filogenética do gene *trpB* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 3.99477488 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,2091).



Anexo 4 (E) – Árvore filogenética do gene *gyrB* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp.



Anexo 4 (E) – Árvore filogenética do gene *gyrB* dos isolados BTM e espécies-tipo de *Streptomyces* sp. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ótima com a soma do comprimento do ramo = 5.52241845 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,3373).

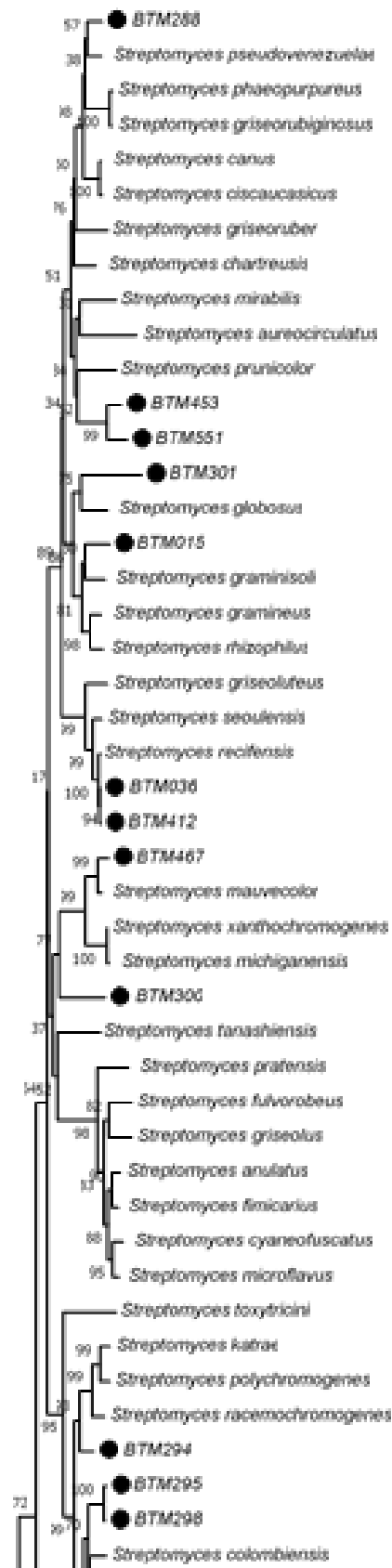
ANEXO 5 - Matriz de identidade de sequências (%) da análise MLSA de 5 genes *housekeeping* (*rpoB*, *atpD*, *recA*, *gyrB* e *trpB*) dos isolados BTM e 61 espécies-tipo de *Streptomyces* sp. mais relacionadas.

Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 BTM 015	ID													
2 BTM 036	92,4	ID												
3 BTM 281	88,4	88,7	ID											
4 BTM 288	92,6	92,8	89,5	ID										
5 BTM 294	90,5	90,4	94,1	90,7	ID									
6 BTM 295	88,8	89,2	95,2	89,6	94,0	ID								
7 BTM 298	88,7	89,3	95,2	89,5	94,0	99,4	ID							
8 BTM 300	89,4	89,8	90,0	90,5	90,3	89,5	89,4	ID						
9 BTM 301	92,3	91,8	88,0	91,3	89,2	88,1	88,1	88,5	ID					
10 BTM 412	92,4	99,7	88,7	92,8	90,4	89,1	89,2	89,7	91,8	ID				
11 BTM 453	92,1	91,2	89,5	92,3	89,6	88,6	88,6	89,3	90,5	91,1	ID			
12 BTM 462	86,1	86,3	86,4	86,9	86,9	86,2	86,1	85,7	85,5	86,2	85,4	ID		
13 BTM 467	89,1	89,6	89,7	90,3	90,2	89,5	89,3	90,9	88,3	89,6	88,6	86,9	ID	
14 BTM 551	91,2	90,8	89,7	92,3	89,4	88,6	88,7	89,4	90,5	90,7	97,6	85,2	89,4	ID
15 <i>S. libani</i> subsp. <i>libani</i>	87,3	87,5	88,2	88,0	88,4	87,5	87,5	86,9	87,0	87,5	87,8	94,9	88,5	87,7
16 <i>S. globosus</i>	93,4	94,3	88,9	93,0	89,9	89,1	89,0	89,6	93,1	94,2	92,1	86,6	89,0	91,3
17 <i>S. anulatus</i>	87,6	89,2	88,4	89,4	89,1	88,4	88,4	89,4	87,5	89,1	87,5	84,7	89,1	88,1
18 <i>S. toxytricini</i>	88,8	89,3	91,3	89,2	91,3	91,3	91,3	89,1	88,8	89,3	88,9	85,8	88,6	88,5
19 <i>S. gramineus</i>	94,8	92,7	89,9	93,5	91,2	90,2	90,1	90,4	92,6	92,7	93,5	86,8	89,4	92,0
20 <i>S. rhizophilus</i>	94,2	92,6	88,9	92,4	90,5	89,2	89,1	89,6	92,0	92,6	92,7	87,1	88,8	91,0
21 <i>S. fulvorobeus</i>	86,9	88,1	88,4	89,1	88,0	87,6	87,5	89,0	87,5	88,0	88,2	84,3	88,5	88,8
22 <i>S. colombiensis</i>	88,7	89,4	95,4	89,7	94,7	95,9	95,9	90,4	87,7	89,4	88,6	86,2	89,5	88,9
23 <i>S. subrutilus</i>	89,1	88,8	94,7	89,1	92,8	93,9	93,8	90,0	88,4	88,8	89,0	86,5	89,8	89,1
24 <i>S. monomycini</i>	86,8	88,2	87,1	88,0	87,7	87,3	87,3	86,8	87,0	88,0	86,6	89,3	88,4	86,7
25 <i>S. phaeopurpureus</i>	92,3	92,4	89,1	95,1	90,4	89,5	89,5	90,0	91,1	92,4	91,8	86,4	89,7	91,5
26 <i>S. canus</i>	92,8	92,1	89,9	96,5	90,4	89,9	89,9	90,2	91,2	92,1	93,1	86,3	90,6	92,6
27 <i>S. caniferus</i>	86,8	87,6	87,9	87,8	87,7	87,3	87,1	87,2	87,0	87,6	87,0	94,3	88,3	87,0
28 <i>S. goshikiensis</i>	88,4	88,7	99,4	89,5	94,0	95,2	95,2	90,0	87,9	88,7	89,4	86,5	89,8	89,5
29 <i>S. vinaceus</i>	90,2	90,5	89,3	89,6	90,3	89,7	89,7	89,5	89,9	90,4	88,8	86,4	88,7	88,7
30 <i>S. pseudovenezuelae</i>	92,4	92,4	89,6	96,8	90,5	90,0	89,9	90,6	91,3	92,4	92,5	86,5	90,2	92,5
31 <i>S. griseolus</i>	86,8	88,6	87,8	88,6	87,9	87,8	87,8	89,1	87,6	88,5	88,0	84,1	88,5	88,0
32 <i>S. cinereorectus</i>	84,4	84,4	84,2	84,2	85,2	84,2	84,1	84,1	83,5	84,5	84,4	84,6	84,5	84,6
33 <i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>glebosus</i>	86,8	87,4	87,9	87,9	88,0	86,9	86,9	87,3	86,5	87,4	87,3	94,3	88,2	87,2
34 <i>S. pratensis</i>	87,3	88,6	87,9	89,0	88,1	88,0	87,9	88,0	87,2	88,5	87,5	84,7	88,4	87,9
35 <i>S. griseoluteus</i>	91,2	96,1	92,4	92,3	92,9	91,9	92,0	90,9	90,2	96,0	90,6	87,3	90,6	90,8
36 <i>S. seoulensis</i>	92,5	98,0	88,7	92,9	90,3	89,4	89,3	90,1	92,2	97,9	91,3	86,0	89,6	91,0
37 <i>S. katrae</i>	89,2	88,9	93,5	89,5	95,7	93,9	93,9	90,3	88,9	88,9	88,5	86,6	89,4	88,4
38 <i>S. polychromogenes</i>	89,3	88,9	93,4	89,4	95,6	93,7	93,7	89,8	88,5	88,9	88,3	86,4	89,2	88,0
39 <i>S. sporoverrucosus</i>	88,3	88,8	99,4	89,5	94,0	95,2	95,2	90,0	88,0	88,8	89,4	86,5	89,8	89,5
40 <i>S. flavotricini</i>	89,2	89,5	92,8	90,4	91,4	92,2	92,2	90,5	88,7	89,5	89,6	86,5	88,7	89,1
41 <i>S. lydicus</i>	86,9	88,0	87,9	88,2	88,3	88,0	88,0	87,4	87,3	88,0	86,2	92,5	88,1	86,1

42	<i>S. recifensis</i>	92,5	99,4	88,9	92,8	90,4	89,2	89,2	89,7	91,9	99,3	91,3	86,2	89,7	90,9
43	<i>S. decoyicus</i>	87,3	87,6	88,2	88,5	88,3	87,3	87,3	87,3	87,3	87,6	87,2	95,2	88,5	87,1
44	<i>S. prunicolor</i>	91,1	91,8	89,1	92,8	89,3	88,5	88,5	89,3	89,9	91,7	93,0	86,0	89,4	92,6
45	<i>S. nigrescens</i>	87,3	87,5	88,1	88,0	88,4	87,5	87,5	86,9	87,0	87,5	87,6	94,9	88,5	87,5
46	<i>S. racemochromogenes</i>	89,5	89,5	94,4	89,6	95,8	94,5	94,5	90,5	89,0	89,5	88,9	86,1	89,3	88,7
47	<i>S. platensis</i>	86,8	87,5	87,9	87,9	88,1	87,0	87,0	87,4	86,4	87,5	87,2	94,3	88,1	87,2
48	<i>S. griseorubiginosus</i>	92,3	92,3	89,2	95,2	90,2	89,4	89,4	90,1	91,1	92,3	91,8	86,4	89,8	91,6
49	<i>S. mauvecolor</i>	89,6	89,9	89,7	90,9	90,7	89,8	89,6	91,2	89,2	89,8	88,9	87,8	97,6	89,6
50	<i>S. xanthochromogenes</i>	88,9	89,3	89,8	90,3	90,8	89,8	89,6	90,9	88,1	89,2	89,0	87,6	94,7	88,7
51	<i>S. cirratus</i>	88,2	89,1	94,4	89,0	93,3	94,6	94,4	89,3	87,8	89,0	88,4	85,5	89,1	88,8
52	<i>S. ciscaucasicus</i>	92,9	92,1	89,8	96,6	90,2	90,0	90,0	90,0	91,3	92,1	92,9	86,4	90,4	92,5
53	<i>S. graminisoli</i>	95,4	93,8	89,4	93,2	90,8	89,2	89,2	90,0	93,1	93,8	92,4	86,9	89,5	91,4
54	<i>S. misakiensis</i>	84,0	84,6	84,0	84,6	84,7	83,7	83,8	84,7	83,8	84,6	84,0	84,5	84,5	84,1
55	<i>S. avidinii</i>	88,5	89,1	95,3	89,5	93,9	95,5	95,6	89,7	88,2	89,1	88,2	86,3	89,0	88,6
56	<i>S. libani subsp. rufus</i>	86,0	86,6	86,8	87,1	86,8	86,0	86,0	86,4	85,5	86,5	86,3	92,7	86,6	86,4
57	<i>S. ramulosus</i>	86,6	87,2	85,9	87,2	87,0	86,0	86,0	86,3	86,8	87,2	86,0	90,6	86,6	86,2
58	<i>S. nojiriensis</i>	88,9	89,1	95,8	90,2	94,4	94,9	95,0	89,9	88,5	89,1	89,2	86,9	89,2	89,1
59	<i>S. tubercidicus</i>	86,3	86,9	87,5	87,4	87,6	87,1	87,1	87,0	86,1	86,9	86,8	93,9	87,4	86,8
60	<i>S. spororaveus</i>	89,1	89,3	96,1	90,2	94,4	95,5	95,6	90,3	88,7	89,2	89,2	87,1	89,7	89,3
61	<i>S. sioyaensis</i>	90,2	90,5	89,3	89,6	90,3	89,7	89,7	89,5	89,9	90,4	88,8	86,4	88,7	88,7
62	<i>S. fimicarius</i>	87,9	89,0	88,5	89,7	89,6	88,7	88,6	89,5	87,8	88,9	87,7	85,0	89,5	87,9
63	<i>S. virginiae</i>	88,9	89,3	95,6	89,9	94,3	94,9	95,0	90,1	89,0	89,3	89,1	86,9	90,0	89,2
64	<i>S. chartreusis</i>	92,4	92,5	90,2	94,1	90,9	89,6	89,6	90,5	91,4	92,5	92,4	86,8	90,3	92,2
65	<i>S. albospinus</i>	86,4	86,8	86,7	87,4	86,9	86,9	86,9	87,0	86,1	86,8	86,0	91,3	86,6	85,9
66	<i>S. _michiganensis</i>	89,0	89,3	89,7	90,0	90,7	89,9	89,6	90,7	87,9	89,2	89,0	87,6	94,6	88,6
67	<i>S. catenulae</i>	86,8	87,7	86,8	87,2	87,3	87,1	87,1	86,7	87,1	87,7	86,0	90,0	87,6	86,1
68	<i>S. cyaneofuscatus</i>	87,4	88,9	88,3	89,2	89,1	88,3	88,2	89,5	87,2	88,9	87,7	85,5	89,0	88,3
69	<i>S. microflavus</i>	87,7	89,3	88,4	89,5	89,5	88,2	88,3	89,4	87,6	89,2	87,8	85,5	88,9	88,2
70	<i>S. mirabilis</i>	91,1	91,9	89,2	93,1	89,8	89,2	89,1	89,8	90,2	91,9	91,7	86,2	90,1	92,8
71	<i>S. kasugaensis</i>	86,8	88,2	87,3	88,0	88,3	87,0	86,9	87,3	87,6	88,2	86,4	91,5	87,5	86,5
72	<i>S. griseoruber</i>	92,9	92,0	89,4	93,8	90,0	89,4	89,1	90,3	91,5	91,9	92,3	86,3	90,1	92,2
73	<i>S. globisporus subsp. globisporus</i>	90,0	90,4	89,3	89,6	90,3	89,6	89,5	89,4	89,7	90,3	88,9	86,5	88,7	88,7
74	<i>S. tanashiensis</i>	90,4	89,7	89,9	90,5	90,7	90,0	89,8	90,8	89,5	89,8	89,0	85,9	89,9	88,7
75	<i>S. aureocirculatus</i>	89,2	90,1	89,5	91,3	89,9	89,5	89,5	89,2	88,9	90,0	90,2	85,4	89,9	90,9

Matriz de similaridade de seqüências gerada a partir do alinhamento das seqüências concatenadas, no programa BioEdit.

ANEXO 6 - Árvore filogenética a partir da concatenação do gene 16S rRNA e genes housekeeping (*recA*, *trpB*, *gyrB*, *rpoB* e *atpD*)



(Continua.)



Anexo 6 - A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 2.64256087 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-3-parâmetros e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação da taxa entre os sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,1431).