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

Identificação e caracterização de genes provenientes de *Burkholderia seminalis*
TC3.4.2R3 relacionados ao controle da fusariose

Renata Assis Castro

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Renata Assis Castro
Ciências Biológicas

Identificação e caracterização de genes provenientes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3
relacionados ao controle da fusariose

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE VERDI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Castro, Renata Assis

Identificação e caracterização de genes provenientes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 relacionados ao controle da fusariose / Renata Assis Castro. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

75 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle biológico 2. *Burkholderia seminalis* 3. *Fusarium* 4. Glutamato sintase 5. Proteína TolB I. Título

DEDICO

A minha família (João, Lê e Laura) que fizeram tudo para esta conquista.

A minha mãe que mesmo na distância estava sempre presente em orações ...

Ofereço

A minha avó (in memória)... desta vez não será como no mestrado. Desta vez não deu tempo de você ouvir meu telefonema dizendo: "Acabou...". Mas você verá aí de cima!!!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dr^a Maria Carolina Quecine Verdi, pela oportunidade e confiança e pela honra de ser sua primeira aluna a ter o título de Doutora.

Ao Prof. Dr. Welington Luíz de Araújo: o que dizer á você...? se escrevi minha dissertação e agora estou escrevendo minha tese foi pela oportunidade que a quase 12 anos atrás você me deu. Mudou não só a minha vida mas de toda minha família. Nunca conseguirei agradecer à você pelo o que fez por nós. MUITO OBRIGADA...

As amigas Bruna, Carol (chefa) e Jack pela amizade. Nos momentos de escuridão chegavam com lanternas para clarear meu caminho. E nos momentos alegres enchiam mais ainda de cores e flores e muitas risadas nesta caminhada.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos: Isa, Carolzinha, Joelma, Helena, Tiago, Bruno, Everton, Daniel, Inês, Letícia, Zezo...e a tantos que passaram e já se foram. A nossa amizade será guardada eternamente.

A Capes, pela concessão de bolsa e financiamento das pesquisas.

A todos os funcionários do Departamento de Genética, que sempre foram solícitos e prontos à ajudar.

A minha família e amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e riram comigo nas alegrias.

Á Deus que me dá forças e coragem para continuar na caminhada desta vida. Que esteja comigo, nesta nova etapa... que as nuvens escuras possam logo dar lugar ao céu azul.

EPÍGRAFE

*“Você não sabe o quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu nem cochilei
Os mais belos montes escalei
Nas noites escuras de frio chorei,
A vida ensina e o tempo traz o tom
Pra nascer uma canção
Com a fé do dia a dia encontro a solução
Quando bate a saudade eu vou pro mar
Fecho os meus olhos e sinto você chegar
Você chegar...”*

Toni Garrido

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Doenças fúngicas em plantas causadas pelo gênero <i>Fusarium</i>	17
2.2. Controle biológico e os mecanismos de ação envolvidos no antagonismo microbiano.....	18
2.2.1. Controle biológico.....	18
2.2.2. Mecanismos de ação no controle biológico.....	19
2.3. Utilização de bactérias endofíticas como fonte de novos produtos biotecnológicos.....	20
2.3.1 Microrganismo endofítico.....	20
2.3.2 Aplicações do gênero <i>Burkholderia</i> no controle de fitopatógenos.....	20
2.4 Metabólitos, peptídeos ribossomais e não ribossomais em microrganismos.....	22
2.4.1 Sistema Tol-Pal e sua função.....	23
2.4.2 Glutamato Sintase.....	24
2.5 Mutantes obtidos a partir do transposon Tn5.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.1.1 Objetivos específicos.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1. Material Biológico.....	31
5.2. Atividade antimicrobiana in vitro da linhagem TC3.4.2R3 contra <i>Fusarium</i> spp.	32
5.3 Seleção de mutantes defectivos na inibição de <i>F. verticillioides</i> FV-01 CTC	33
5.4 Avaliação da produção de compostos antifúngicos termoestáveis pela linhagem TC3.4.2R3 e seus mutantes defectivos para controle de <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	34
5.5 Avaliação da produção de metabólitos livres de células pela linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes defectivos pra o controle de <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	34
5.6 Avaliação da atividade antagonica de <i>Fusarium</i> spp. pelos mutantes defectivos para <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	35
5.7 Caracterização, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueam o transposon em mutantes defectivos para inibição do crescimento do <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	35
5.7.1 Extração do DNA bacteriano.....	35
5.7.2 Comprovação da presença do transposon Tn5 nos mutantes selecionados por PCR.....	36
5.7.3 Clonagem dos genes nocauteados por Tn5.....	36
5.7.3.1 Obtenção de células competentes.....	36

5.7.3.2 Preparo do DNA genômico dos mutantes da linhagem TC3.4.2R3.....	37
5.7.3.3 Extração do DNA plasmidial de clones Tn5 de <i>E. coli</i> DH5 α -pir.....	37
5.7.3.4 Sequenciamento e análise das regiões flaqueadoras do transposon.....	38
5.7.3.5 Análises <i>in silico</i> dos genes candidatos ao controle da fusariose.....	38
5.8 Caracterização dos mutantes defectivos para síntese de glutamato e proteína TolB.....	39
5.8.1 Característica fisiológica relacionada à curva de crescimento dos mutantes.....	39
5.8.2 Atividade de antagonismo <i>in vitro</i> dos mutantes com silenciamento para glutamato sintase e proteína TolB contra <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	40
5.8.3 Caracterização molecular através de <i>Southern Blot</i>	40
5.8.3.1. Extração de DNA bacteriano.....	40
5.8.3.2 Restrição do DNA genômico e transferência para a membrana de náilon.....	40
5.8.3.3 Preparo da sonda e hibridização molecular.....	41
5.9 Análise de dados.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Antagonismo da linhagem TC3.4.2R3 contra diferentes espécies de <i>Fusarium</i> spp.....	42
6.2 Seleção dos mutantes quanto à perda da capacidade em produzir agentes antimicrobianos por meio do antagonismo.....	42
6.3 Caracterização dos compostos produzidos pela linhagem TC3.4.2R3 e seus mutantes defectivos no controle de <i>F. verticillioides</i> FV-CTC -01.....	43
6.4 Avaliação da atividade antagônica produzida pelos mutantes defectivos contra <i>Fusarium</i> sp.....	44
6.5 Caracterização molecular dos mutantes selecionados.....	45
6.5.1 Confirmação da inserção do transposon Tn5 por análise de PCR.....	45
6.5.2 Clonagem, sequenciamento e análise das regiões flaqueadoras do transposon Tn5.....	45
6.6 Análises <i>in silico</i> dos mutantes M15, M17 e M28 da linhagem TC3.4.2R3.....	47
6.7 Análise <i>in silico</i> de metabólitos secundários produzidos por <i>Burkholderia seminalis</i> linhagem TC3.4.2R3.....	48
6.8 Caracterização dos mutantes para glutamato sintase e TolB avaliados na inibição do crescimento do patógeno <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	49
6.8.1 Comparação da curva de crescimento entre a linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes em tempo determinado.....	50
6.9 Análise de <i>Southern Blot</i>	51
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

RESUMO

Identificação e caracterização de genes provenientes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 relacionados ao controle da fusariose

Na agricultura moderna, formas alternativas de alcançar maior produtividade de modo sustentável são prioridades. Entretanto, o sucesso agrícola é ainda excessivamente dependente do emprego de fertilizantes químicos e de defensivos agrícolas. A severidade de algumas doenças é um fator preocupante na produção de várias culturas. Dentre alguns patógenos de planta, destaca-se o gênero *Fusarium*, o qual apresenta uma expressiva importância na agricultura por ser patógeno em várias culturas de interesse econômico. Por outro lado, a utilização de microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole vem se tornando cada vez mais atrativa, pois, surge como uma alternativa capaz de amenizar gastos excessivos com controle químico e danos ao meio ambiente. Dentre esses microrganismos, destaca-se o gênero *Burkholderia*, conhecidamente capaz de produzir uma vasta gama de antimicrobianos, com diferentes níveis de especificidade. Essas bactérias vivem em interações com diversos microrganismos e plantas, em um ambiente altamente competitivo, resultando em uma fonte de metabólitos secundários, bacteriocinas dentre outros peptídeos. A linhagem TC3.4.2R3 *Burkholderia seminalis*, isolada endofiticamente de raízes de cana-de-açúcar, é capaz de controlar vários fungos e bactérias fitopatogênicas. A partir dessa linhagem foi construída uma biblioteca de mutantes randômicos por meio de transposon. Assim, por meio dessa biblioteca, o objetivo do trabalho foi selecionar mutantes defectivos no controle de diferentes espécies de *Fusarium*, identificar e caracterizar os genes nocauteados, visando o melhor entendimento do controle da fusariose. Os resultados obtidos por meio da caracterização do teste de antagonismo demonstrou que a linhagem TC3.4.2R3 selvagem produz metabólitos capazes de inibir *in vitro* o crescimento de *Fusarium* spp. A partir da biblioteca de mutantes, foram obtidos 8 mutantes defectivos para o controle de *Fusarium verticillioides* FV-01-CTC que não apresentaram alta especificidade quando avaliados contra outros *Fusarium* spp. Dentre os genes nocauteados foram identificadas sequências codificadoras para a proteína glutamato sintase, TolB e FAD. Até o momento não foi encontrado relatos sobre o glutamato como um biocontrolador de patógenos, entretanto o uso de mutantes sítio dirigido para esse gene confirmou o papel do mesmo no controle de FV-01-CTC. TolB é uma proteína relacionada ao transporte de substâncias e pode ter seu papel de controle relacionado à secreção de metabólitos secundários, visto que *in silico*, no genoma da TC3.4.2R3, foram encontrados 18 *clusters* responsáveis pela produção de metabólitos secundários. Assim, o presente trabalho abre novas perspectivas de estudo, visto que, os mecanismos de controle da fusariose por *B. seminalis* TC3.4.2R3 são amplos e sinérgicos. Há uma enorme perspectiva em desvendar o papel do glutamato e TolB no controle de fitopatógenos. Os mutantes caracterizados, pode ser fonte de novos estudos para o complexo entendimento da interação microrganismo-planta-patógeno, visto que há a possibilidade de verificar por exemplo o papel do glutamato proveniente da linhagem TC3.4.2R3 na promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: Controle biológico; *Burkholderia seminalis*; *Fusarium*; Glutamato sintase; Proteína TolB

ABSTRACT

Identification and characterization of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 genes related to the control of fusariosis

In modern agriculture, alternative ways of achieving high productivity with sustainability are priority. However, agricultural success is still excessively dependent on the use of chemical fertilizers and pesticides. The severity of some diseases are worrying factor in the production of different crops. Among plant pathogens, the genus *Fusarium* stands out, which has an important role in agriculture being disease causer in several crops such as: sugarcane, corn, passion fruit, tomato, banana, rice, and others. *Fusarium* can be found inhabiting soil in the most diverse geographical regions of the world, especially in tropical and subtropical climates. On the other hand, studies using endophytic microorganisms as biocontrol agents has become increasingly attractive, since they appear as an alternative to chemical control. Among these microorganisms, the genus *Burkholderia* stands out. This genus is able to produce a wide range of antimicrobials, with different levels of specificity. Moreover, *Burkholderia* has been received special attention because its potential plant growth promoter, bioremediation agents and recent studies aimed at biocontrol of diseases. These bacteria live in interactions with diverse microorganisms and plants in a highly competitive environment representing significant source of new bioactive secondary metabolites, bacteriocins among other peptides. The *B. seminalis* strain TC3.4.2R3, endofitically isolated from sugarcane roots, is able to control diverse phytopathogenic fungi and bacteria. By Tn5 randomic mutations, it was obtained a library of TC3.4.2R3 mutants. Thus, using this library, the objective of this work was select defective mutants to control of *Fusarium* spp., with the aimed the better understand the fusariosis control by identification and characterization of knocked out genes. The results obtained through the characterization of the antagonism assays allowed us to conclude that wild-type TC3.4.2R3 produces many metabolites with antifungal activity under *in vitro* conditions, being able to control the growth *Fusarium* spp. From the mutants library we found 8 defectives mutants to control of *F. verticillioides* FV-01-CTC. Among the knocked out genes we found sequences encoding glutamate synthase, TolB and FAD. To date no reports have been found on glutamate as a pathogen biocontroller, however the use of mutant site directed to this gene confirmed the role of the same in the control of FV-01-CTC. TolB is a protein related to the transport of substances and may have its biocontrol role related to the secretion of secondary metabolites, since *in silico* analysis in the genome of TC3.4.2R3, 18 clusters were found as responsible for the production of secondary metabolites. Thus, the present work opens new perspectives of study, confirming that the mechanisms of control of fusariosis by *B. seminalis* TC3.4.2R3 are ample and synergistic. There is a huge prospect in unraveling the role of glutamate and TolB in controlling of plant pathogens. The characterized mutants may be the source of new studies for understanding the complex interaction among microorganism-plant-pathogen, since it is possible to verify, for example, the role of glutamate from the TC3.4.2R3 strain in the plant growth-promotion.

Keywords: Biological control; *Burkholderia seminalis*; *Fusarium*; Glutamate synthase; TolB protein

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** O sistema Tol-Pal. Em de *Escherichia coli* o TolA consiste em três domínios (I,II,III) que ligam o IM e OM através de interações proteína-proteína com TolR e TolQ na membrana interna e o ToiB e Pal no periplasma. ColA liga-se a BtuB através do seu domínio de ligação ao receptor central, e em seguida, recruta OmpF como um translocador através da membrana externa. O domínio N-terminal de ColA insere-se através ou em torno de OmpF e interage com a TolA e TolB.....**24**
- FIGURA 2:** Esquema do ensaio de inibição do crescimento de *Fusarium* spp. pela linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3.....**32**
- FIGURA 3:** Esquema da seleção de mutantes defectivos para inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* FV-01-CT.....**33**
- FIGURA 4:** E Esquema proposto para verificação da inibição do crescimento de *F. verticillioides* FV-01-CTC pela linhagem selvagem TC3.4.2R3 e seus mutantes (esquerda). Fórmula utilizada para a avaliação do índice de inibição dos mutantes (direita).....**34**
- FIGURA 5:** Diferentes níveis de inibição da linhagem *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 sobre alguns fungos fitopatogénicos avaliados.....**43**
- FIGURA 6:** Antagonismo *in vitro* por pareamento da linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutntes contra o fitopatogeno *F. verticillioides* FV-01-CTC. A taxa de inibição foi mensurada após 7 dias de inoculação bacteriana (10^8 UFC.mL⁻¹). A taxa de inibição foi a média do crescimento da colônia sendo avaliadas 4 repetições (placas). Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamnte ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....**43**
- FIGURA 7:** Amplificação da região do trasnposon com os primers Tn5F e Tn5R) (WANG et al., 2008) a partir do DNA extraído dos 8 transformantes da linhagem B. seminalis TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antifúngica. O transposon Tn5 extraído de E. coli DH5α-pir:Tn5 foi utilizado como controle positivo. Não houve amplificação no DNA genômico da linhagem selvagem. O marcador de pares de base 100pb e o marcador de peso molecular 1Kb estão posicionados na lateral a esquerda do gel de agarose. A ordem das amostras da esquerda para a direita é: M3, M9, M15, M17, M20, M21, M25, M28 (mutantes), selvagem, TN5 e controle da reação de PCR.....**45**
- FIGURA 8:** DNA plasmidial contendo o transposon Tn5 extraído de células de *E. coli* DH5 –pir e enviadas para sequenciamento a jusante e a montante utilizando os *primers* KANFP-1 e KANRP-2 que anelam nas extremidades do transposon.....**46**
- FIGURA 9:** Avaliação do teste de antagonismo por pareamento *in vitro* da linhagem selvagem e dos mutantes M15 e M17 obtidos por meio da inserção do transposon Tn5, e pelos mutantes obtidos por troca alélica cepa com silenciamento do gene do glutamato (MR3) e a cepa com o gene silenciado mais sua complementariedade (2gg) contra o fungo *F. verticillioides* FV-01-CTC. A taxa de inibição foi mensurada após 7 dias de inoculação e a média do crescimento da colônia foi avaliadas 4 repetições (placas). Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....**50**
- FIGURA 10:** Curvas de crescimento da linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes em meio cultura LB. Sendo suplementado d seguinte forma: M15 e M17 suplementado com canamicina 100 µg/mL; MR3 foi suplementado com 50 µg/mL de cloranfenicol; e o mutante 2gg suplementdo com 50µg/mL de cloranfenicol mais 200µg/mL de canamicina. Os dados mostrados são representativos de 3 repetições por tratamento sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a uma OD_{600nm} em diferentes tempos.....**51**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Linhagens fitopatogênicas do gênero <i>Fusarium</i> utilizadas nos ensaios de antagonismo.....	32
TABELA 2: Caracterização dos mutantes defectivos para a inibição de diferentes espécies de <i>Fusarium</i> quanto à capacidade de produzir agentes microbianos.....	44
TABELA 3: Caracterização dos mutantes defectivos para a inibição de diferentes espécies de <i>Fusarium</i> quanto à capacidade de produzir agentes microbianos.....	44
TABELA 4: Análise das regiões flangeadoras do transposon de mutantes de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3, que apresentaram defectividade no controle do crescimento do <i>F. verticillioides</i> FV-01-CTC.....	47
TABELA 5: Descrição da identidade do gene mutato correspondente a glutamato sintase em diferentes bancos de dados glutamato sintase.....	48
TABELA 6: Descrição da identidade do gene mutado correspondente a proteína TolB em diferentes bancos de dados.....	48
TABELA 7: Clusters gênicos de metabólitos secundários de <i>Burkholderia seminalis</i> TC3.4.2R3 obtidos por meio do banco de dados antiSMASH (<i>Antibiotics Secondary Metabolic Analysis Shell</i>).....	49

1. INTRODUÇÃO

Dados obtidos pelo *Institut National D'études Demographiques* (INED) e pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) apontam que a população mundial em 2016 era de aproximadamente 7,4 bilhões de pessoas. Pelas estimativas realizadas para os próximos anos espera-se que em 2025, teremos em torno de 8,1 bilhões de pessoas, chegando à 9,6 bilhões em 2050 (CARRER et al., 2010). Com uma preocupação eminente, a FAO em janeiro de 2015, alertou que se o crescimento desordenado de consumo permanecer, em 2050 o mundo precisará de 60 % mais alimentos e 40 % mais água (ALEXANDRATOS et al., 2012). Dados publicados pela OECD-FAO (2015) mostram que o Brasil tem a quinta maior população (acima de 200 milhões) e a quinta maior superfície em extensão territorial com áreas férteis e clima favorável ao desenvolvimento de diversas culturas agrícolas e pecuária. Entretanto, nas últimas décadas o agronegócio em todo mundo está em estado de alerta: safra após safra vem sendo observado perdas na produtividade devido a pragas e doenças (ASHRAF et al., 2013). Mesmo com os avanços tecnológicos, doenças e pragas são responsáveis por prejuízos bilionários, afetando toda a cadeia produtiva, chegando até ao consumidor. Como exemplo, estudos recentes apontam uma perda média anual de até 7,7% da produção agrícola brasileira, o equivalente a 25 milhões de toneladas (TREMACOLDI 2010; LOPES-DA-SILVA et al., 2015; OECD-FAO, 2015), e nesse contexto, destaca-se as doenças fúngicas.

Dentre os fungos de grande importância para a agricultura mundial, podemos citar os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*. Esses patógenos podem ser encontrados habitando o solo, nas mais diversas regiões geográficas do mundo (SHUPING & ELOFF, 2017). Diferentes culturas de grande interesse econômico mundial como feijão (MACEDO et al., 2017), milho (PEREIRA et al., 2017), arroz (JUNG et al., 2018), soja (SAHU et al., 2017) e cana-de-açúcar (HILTON et al., 2017), são acometidas por doenças causadas por diferentes espécies de *Fusarium*. Em muitos casos, não há um controle químico viável para seu controle, pois além de oneroso economicamente, pode apresentar restrições do ponto de vista ambiental, por se tratar de um patógeno de solo (DORDEVIĆ et al., 2012; CARRER FILHO et al., 2015).

Em cana-de-açúcar, a fusariose pode ocasionar uma grande variedade de sintomas nas plantas, que dependem do estágio de desenvolvimento da cana-de-açúcar, do seu nível de resistência e das condições ambientais. Em plântulas de cana-de-açúcar os sintomas são: sistema radicular pouco desenvolvido; baixo vigor; podridão de raiz e de colo; *damping-off* (morte de várias plântulas agrupadas, denominadas reboleira). Em toletes de plantio, os sintomas são: baixa brotação das gemas; podridão de raiz; enfezamento (redução no tamanho) dos brotos. Nos

colmos os sintomas são muito parecidos com os da podridão vermelha e seu aparecimento está associado a ferimentos químicos ou físicos como aqueles causados por brocas (ROSSETTO & SANTIAGO, 2007). Outro dano causado é o chamado *Pokkah-Boeng*, em que ocorre uma deformação do topo da cana-de-açúcar. Essa doença, causada pelo fungo *F. verticillioides*, está amplamente espalhada pelas áreas de cultivo de cana-de-açúcar ao redor do mundo (HILTON et al., 2017). Embora não seja uma das doenças mais importante dos campos brasileiros essa doença pode causar grandes perdas na produção.

Além disso, *Fusarium* spp. produz um amplo espectro de micotoxinas (CHELKOWSKI, 1989), as quais resultam em diversos efeitos nocivos para a saúde humana e animal (JOFFE, 1986; GUPTA, et al., 2000). Durante o ciclo saprofítico e parasítico de vida, o *Fusarium* spp. é exposto a vários metabólitos tóxicos, incluindo metabólitos antifúngicos produzidos por microrganismos que coabitam o mesmo nicho (LAGOPODI, et al., 2002; QUECINE et al. 2016). Todavia, *Fusarium* spp. pode tolerar ou combater os metabólitos tóxicos e então ser capaz de se propagar, colonizar e infectar as plantas (SCHOUTEN, et al., 2004). Assim, a busca por compostos e ou novas práticas de manejos que possam inibir o crescimento deste fitopatógeno é de suma importância para agricultura global, sendo uma opção a utilização de produtos obtidos a partir de microrganismos (TAN et al., 2013).

É sabido que o interesse no emprego de microrganismos em práticas agrícolas aumentou significativamente nos últimos anos, pois tanto na área de promoção de crescimento vegetal, como no controle biológico de pragas e doenças de plantas, eles apresentam-se como potenciais substitutos à produtos químicos, sendo uma alternativa menos honerosa tanto economicamente como ambientalmente (LUCY et al., 2014).

Dentre esses microrganismos, bactérias do gênero *Burkholderia* têm sido descritas como um dos grupos mais importantes encontrados no interior das raízes e associada a rizosfera, vivendo comensalmente em uma íntima associação com plantas de interesse agrícola (MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010; SUÁREZ-MORENO et al., 2012; ANDREOTE et al., 2014; LOPES et al., 2016). Este gênero é caracterizado por apresentar grande versatilidade nutricional, podendo metabolizar diferentes fontes orgânicas de carbono. Essa capacidade reflete em sua habilidade em colonizar os mais variados nichos e produzir diversos compostos (MENDES et al., 2007). O gênero *Burkholderia* apresenta-se descrito na literatura em diferentes contextos de aplicação no manejo agrícola, podendo ser aplicado em biocontrole, para processo de biodegradação e biorremediação, como promotora de crescimento vegetal, demonstrando assim sua importância ecológica e biotecnológica (VIAL et al., 2007; DE SOUZA et al., 2013; MOREIRA et al., 2016). O antagonismo por *Burkholderia* spp.(principalmente contra fungos

fitopatogênicos e oomicetos) é bem estabelecido devido há diferentes compostos metabólitos produzidos por este gênero (DA SILVA ARAÚJO et al., 2017). Dentre alguns compostos destacamos pirrolnitrina (EL-BANNA et al., 1998; HWANG et al., 2002), fenazinas (CARTWRIGHT et al., 1995), cepacidine A (MAO et al., 2006; DA SILVA ARAÚJO et al., 2017), cepaciamides A (JIAO et al., 1996), sideróforos (TYRRELL et al., 2015) entre outros.

A linhagem endofítica identificada como *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 foi isolada de raízes de cana de açúcar (LUVIZOTTO et al., 2010), foi descrita como uma bactéria de grande potencial biotecnológico devido sua capacidade de solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de ácido indolacético (AIA), dentre outros mecanismos. Além disso, em estudos realizados por Araújo et al., (2016), com a mesma linhagem foi capaz de inibir o crescimento do fitopatógeno *Burkholderia gladioli* (o qual causa necrose em de plantas de orquideas) por meio de sua capacidade de produção de metabólitos antimicrobianos.

Visando compreender os mecanismos genéticos relacionado as habilidades demonstradas por essa linhagem, seu genoma foi recentemente sequenciado (acesso LAEU01000000). Foram obtidas informações referente à mecanismos importantes para a compreensão da interação dessa linhagem com plantas. Foram encontrados *clusters* gênicos para pirrolnitrina, para biossíntese de AIA, para a degradação de etileno via ACC desaminase, entre outros, demonstrando que a associação microrganismo-planta esta diretamente relacionado a sua capacidade de produção de hormônios vegetais, além de apresentar capacidade de ação antifúngica (ARAÚJO et al. 2016).

É notório o grande potencial biotecnológico que esta linhagem apresenta como biocontroladora de diversos patógenos. Contudo é necessário um estudo direcionado para o funcionamento do mecanismos de ação dos genes que causam este controle a fim de comprovar a atividade direta da bactéria. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os genes de *B. seminalis* (TC3.4.2R3) e sua caracterização visando o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no controle da fusariose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doenças fúngicas em plantas causadas pelo gênero *Fusarium*

Desde que os seres humanos começaram a cultivar plantas, as doenças fúngicas têm sido uma das principais causas de perdas nas culturas. Com a crescente demanda por alimentos, devido ao crescimento populacional desordenado, cada vez mais é necessário o aumento da produtividade das culturas agrícolas e de áreas de plantio. No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos os fitopatógenos, insetos pragas e plantas daninhas continuam a ser sérios problemas na área agrícola (TREMACOLDI 2010; OECD-FAO, 2015).

O gênero *Fusarium* apresenta uma expressiva importância na agricultura por ser patógeno em várias culturas de interesse econômico tais como: maracujá (FLORES et al., 2012), tomate (MCGOVERN, 2015), banana (FORTUNATO et al., 2012; HO et al. 2015), cana-de-açúcar (GOSWAMI et al., 2014), milho (LANUBILE et al., 2014), dentre outras.

Este gênero pode ser encontrado habitando o solo, nas mais diversas regiões geográficas do mundo com características de clima tropical e subtropical. É capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos, podendo colonizar ramos, folhas, inflorescência e frutos através de seus conídios que são disseminados pelo ar ou pela água de irrigação e até mesmo pelo uso de implementos agrícolas que contenham propágulos do fitopatógeno (DAVIS et al. 2006).

O gênero *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme ao laranja), com micélio aéreo e difuso (DOMSH et al., 1980). Sua variabilidade morfológica tem gerado controvérsia na taxonomia e classificação das espécies de *Fusarium* devido a fatores como perda de características morfológicas, variação e mutação dentro da cultura, dificultando a criação de um sistema taxonômico (GEISER et al., 2004), bem como a busca de biomoléculas específicas para seu controle.

Desde 1900, aproximadamente 1000 espécies de *Fusarium* foram descritas, a maioria pelas características das suas estruturas (esporodóquios), diretamente nos hospedeiros ou substratos naturais, o que levou a que muitas dessas espécies fossem consideradas sinônimas, tendo em vista a grande variabilidade deste fungo em diferentes ambientes e substratos (LESLIE & SUMMERELL, 2008).

A complexa comunidade microbiana que habita a rizosfera interage com os patógenos de solo e influenciam, consequentemente, a infecção pelos fungos. Na rizosfera, além dos microrganismos patogênicos, também existem fungos e bactérias que possuem atividade

antagonística contra fitopatógenos. Eles podem afetar adversamente densidades de populações dinâmicas temporais e espaciais, atividades metabólicas de patógenos de solo a partir da produção de metabólitos antimicrobianos secundários como micotoxinas, enzimas líticas, entre outros (RAAIJMAKERS et al., 2009).

Como exemplo, a fusariose em milho, vem sendo controlada através do uso de vários tipos de fungicidas (muitas vezes usados em consórcios) que são aplicados tanto nas sementes, como na área foliar. Ambos demonstraram eficiência na redução da incidência da doença em milho (LASCA et al., 2005). Este resultado vem reforçar que o controle químico da fusariose é possível, porém temos que considerar o alto custo dos insumos químicos utilizados e o prejuízo causado ao meio ambiente. Assim, se faz necessário encontrar uma alternativa contra a doença que seja menos danosa ao meio ambiente e honerosa ao produtor consequentemente ao consumidor.

2.2 Controle biológico e os mecanismos de ação envolvidos no antagonismo microbiano

2.2.1 Controle biológico

O desenvolvimento de doenças infecciosas é caracterizado por uma série de eventos que ocorrem de maneira ordenada. Estes eventos incluem a sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno, como um ciclo das relações patógeno-hospedeiro (AGRIOS et al., 2005).

O controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas a agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis. Em um conceito mais amplo Cook & Baker (1983) definiu controle biológico como “redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem.” Já Freitas et al. (2005), tem como base o conceito de Cook & Baker (1983), porém com uma visão mais atual e direta, diz que o controle biológico visa reduzir a densidade do inóculo ou a atividade de um patógeno, excluir da planta hospedeira ou suprimir o patógeno após ter ocorrido a infecção.

No cenário agrícola atual, o controle de algumas doenças é visto como uma grande dificuldade. Cada vez mais se torna um desafio obter o controle de doenças devido à demanda por produtos livres de resíduos químicos e pela percepção da sociedade em geral, sobre o impacto das práticas que são utilizadas no controle de doenças, como o uso excessivo de agrotóxicos e suas consequências para a saúde dos seres humanos e para o meio ambiente (PUNJA & UTKHEDE, 2003). Desta forma, levando em consideração os custos financeiros e

ambientais, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate às doenças.

2.2.2 Mecanismos de ação no controle biológico

O desenvolvimento de produtos a base de microorganismo visando controle biológico de doenças em plantas, tem sido uma alternativa fundamental, especialmente no contexto do manejo integrado de pragas e doenças, principalmente quando empregada com outros métodos de controle, apresentando baixo custo e pouca agressividade ao ecossistema (SILVA et al., 2004; TAN et al., 2013).

O controle biológico pode ocorrer de maneira direta, quando o antagonismo envolve o antagonista-patógeno, ou indiretamente, quando envolve patógeno-planta-antagonista por meio de indução de resistência (DUFFY; KEEL; DÉFAGO 2004).

Mais detalhadamente, Romero et al. (2007) classificou alguns mecanismos de ação em antagonismo direto e indireto:

Antagonismo direto: a) produção de substâncias antimicrobianas (antifúngicos, antibióticos e bacteriocinas); b) competição por nutrientes; c) competição por nichos; d) produção de compostos antimicrobianos voláteis; e) detoxificação (degradação de substâncias tóxicas produzidas pelo patógeno); f) hiperparasitismo (bacteriófagos, vírus que infectam bactérias e podem levar a morte bacteriana); g) predação e parasitismo (visto geralmente em actinomicetos); h) produção de enzimas líticas (quitinases, β -1,3-glucanases dentre outras); i) produção de toxinas; j) silenciamento gênico do competidor (envolve substâncias químicas que podem modular ou bloquear a síntese de agentes antimicrobianos ou enzimas, através do silenciamento gênico.); l) interferência no fenômeno *quorum sensing* (acil-homoserina lactonas, moléculas sinalizadoras produzidas pelas bactérias que modulam a expressão de genes); m) produção de sideróforos (sequestro ou quelação do ferro).

Antagonismo indireto: certas bactérias são capazes de disparar um fenômeno de resistência na planta através de sua indução após exposição à elicitores, sendo eles abióticos ou bióticos, de forma que ocorra a resposta imediata dos tecidos, que reagem mais eficientemente as tentativas de colonização pelo patógeno.

O controle por indução de resistência da planta é dito como indireto porque envolve também o hospedeiro. Este mecanismo se divide em duas categorias distintas: SAR (resistência sistêmica adquirida) – quando a planta ativa com eficácia o mecanismo de resposta à infecção primária por um patógeno; e ISR (resistência sistêmica induzida) – não ocorre o acúmulo de

produção de proteínas como na SAR, sendo mediada por uma rota de sinalização de jasmonato/etileno não apresentando fenótipo de doença a planta. No entanto, a elucidação dos mecanismos de ação muitas vezes é dificultada devido à complexa interação patógeno-hospedeiro-antagonista.

Com tantas possibilidades, se faz necessário estudos mais aprofundados para melhor elucidação sobre os mecanismos de ação de agentes de biocontrole, para a obtenção de linhagens antagonistas mais efetivas e o desenvolvimento de métodos de produção e formulação mais consistente, que aumente a atividade antagonística e que cumpram requisitos, de pacotes toxicológicos e de registro, necessários para o desenvolvimento de um produto comercial.

2.3 Utilização de bactérias endofíticas como fonte de novos produtos biotecnológicos

2.3.1 Microrganismo endofítico

Endófitos podem ser definidos como microrganismos que colonizam os tecidos internos da planta sem causar danos visíveis ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis, ocorrendo principalmente nas folhas, ramos e raízes sem causar danos às mesmas (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007).

As bactérias endofíticas foram descobertas por Darnel em 1904 (TAN & Zou, 2001) e desde então tem sido isolados de diversas plantas hospedeiras, incluindo as de grande interesse agrônomo. São frequentemente encontradas em todas as plantas estudadas, (até o momento), colonizando seus tecidos internos e podendo estabelecer uma variedade de interações mutualísticas, comensais e simbióticas como o controle de fitopatógenos.

A capacidade de bactérias endofíticas atuarem no controle biológico pode ser resultado de vários fatores, como produção de antibióticos, promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica (MADHAIYAN et al., 2004). Produtos antimicrobianos produzidos por bactérias endofíticas têm se apresentado como importantes alvos de estudo, pois representam um reservatório de novos compostos ainda não explorados (BRADER et al., 2014).

2.3.2 Aplicações do gênero *Burkholderia* no controle de fitopatógenos.

O gênero *Burkholderia* compreende bactérias Gram-negativas, aeróbicas, não formadoras de esporos, taxonomicamente pertencente à subdivisão β -proteobactéria. O gênero compreende 65 espécies válidas segundo a Lista de Nomes Bacterianos Aprovados (DSMZ, 2017). Possui

grande versatilidade nutricional, capaz de metabolizar mais de 200 diferentes fontes orgânicas de carbono, refletindo na sua capacidade em habitar os mais variados nichos. Pode ser linhagens de solos, da rizosfera de inúmeras culturas agrícolas, de ambientes hospitalares, da água (incluindo água do mar), além de várias espécies de plantas, animais e humanos (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001).

Bactérias deste gênero também já foram utilizadas no manejo agrícola, para o biocontrole, biodegradação/biorremediação e promoção do crescimento vegetal (PERIN et al., 2006). Embora alguns membros do gênero *Burkholderia* sejam patógenos ou associados com algumas doenças em seus hospedeiros, a grande maioria das espécies associadas às plantas não são patogênicas e podem apresentar uma interação neutra ou benéfica com seus hospedeiros. Resultados com experimentos em campo utilizando bactérias do gênero *Burkholderia* demonstraram a capacidade dessas bactérias em colonizar a rizosfera de milho, trigo, arroz, ervilha, girassol e rabanete, aumentando significativamente o crescimento da planta hospedeira, além de reduzir a presença de patógenos (CHIARINI et al., 2006).

O controle biológico utilizando *Burkholderia* poderia substituir parcialmente a utilização de pesticidas químicos comuns, como captan, thiran, PCNB, benomil e tiabendazol, assim como fumigantes, como brometo de metila (composto químico com alto potencial de destruição do ozônio), cloropicrin e todos os fungicidas ou biocidas de amplo espectro (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001).

Agentes antimicrobianos são substâncias orgânicas que podem combater ou inibir o crescimento de outros organismos. Tem sido utilizado para o controle de doenças de origem bacteriana e fúngica em diferentes culturas. Apresentam baixo peso molecular e em pequenas concentrações, podem ser deletérias ao crescimento ou a atividade metabólica de outros microrganismos (MAIA et al., 2009).

Há uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana associada a esse gênero: cepacinas, pirrolnitrinas, cepaciamidas, cepacidinas, alteridinas, quinolonas, fenazinas, sideróforos e lipopeptídeos, em sua maioria, compostos com atividade antifúngica (PARKER et al., 1984; HWANG et al., 2002; MAO et al., 2006). No entanto, a especificidade desses metabólitos quanto ao controle de patógenos do gênero *Fusarium* ainda não estão bem compreendidos.

A detecção da produção de pirrolnitrina, por exemplo, por uma linhagem de *B. cepacia* B37w esteve associada à inibição dos sintomas da seca da raiz por *Fusarium sambucinum* (BURKHEAD et al., 1994). Bevinino et al. (2000) observaram que a linhagem de *B. cepacia* MC17, já descrita como excelente agente promotor de crescimento de plantas de milho, foi também

capaz de controlar a infestação pelo fungo *F. verticillioides* nos estágios iniciais de crescimento da planta, fase em que é observada uma maior densidade da bactéria (NACAMULLI et al., 1997). O trabalho realizado por Mendes et al. (2007) constatou que a *B. cepacia* é o endófito cultivável mais abundante na rizosfera de cana-de-açúcar e que é eficiente no controle *in vitro* do fungo *F. verticillioides*, causador da *Pokeka Boeng*, uma das doenças mais frequentes que causa perdas na produção comercial em plantações de cana-de-açúcar e milho.

Frente a sua alta versatilidade, o interesse e a importância em estudos com as espécies do gênero se justifica, pois apresenta grande potencial para novas abordagens e futuras aplicações (LUVIZOTTO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2016).

2.4 Metabólitos, peptídeos ribossomais e não ribossomais em microrganismos

O conjunto de processos metabólicos que desempenham função associada ao crescimento celular microbiano está relacionado com metabolismo primário, onde os principais metabólitos são enzimas, ácidos orgânicos entre outros (BROGDEN, 2005). Em muitos microrganismos têm sido observada a produção de compostos orgânicos que não estão envolvidos diretamente com o crescimento e reprodução. Estes compostos podem ser gerados no início ou final da fase de crescimento da bactéria e são conhecidos como metabólitos secundários ou peptídeos (MOFFITT & NEILAN 2001; BROGDEN, 2005).

Esses peptídeos podem ser sintetizados por duas vias: ribossomal envolvendo a produção de peptídeos por todas as espécies vivas, incluindo bactérias que participam do sistema de defesa do hospedeiro conhecidos também como peptídeos ribossomais (PKSs), boa parte deles atuando como hormônios, toxinas, pigmentos ou antibióticos. Podem ser peptídeos sintases não ribossomal (NRPSs) uma classe de metabólitos secundários peptídicos produzidos por microrganismos como bactérias e fungos (KOLTER & MORENO, 1992; MARSHALL & ARENAS, 2003). São sintetizados por sintetases, que, ao contrário dos ribossomos, são independentes da RNA mensageiro. Cada sintetase de peptídeo não ribossomal pode sintetizar um único tipo de peptídeo. Esses compostos são produtos naturais muito diversificados, com uma gama extremamente ampla de atividades biológicas e propriedades farmacológicas. São muitas vezes toxinas, sideróforos e pigmentos (XU et al., 2012). Segundo Muller et al. (2015) a ocorrência de sequências de NRPS foi fortemente dominada pelos membros do filo Proteobacteria especialmente do gênero *Burkholderia*.

Outros peptídeos a serem considerados são as bacteriocinas ou colicinas, definidas como peptídeos ou proteínas biologicamente ativas produzidas por bactérias em condições de estresses,

e que são capazes de inibir em baixas concentrações até isolados taxonomicamente relacionados (SOUZA & SOUSA, 2005; CHEIKHYOUSSEF et al., 2008). Podem ser relacionadas como antibióticos por definição, diferenciando dos antibióticos mais clássicos por apresentarem espectro de ação restrito. Podem conferir imunidade à célula hospedeira; sendo sintetizadas ribossomicamente e normalmente não são tóxicas para o hospedeiro (CHEIKHYOUSSEF et al., 2008). As bacteriocinas são moléculas com atividade antibiótica mais abundante e diversificada, abrangendo proteínas de diferentes tamanhos; mecanismo de ação, propriedades de imunidade (RILEY & WERTZ, 2002).

2.4.1 Sistema Tol-Pal e sua função

Para as bactérias gram negativas, o melhor sistema de classificação para as bacteriocinas são os modelos das colicinas. Elas demonstram uma ampla variação de estrutura e mecanismo de ação que incluem a formação de poros, inibição da síntese da parede celular, atividade DNase e RNase (HOLTSMARK et al., 2007).

O sistema Tol-Pal compreende um conjunto de proteínas interiplasmáticas associadas à membrana que interligam a membrana interna e externa fornecendo à célula uma estrutura para a divisão celular, transdução de energia e transporte de partículas. Este último é dado pelo consumo da força proton-motriz como força de energia. Os mecanismos envolvidos no transporte de metabólitos secundários são os mesmos envolvidos na liberação de antibióticos relacionados ao mecanismo de resistência (PENFOLD et al., 2012).

O centro do sistema Tol-Pal é encontrada uma proteína TolA que forma interações proteína-proteína com todos os outros membros do sistema e também com proteínas extrínsecas, como colicinas A, E1, E2-E9 e N, e as proteínas de revestimento da família de filamentos e bacteriófagos (WALBURGER et al., 2002).

Os membros desta família de proteínas são a proteína periplasmática TolB encontradas em bactérias Gram-negativas. TolB faz parte do complexo multiproteico Tol-Pal (lipoproteína associada a peptidoglicano), compreendendo cinco proteínas de envelope, TolQ, TolR, TolA, TolB e Pal, que formam dois complexos (GODLEWSKA et al., 2009). As proteínas da membrana interna TolQ, TolR e TolA interagem através dos seus domínios transmembranares (figura 1). O TolB também interage com as proteínas Lpp e OmpA associadas à peptidoglicana da membrana externa. O TolA sofre uma mudança conformacional em resposta a mudanças na força motora de prótons e interage com Pal de uma maneira dependente de energia. O domínio periplasmático C-terminal de TolA também interage com o domínio N-terminal de TolB

(GODLEWSKA et al., 2009; PENFOLD et al., 2012).

Figura 1: O sistema Tol-Pal. Em de *Escherichia coli* o TolA consiste em três domínios (I,II,III) que ligam a membrana interna e externa através de interações proteína-proteína com TolR e TolQ na membrana interna e o TolB e Pal no periplasma. Cola liga-se a BtuB através do seu domínio de ligação ao receptor central, e em seguida, recruta OmpF como um translocador através da membrana externa. O domínio N-terminal de Cola insere-se através ou em torno de OmpF e interage com a TolA e TolB (PENFOLD et al., 2012).

Com essas informações é clara a importância do sistema Tol-Pal para a integridade da membrana externa bacteriana. A TolB está envolvida na captação independente de tonB de colicinas do grupo A (colicinas A, E1, E2, E3 e K) e é necessária para que as colicinas atinjam seus respectivos alvos após a ligação inicial à bactéria (PENFOLD et al., 2012). O estudo da sua estrutura sugere que a proteína TolB pode estar envolvida na reciclagem de peptidoglicano ou na sua ligação covalente com lipoproteínas. O sistema Tol-Pal também está implicado na patogênese de algumas bactérias mas o (s) mecanismo(s) não é claro (KIM et al., 2014).

2.4.2 Glutamato Sintase

A glutamato sintase (GltS) pode ser conhecida também por: GOGAT ou Glutamina 2-oxoglutarato amido-transferase. É constituído por um complexo de flavoproteína ferro-enzofre sintetizada pelos genes *gltB* e *gltD* e desempenha um papel fundamental nas vias de assimilação de amônia encontradas em bactérias e plantas (LEA & MIFLIN, 2018). A GltS catalisa uma interessante conversão na qual o nitrogênio da cadeia lateral da glutamina é transferido para α -cetoglutarato para formar duas moléculas de glutamato após a aquisição de dois elétrons de um redutor adequado (RICHARDS et al., 2010). A amônia é a primeira opção entre as fontes de nitrogênio incorporadas pelos aminoácidos glutamina e glutamato os quais são os principais doadores de átomos de nitrogênio para outros compostos nitrogenados e seus derivados

(RICHARDS et al., 2010). Informações detalhadas sobre o mecanismo cinético e químico dessa enzima complexa foram obtidas principalmente por meio de estudos da enzima da bactéria fixadora de nitrogênio *Azospirillum brasilense* (RICHARDS et al., 2010). Esse gene GltS procariótico é um heterodímero no qual ambos os sítios da glutamina e sua sintase estão localizados na subunidade α da enzima juntamente com um cofator FMN e um aglomerado [3Fe-4S], que norteiam o elétron de transferência. Em planta o GltS, está evolutivamente relacionada à forma da enzima presente nas cianobactérias, uma cadeia polipeptídica única que contém um cofator FMN e um *cluster* [3Fe-4S] (MANDER & LIU, 2010). Para essa enzima, no entanto, a fonte de poder redutor é a ferredoxina, que transfere elétrons para o cofator FMN formando um complexo transiente com a subunidade α .

2.5 Mutantes obtidos a partir do transposon Tn5

A mutagênese por transposon, ou seja mutagênese por transposição, é um processo biológico que permite que sequencias de DNA sejam transferidas para o cromossomo de um organismo hospedeiro, interrompendo ou modificando a função de um gene existente no cromossomo e causando mutação (GHATAK, 2011). A mutagênese por transposon é muito mais efetiva que a mutagênese química, com uma maior frequência de mutação e menor chance de matar o organismo. Outras vantagens incluem ser capaz de induzir mutações de acerto único, ser capaz de incorporar marcadores selecionáveis na construção de linhagens e ser capaz de recuperar genes após mutagênese (SEIFERT et al., 1986). As desvantagens incluem a baixa frequência de transposição em sistemas vivos e a imprecisão da maioria dos sistemas de transposição.

No caso de bactérias, a mutagênese por transposição é geralmente realizada por meio de um plasmídeo do qual um transposon é extraído e inserido no cromossomo hospedeiro. Isso geralmente requer que um conjunto de enzimas, incluindo transposase, seja traduzido. A transposase pode ser expressa em um plasmídeo separado, ou no plasmídeo contendo o gene a ser integrado. O sistema transposon Tn5 é um sistema modelo para o estudo da transposição e para a aplicação da mutagênese do transposon. Tn5 é um transposon caracterizado pela heterogeneidade e versatilidade, onde os genes (o sistema original contendo genes de resistência a antibióticos) são flanqueados por duas sequências de inserção quase idênticas, denominadas IS50R e IS50L correspondentes aos lados direito e esquerdo do transposon respectivamente (GORYSHIN & REZNIKOFF, 1998). Estas sequências são ambas flanqueadas por elementos de 19 pares de bases nas extremidades interna e externa do transposon. A mutação dessas regiões

resulta na incapacidade de os genes da transposase se ligarem às sequências. Logo a utilização desta ferramenta se tornou muito útil para o estudo de fenômenos biológicos favorecendo a caracterização de genes, devido sua inserção aleatória e a facilidade em selecionar mutantes devido ao gene resistente a canamicina.

A biblioteca de mutantes utilizados neste trabalho foi construída através da inserção aleatória do transposon Tn5 no genoma da bactéria *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 gerando assim os mutantes.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo de genes em bactérias endofíticas responsáveis pelo controle de doenças é relativamente novo e pode ser uma importante ferramenta para o conhecimento de possíveis novas moléculas com potencial biotecnológico, e um aprofundamento sobre suas propriedades, contribuindo para o desenvolvimento de produtos aplicáveis na agricultura e em áreas afins. Assim, a crescente procura por novos compostos bioativos contra fitopatógenos derivados de microrganismos demonstra a importância de estudos em nível gênico destes compostos. O presente trabalho foi idealizado mediante uma série de estudos preliminares que demonstraram o potencial para controle biológico e a busca de novos genes a partir de bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, mais precisamente a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3. Dentre patógenos que merecem atenção, destacamos o gênero *Fusarium*, causador de doenças nas mais diversas culturas com destaque para cana-de-ácucar, milho, ervilha, dentre outros. Dessa forma, este trabalho visou a busca de genes de *B. seminalis* linhagem TC3.4.2R3, relacionados ao controle biológico da fusariose e a especificidade desses compostos mediante diferentes espécies de *Fusarium*.

4. OBJETIVOS:

4.1 Objetivo geral

Identificar genes de *Burkholderia seminalis* linhagem (TC3.4.2R3) relacionados à inibição de crescimento de fitopatógenos *Fusarium* spp. e caracterizar os mesmos visando o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no controle da fusariose.

4.1.1 Objetivos específicos:

- i) caracterizar mutantes *B. seminalis* TC3.4.2R3 provenientes da biblioteca obtida por Tn5 quanto a perda da capacidade de inibir o crescimento de *F. verticillioides*;
- ii) caracterização dos mutantes selecionados quanto a termoestabilidade dos metabólitos produzidos no controle de *F. verticillioides* e livre de células;
- iii) especificidade dos mutantes selecionados no controle de *Fusarium* spp;
- iv) identificar dos genes nocauteados nos mutantes selecionados de *B. seminalis* TC3.4.2R3 relacionados ao controle de *Fusarium* spp.;
- v) análise *in silico* do genoma e genes nocauteados dos mutantes defectivos para controle da fusariose, afim de compreender o mecanismo de biosíntese e biocontrole de moléculas biotivas produzidas pela linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 por meio da biblioteca de mutantes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material biológico

No presente estudo foi utilizada a linhagem selvagem TC3.4.2R3 de *B. seminalis* e seus 1788 mutantes previamente obtidos por Mano (2011). A linhagem TC3.4.2R3 e seus mutantes foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (Departamento de Microbiologia, ICB/USP). A linhagem selvagem TC3.4.2R3 foi isolada endofiticamente de raiz de cana-de-açúcar por Marcon (2007) e Rossetto (2008). Mendes et al., (2007) e Luvizzoto et al., (2010) realizaram as primeiras caracterizações dessa linhagem em relação a produção de enzimas comprovando seu potencial para fixação de nitrogênio, produção de AIA, sideróforos e solubilização de fosfato. Luvizotto et al., (2010), também verificou seu o potencial de biocontrole contra diferentes patógenos de cana-de-açúcar.

Mano (2011), construiu uma biblioteca de mutantes randômicos a partir da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, utilizando o transposon Tn5, por meio do transposoma EZ-Tn5 <R6Kyor/KAN-2>, que apresenta um complexo estável formado pela enzima transposase, tendo o gene de resistência a canamicina como marca de seleção (Epicentre, Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA).

Para a manutenção da linhagem selvagem TC3.4.2R3, bem como seus mutantes, foi utilizado o meio LB (10grs. Triptona, 5grs. extrato de levedura, 10grs. NaCl, 18grs. ágar), sendo os mutantes crescidos em meio suplementado com canamicina (200µg.mL⁻¹). As linhagens foram crescidas em meio LB e posteriormente adicionado glicerol para uma concentração final de 60% e estocadas à -80°C. Todos os experimentos foram rotineiramente iniciados com culturas frescas crescidas em meio LB, sendo acrescentado canamicina ao meio de cultura para os mutantes e crescido a 28°C.

F. verticillioides FV-01 CTC, patógeno de cana-de-açúcar gentilmente cedido pela Doutora Sabrina Moutinho Chábregas do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba-SP. Além do fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC, causador do *Pokka Boing* em cana-de-açúcar, foram utilizados outros fitopatógenos *Fusarium* spp. (Tabela 1). *F. oxysporum* isolados: R2 238 e R5 são fitopatógenos de ervilha. *F. verticillioides* T4 Ø, é um isolado patogênico de milho e foi gentilmente cedido por Dr. Cynthia M. Ocamb, Universidade do Estado de Oregon (Oregon States University- OSU).

Os fitopatógenos pertencem a coleção de micro-organismo do laboratório de Genética de Micro-organismo “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, ESALQ/USP.

Os isolados fúngicos foram rotineiramente crescidos em meio de batata dextrose e ágar (BDA) (Difco) e estocados à temperatura ambiente, em discos de BDA imersos em água destilada autoclavada.

Tabela 1: Linhagens fitopatogênicas do gênero *Fusarium* utilizadas nos ensaios de antagonismo

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Referência
FV-01 CTC	<i>F. verticillioides</i>	Cana-de-açúcar	Quecine, 2010
T4Ø	<i>F. verticillioides</i>	Milho	Quecine et al. 2016
R2 238	<i>F. oxysporum</i>	Ervilha	Quecine et al. 2016
R5	<i>F. oxysporum</i>	Ervilha	Quecine et al. 2016

5.2 Atividade antimicrobiana *in vitro* da linhagem TC3.4.2R3 contra *Fusarium* spp.

A capacidade da linhagem selvagem TC3.4.2R5 de inibir o crescimento dos fitopatógenos de *Fusarium* spp. (Tabela 1) foi avaliada por meio do método de pareamento de culturas. Para tanto, em uma das extremidades placa de Petri contendo meio de cultura BDA foi estriada a linhagem TC3.4.2R3, no centro da placa foi inoculado um disco de 2 cm de diâmetro do fungo (Figura 2). Após a inoculação, as culturas foram incubadas à 28°C por 7 dias. O tratamento controle consistiu do fitopatógeno inoculado no centro da placa de Petri, na ausência da linhagem TC3.4.2R3 e incubados sob as mesmas condições. O ensaio foi realizado em triplicatas biológicas para cada tratamento.

Figura 2: Esquema do ensaio de inibição do crescimento de *Fusarium* spp. pela linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3.

5.3 Seleção de mutantes defectivos na inibição de *F. verticillioides* FV-01 CTC

A seleção de mutantes defectivos no controle da fusariose foi realizada utilizando o fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC, que apresentou maior inibição de crescimento quando pareado com a linhagem selvagem TC3.4.2R3 (item 5.2). O ensaio foi realizado por meio de pareamento *in vitro* em meio de cultura BDA, onde em dois quadrantes da placa de Petri foram inoculados por estriamento mutantes randômicos a partir da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, utilizando o transposon Tn5 (NEVES, 2011). No terceiro quadrante foi estriada a linhagem selvagem TC3.4.2R3 como controle positivo. No centro da placa foi inoculado um disco de 2 cm de diâmetro do fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC (Figura 3). Após a inoculação, as placas foram incubadas à 28°C por 7 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliados qualitativamente.

Figura 3: Esquema da seleção de mutantes defectivos para inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* FV-01-CTC.

Os mutantes selecionados no teste qualitativo como defectivos na inibição do crescimento de *F. verticillioides* FV-01-CTC foram então utilizados em ensaios semi-quantitativos de inibição do mesmo fitopatógeno. Para tanto, 10 µL de solução bacteriana (10^8 UFC. mL⁻¹) da linhagem TC3.4.2R3 foram inoculadas em uma extremidade da placa de Petri contendo meio de cultura BDA, em outra extremidade foi adicionado o mutante defectivo selecionado e no centro da placa foi colocado disco de 2 cm de diâmetro do fungo.

O índice de inibição foi calculado de acordo com a fórmula: raio de crescimento das laterais do fungo que não estavam expostas a ação bacteriana (y2) foram consideradas 100%. A partir desse valor foi calculada a redução do crescimento fúngico nas laterais expostas a ação bacteriana (y1) de acordo com a fórmula: $(y1/y2) \times 100$ (QUECINE et al. 2016) (Figura 4).

Figura 4: Esquema proposto para verificação da inibição do crescimento de *F. verticillioides* FV-01-CTC pela linhagem selvagem TC3.4.2R3 e seus mutantes (esquerda). Fórmula utilizada para a avaliação do índice de inibição dos mutantes (direita), adaptado de Quecine et al. (2016).

Cada mutante foi avaliado em quintuplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias feitas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os mutantes defectivos na capacidade de inibir o *F. verticillioides* FV-01-CTC foram avaliados quanto a termoestabilidade dos possíveis compostos produzidos e a presença dos mesmo na membrana celular.

5.4. Avaliação da produção de compostos antifúngicos termoestáveis pela linhagem TC3.4.2R3 e seus mutantes defectivos no controle de *F. verticillioides* FV-01-CTC

A termoestabilidade dos possíveis compostos antifúngicos produzidos pela linhagem TC3.4.2R3 e os mutantes defectivos na inibição de crescimento de *F. verticillioides* FV-01-CTC foi realizado de acordo com o método descrito por Soria et al., (2015). A linhagem TC3.4.2R3 (selvagem e mutantes) foram transferidas, separadamente, por meio de uma alça de repicagem para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de BD. Em seguida, as culturas foram incubadas em agitador a 28°C a 180 rpm durante 5 dias. Transcorrido este período, uma alíquota de 10 mL foi retirada de cada frasco e transferida para novos frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de BDA. Os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos, a 120°C e a 1 atm de pressão e vertidos 20 mL em 5 placas de Petri. Após a solidificação, um disco de 5 mm de diâmetro, obtido de colônias ativas de *F. verticillioides* FV-01-CTC foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo no meio de cultura bactérias (mortas) e seus metabólitos produzido.

5.5 Avaliação da produção de metabólitos livres de células pela linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes defectivos no controle de *F. verticillioides* FV-01-CTC

A linhagem TC3.4.2R3 (selvagem e mutantes) foram transferidas, através de uma alça de repicagem para frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de BD. Em seguida, as culturas

foram incubadas em agitador 28°C a 180rpm durante 5 dias. Após esse período, a cultura foi centrifugada e filtrada em membrana millipore (0,22 µm) a fim de retirar células ou partes solutas, e uma alíquota de 10 mL foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio BDA fundente. Depois de vertidos e solidificados os meios em placas de Petri, um disco de 5 mm de diâmetro obtido de colônias ativas de *F. verticillioides* FV-01-CTC foi transferido para o centro das mesmas. O controle foi representado pelo fitopatógeno, em placas contendo apenas o meio de cultura BDA.

5.6 Avaliação da especificidade da atividade antagônica de mutantes defectivos no controle de *Fusarium* spp.

A capacidade dos mutantes defectivos no controle de FV-01-CTC em inibir o crescimento dos fitopatógenos de *Fusarium* spp. (Tabela 1) foi avaliado por meio do método de pareamento de culturas. Para tanto, em uma das extremidades da placa de Petri contendo meio de cultura BDA foi estriada a linhagem TC3.4.2R3 no centro da placa foi inoculado um disco de 2 cm de diâmetro do fungo. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 28°C por 7 dias. O tratamento controle consistiu do fitopatógeno inoculado no centro da placa de Petri, na ausência da linhagem TC3.4.2R3 incubados sob as mesmas condições. A análise do resultado foi verificada pelo crescimento ou não da colônia.

5.7 Caracterização, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueam o transposon em mutantes defectivos para inibição do crescimento do *F. verticillioides* FV-01-CTC

5.7.1 Extração do DNA bacteriano

O DNA genômico da linhagem TC3.4.2R3 e de seus mutantes defectivos para inibição do crescimento do fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC foram extraídos para análises moleculares. As linhagens foram crescidas em 5 mL de meio LB a 28°C por 18 horas. Após esse período cada linhagem foi centrifugada por 5 minutos a 12.000g e o sedimentado (*pellet*) foi ressuspenso em 500 µL de TE (10mM de Tris-HCl), 80 µL de SDS 10% e 0,5g de pó de sílica e levado ao vórtex por 1 minutos. Em seguida incubado no banho-seco por 10 minutos a 80°C. A suspensão foi vortexada por 1 minuto e adicionado 500 µL de fenol saturado, agitado levemente e centrifugado por 7 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo

com o auxílio de uma pipeta e o DNA foi purificado pelo método fenol-clorofórmio de acordo com a metodologia estabelecida por Sambrook & Russell (2001).

O sobrenadante foi transferido para novos microtubos, e adicionados 4 μL de NaCl 5M e 400 μL de isopropanol para a precipitação do DNA, incubado em gelo por 5 minutos e em seguida centrifugado por 7 minutos, descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado por mais 7 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao pellet 500 μL de etanol 100% e centrifugado por mais 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco em banho seco por 30 minuto a 60°C. Após a secagem, o DNA foi ressuspensionado em 70 μL de água deionizada esterilizada. A concentração e a integridade dos DNA's extraídos foram verificadas em gel de agarose 1,0% utilizando como padrão de comparação o marcador Lambda (λ), nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ng. μL^{-1} .

5.7.2 Comprovação da presença do transposon Tn5 nos mutantes selecionados por PCR

A presença do transposon Tn5 no DNA dos mutantes defectivos na inibição do crescimento de FV-01-CTC foi confirmada através da utilização de um par de oligonucleotídeos que amplificam as regiões parciais deste transposon: Tn5F (5' - GGACGCGATGGATATGTCT- 3') e Tn5R (5' -GATGGTCGGAAGAGGCATAA- 3') (ARAÚJO et al., 2016). Para a reação de PCR foi utilizado 100 ng de DNA, 10x PCR buffer, 0,5mM dNTPs, 0,2 μM de cada primer e 1,0U Taq polimerase. As reações foram conduzidas em termociclador programado para: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR foi avaliado em gel de agarose 1% para observação de um fragmento esperado de 399 pb, respectivamente, utilizando o marcador 1 Kb e 100pb (Fermentas Life Sciences, Brasil).

5.7.3 Clonagem dos genes nocauteados por Tn5

5.7.3.1 Obtenção de células competentes

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α -*pir* foram obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 mL de meio SOC (10g Triptona; 5g extrato de levedura; 0,05g NaCl; pH 7,0), posteriormente incubado sob agitação de 200 rpm, a 28° por 18h. Após o crescimento, a

cultura foi transferida para um frasco contendo 250 mL de meio SOB (2g Triptona; 5% extrato de levedura; 10mM NaCl), a 28°C sob agitação de 200rpm, até atingir uma densidade ótica entre 0,4 a 0,6 (OD_{600nm}) medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). Após atingir a OD desejada, a cultura foi centrifugada a velocidade de 5000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em glicerol 10% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em glicerol 10% seguido de diluição para atingir uma OD de 0,100 (OD_{600}). Aliquotas de 100 μ L foram estocadas a -80°C.

5.7.3.2. Preparo do DNA genômico dos mutantes da linhagem TC3.4.2R3

Para a realização da clonagem das regiões flanqueadoras do transposon em *E. coli* DH5 α -pir, foram utilizados 600ng do DNA de cada mutante, sendo clivados com 5 U da enzima de restrição *EcoRI* (NEB) e incubado 37°C por 4 horas. Posteriormente o produto clivado foi precipitado com 0,1 volume de acetato de amônio a 7,8 M e 2,5x volume de etanol absoluto, e em seguida incubado a -20 °C *overnight*. Após este período, o DNA clivado com *EcoRI* e precipitado em acetato de amônio/etanol, foi centrifugado a 12.000 rpm por 40 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 700 μ L de etanol 70% ao DNA precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos (12.000 rpm a 4°C) e o sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado seco a 37°C e ressuscitado em 7,0 μ L de água deionizada estéril e incubado em banho seco a 65°C por 30 minutos. Os fragmentos obtidos da digestão foram circularizados com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) por 18 horas a 4°C. Após a ligação, os fragmentos foram introduzidos em células de *E. coli* (DH5 α -pir) eletrocompetentes, por eletroporação (Gene Pulser, BioRad – 2,5 Kv, 25 μ F, 400 Ω , cubetas de 0,2 cm)

Após a eletroporação as células foram imediatamente transferidas para microtubos com meio LB a um volume final de 1 mL, e incubadas a 37° durante 60 minutos, sob agitação. Cem microlitros (sem diluição e concentrado de 800 μ L após centrifugação) da suspensão foram semeados em meio LB sólido contendo 200 μ g/mL de canamicina. As placas foram incubadas a 37° por até 24 horas, e as colônias crescidas foram armazenadas em meio LB suplementado com canamicina 200 μ g/mL, contendo 60% de glicerol e estocada a -80°C.

5.7.3.3 Extração do DNA plasmidial de clones Tn5 de *E. coli* DH5 α -pir

O DNA plasmidial dos clones Tn5 *E. coli* DH5 α -pir foi extraído utilizando o Kit PureLink Quick Plasmid Minprep (Invitrogen). Dois clones representantes de cada isolado mutante transformado foram crescidos em 100 mL de meio LB suplementado com canamicina 200 μ g/mL, crescidos sob agitação a 170 rpm, durante 24 horas a 37°C. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada e todo sobrenadante descartado, e a miniprep foi conduzida conforme o protocolo do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi ressuspendido em 150 μ L de água deionizada autoclavada. A concentração do DNA plasmidial foi quantificada através do Nanodrop, e a integridade do DNA plasmidial, seu tamanho, e a ocorrência ou não por DNA genômico, foram verificadas em gel de agarose 1,0%. Para isso, cerca de 500 ng do DNA extraído foram tratados com a enzima de restrição *EcoR1*, incubados entre 1 a 3 horas a 37°C, para linearização do plasmídeo.

5.7.3.4 Sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon

Para a identificação das sequências de DNA dos genes interrompidos pelo transposon EZ-Tn5 <R6Kygori/KAN-2>KAN-2-Tnp, o DNA circularizado contendo o transposon, extraído de células de *E. coli* DH5 α -pir foi submetido ao sequenciamento, sendo a reação realizada a jusante e a montante utilizando os primers que anelam nas extremidades do transposon KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e R6KAN-2 RP-1 (5'-CTACCCTGTGGAACACCTACATC-3'). Foram selecionados dois clones representantes de cada mutante selecionado e os mesmos foram sequenciados em duplicata a jusante e a montante totalizando 16 sequências. As sequências obtidas foram visualizadas e editadas utilizando o software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Após as sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST, o Blastn (análise de nucleotídeos) e Blastx (análise de proteínas) contra a base de dados do GenBank.

5.7.3.5 Análises *in silico* de genes candidatos ao controle da fusariose

Para as análises *in silico* dos genes encontrados nos mutantes defectivos para fusariose, foi utilizado o genoma parcial (*draft*) da linhagem TC3.4.2R3 depositado no NCBI cedido pelo Dr. Welington Luiz de Araújo (acesso LAEU01000000). Com a ferramenta Blastx foi realizada a verificação de domínios putativos de proteínas hipotéticas e confirmado o resultado com outras bases de dados.

Em paralelo, foi realizada a busca de *clusters* para a produção de metabólitos secundários presentes no genoma de TC3.4.2R3 por meio do programa *Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell* (antiSMASH, <http://antismash.secondarymetabolites.org/>) (MEDEMA, 2011).

5.8 Caracterização dos mutantes defectivos para síntese de glutamato e proteína TolB

Selecionamos os mutantes M15 (defectivo para a síntese de glutamato) e M17 (defectivo para a proteína TolB) para caracterizar as possíveis alterações no comportamento de *B. seminalis* por meio de alterações em seu crescimento.

Em relação ao gene glutamato sintase também foram avaliados os mutantes MR3 e 2gg, ambos gentilmente cedidos pelo Dr. Welington Luiz de Araújo. O mutante MR3, que tem marca de seleção cloranfenicol 50 ug/ml, é um mutante defectivo para síntese de glutamato sintase por troca alélica. O mutante 2gg é o mutante MR3 com a reinserção do gene glutamato sintase contendo dupla resistência: cloranfenicol (50 ug/ml) e canamicina (200 ug/ml). Para manutenção destes mutantes, foi utilizado o meio LB (Luria Bertani), acrescidos com canamicina (200 µg.mL⁻¹) para os mutantes M15 e M17; para o mutante MR3 meio LB acrescido com cloranfenicol (50 ug/ml); e para o mutante 2gg meio LB acrescido com cloranfenicol (50 ug/ml) mais canamicina (200 ug/ml). As linhagens foram crescidas em meio LB líquido e posteriormente adicionado glicerol 60% e estocadas à -80°C.

5.8.1 Característica fisiológica relacionada à curva de crescimento dos mutantes

Foi obtida a curva de crescimento da linhagem TC3.4.2R3 selvagem, os mutantes: M15, M17, 2gg e MR3. As linhagens foram crescidas em placas com meio LB e acrescidas de antibiótico apropriado, por 3 dias à 28°C. Uma unidade formadora de colônia de cada linhagem foi inoculada em tubos contendo 10 mL de meio LB líquido. O pré-inóculo foi mantido a 28°C, 180 rpm durante 24 horas. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 1 mL para verificação da densidade ótica em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech) a OD_{600nm} e realizado ajustes de concentração bacteriana e volume, afim de padronizar a concentração inicial de todas as amostras em OD_{600nm} = 0,02 em erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB e incubadas a 28°C, 120 rpm. A cada duas horas, 1 mL da cultura era retirado para a realização das leituras da densidade ótica em um comprimento de onda à 600nm. O ensaio foi realizado em triplicata para cada tratamento.

5.8.2 Atividade de antagonismo *in vitro* dos mutantes com silenciamento para glutamato sintase e proteína TolB contra *F. verticillioides* FV-01-CTC

Os mutantes caracterizados para a perda da atividade da glutamato sintase (M15, MR3) e da proteína TolB (M17) foram submetidos a testes semi-quantitativos de antagonismo por pareamento contra o crescimento de *F. verticillioides* FV-01-CTC. O mutante 2gg e a linhagem selvagem TC3.4.2R5 como controle positivo. Para tanto, 10µL de solução bacteriana (10^8 UFC. mL⁻¹) da linhagem TC3.4.2R5 selvagem foi inoculada em uma extremidade da placa de Petri contendo meio de cultura BDA, e em outra extremidade foi adicionado o mutante defeutivo selecionado e no centro da placa foi inoculado disco de 2 cm de diâmetro do fungo. O índice de inibição foi calculado de acordo com a fórmula: $100\% - 100\% * (b/a)$. Onde 100 é valor de crescimento total em placa e *a* e *b* são os quadrantes da placa. O ensaio foi realizado em quadriplicata para cada tratamento.

5.8.3. Caracterização molecular através de *Southern Blot*

Para verificar o número de inserções do plasmídeo Tn5 no genoma da linhagem TC3.4.2R3:Tn5, foi utilizada a técnica de *Southern blot*.

5.8.3.1 Extração de DNA bacteriano

A linhagem TC3.4.2R3 selvagem, bem como os mutantes defeitivos selecionados (M15 e M17) tiveram seus DNA's extraídos de acordo com o protocolo descrito no item 2.5.1.

5.8.3.2 Restrição do DNA genômico e transferência para a membrana de náilon

Os DNA's extraídos foram clivados com a enzima de restrição *EcoR1* (Invitrogen). As reações de restrição em um volume total de 250 µL, contendo 7,5 µg de DNA bacteriano ou 500ng do plasmídeo Tn5, 25 µL de tampão React 3 10X e 40U da enzima *EcoR1*, foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Para concentrar foi realizada uma precipitação adicionando 25 µL de acetato de amônio 7,8M e 625 µL de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos (10.000xg, 4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado seco a 37° C. Após a secagem, o DNA hidrolisado foi resuspenso em 32 µL de TE e 8 µL de sacarose

40%. Os 40 μL de DNA foram aplicados em gel de agarose 1%. Como marcador de peso molecular, 40 μL do DNA Ladder 1Kb (0,2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Fermentas), foi utilizado. A eletroforese, foi realizada a 1 $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio (1,0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e fotodocumentado.

O gel de agarose foi então submetido à depurinização por incubação em 500 mL de solução HCl 0,25M por 10 minutos. Após este período, o gel foi lavado com água destilada e transferido para 500 mL de solução desnaturante (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M) por 30 minutos. O gel foi lavado novamente com água destilada, e em seguida neutralizado por incubação por 15 minutos em 250 mL de solução neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; EDTA 0,001 M; pH 7,2), com agitação branda a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Por capilaridade, o DNA contido no gel foi transferido para a membrana de náilon (HYBOND-N+ - AMERSHAMP), sendo utilizada a solução de transferência SSC 20X (NaCl 3M; citrato de sódio 0,3 M; pH 7,0). O DNA foi fixado à membrana por aquecimento (80°C por 2 horas) e então armazenada à temperatura ambiente.

5.8.3.3 Preparo da sonda e hibridização molecular

Para a hibridização foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo uma região interna ao sítio de inserção do plasmídeo Tn5. Para a obtenção do fragmento o transposon foi extraído de células de *E. coli* DH5 α -pir: Tn5 (QIAprep Spin Miniprep, QUIAGEN) e submetido a PCR os primers Tn5F (5'-ATTCAACGGGAAACGTCTTG-3') e Tn5R (5'-ACTGAATCCGGTGAGAATGG-3') e purificado utilizando UltraClean™ – up Kit (MOBIO Laboratories). A marcação da sonda e a hibridização foram realizadas utilizando o sistema de fosfatase alcalina termoestável (Amersham AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems, GE HealthCare), a 55°C segundo as recomendações do fabricante. Todos os passos da hibridização foram realizados no forno de hibridização Hybridiser HB-2D (Techne). Após a hibridização a membrana foi lavada com tampão SSC (20x:NaCl, 3M; citrato de sódio, 0,3M; água MilliQ, 500 mL; pH7) e documentada por autorradiografia.

5.9 Análise de dados

Toda a análise estatística dos experimentos foi realizada com o auxílio do programa SAS – Copyright © 1989-1996 pelo SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

6. RESULTADOS

6.1 Antagonismo da linhagem TC3.4.2R3 contra diferentes espécies de *Fusarium* spp.

Foram avaliados 4 fitopatógenos *Fusarium* spp. provenientes de diferentes culturas (Tabela 1), sendo observado que a linhagem TC3.4.2R3 foi capaz de inibir todos os fitopatógenos. Entretanto, a maior inibição ocorreu no antagonismo entre a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e o fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC (Figura 5). Assim, o fitopatógeno FV-01-CTC foi utilizado para seleção dos potenciais mutantes defectivos no controle da fusariose.

Figura 5: Diferentes níveis de inibição da linhagem *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 sobre alguns fungos fitopatogênicos avaliados.

6.2 Seleção dos mutantes quanto à perda da capacidade em produzir agentes antimicrobianos por meio do antagonismo

Dentre os 1788 mutantes da biblioteca gerada a partir da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, foram avaliados 682 mutantes por meio da técnica de pareamento de cultura contra *F. verticillioides* FV-01-CTC. Foi observado que somente 8 mutantes apresentaram perda ou redução da capacidade de inibição contra o fitopatógeno avaliado. Os 8 mutantes que apresentaram diminuição visual clara do halo de inibição foram denominados internamente pelo grupo de pesquisa como: M3, M9, M15, M17, M20, M21, M25 e M28, sendo então selecionados para o ensaio semi-quantitativo.

No ensaio semi-quantitativo, foi observado que apenas o mutante M20 não apresentou diferença estatística a ser considerado realmente defectivo para o controle do crescimento do FV-01-CTC comparado com a linhagem TC3.4.2R3 selvagem (Figura 6). Os demais mutantes

apresentaram perda da capacidade de inibir *in vitro* o crescimento de FV-01-CTC em diferentes percentuais de inibição.

Figura 6: Antagonismo *in vitro* por pareamento da linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes contra o fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC. A taxa de inibição foi mensurada após 7 dias de inoculação bacteriana (10^8 UFC.mL⁻¹). A taxa de inibição foi a média do crescimento da colônia sendo avaliadas 4 repetições (placas). Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

6.3 Caracterização dos compósitos produzidos pela linhagem TC3.4.2R3 e seus mutantes defectivos no controle de *F. verticillioides* FV-01-CTC

Foi observado que todos os mutantes exceto M20, deixaram de inibir o patógeno FV-01-CTC quando pareados em placa de Petri. Os componentes livre de célula do mutante M9 inibiu o crescimento de FV-01-CTC. E, dentre os mutantes avaliados, somente o mutante M20 inibiu o crescimento de FV-01-CTC mesmo quando tratado termicamente (Tabela 2). Ressaltamos que a variável em análise neste experimento é o crescimento fúngico, logo quanto maior o percentual do crescimento fúngico menor será a inibição do mesmo.

Tabela 2: Caracterização dos mutantes defectivos para a inibição de diferentes espécies de *Fusarium* quanto à capacidade de produzir agentes microbianos.

Bactérias	Controle direto	Livre de células	Termoestável
Selvagem	+	+	+
M3	-	-	-
M9	-	+	-
M15	-	-	-
M17	-	-	-
M20	+	-	+
M21	-	-	-
M25	-	-	-
M28	-	-	-

(+): inibição visível (-): não inibição

6.4. Avaliação da atividade antagônica produzida pelos mutantes defectivos contra *Fusarium* spp.

Em relação a especificidade do mecanismos de inibição da fusariose, foi observado a especificidade dos mutantes de acordo com o *Fusarium* spp. avaliado. O mutante M15 inibiu o fitopatógeno R2 238 mas não apresentou inibição visível contra os outros *Fusarium* spp. avaliados. O mutante M20 apresentou inibição no crescimento micelial para os fitopatógenos FV-01-CTC e T4Ø e defectivos para os demais. Já o mutante M25 apresentou inibição para o fitopatógeno T4Ø sendo defectivo para os demais fitopatógenos avaliados segundo resultado obtido.

Tabela 3: Caracterização dos mutantes defectivos para a inibição de diferentes espécies de *Fusarium* quanto à capacidade de produzir agentes microbianos.

BACTÉRIAS	FV-01-CTC	R2	R5	T4Ø
Selvagem	+	+	+	+
M3	-	-	-	-
M9	-	-	-	-
M15	-	+	-	-
M17	-	-	-	-
M20	+	-	-	+
M21	-	-	-	-
M25	-	-	-	+
M28	-	-	-	-

(+): inibição visível (-): não inibição

6.5 Caracterização molecular dos mutantes selecionados

6.5.1 Confirmação da inserção do transposon Tn5 por análise de PCR

Por meio da PCR para a detecção do segmento do Tn5 utilizando os *primers* Tn5F e Tn5R foi demonstrado que todos os mutantes selecionados apresentavam o fragmento esperado de 399 pb. Foi utilizado o DNA da linhagem selvagem TC3.4.2R3 como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o DNA do plasmídeo Tn5 confirmando a especificidade dos *primers* utilizados (Figura 7).

Figura 7: Amplificação da região do transposon com os *primers* Tn5F e Tn5R (WANG et al., 2008) a partir do DNA extraído dos 8 transformantes da linhagem *B. subtilis* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antifúngica. O transposon Tn5 extraído de *E. coli* DH5 α -pir:Tn5 foi utilizado como controle positivo. Não houve amplificação no DNA genômico da linhagem selvagem. O marcador de pares de base 100pb e o marcador de peso molecular 1Kb estão posicionados na lateral a esquerda do gel de agarose. A ordem das amostras da esquerda para a direita é: M3, M9, M15, M17, M20, M21, M25, M28 (mutantes), selvagem, Tn5 e controle da reação de PCR.

6.5.2 Clonagem, sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon Tn5

Com o objetivo de identificar os genes nocauteados pelo transposon nos mutantes da linhagem TC3.4.2R3 que apresentaram perda da inibição de FV-01-CTC, as regiões flanqueadas contendo o transposon Tn5 foram clonadas em *E. coli* DH5 α -pir e o DNA plasmidial extraído e

enviado para sequenciamento (Figura 8). Foram enviadas para o sequenciamento 16 amostras dos 8 mutantes selecionados (duas de cada) utilizados nos testes anteriores. Fragmentos da jusante e a montante com a utilização dos *primers* KAN-2 FP-1 e R6KAN-2 RP-1. Entretanto, dentre as 16 amostras enviadas conseguimos um sequenciamento de qualidade de 10 amostras.

Figura 8: DNA plasmidial contendo o transposon Tn5 extraído de células de *E. coli* DH5-pir e enviadas para sequenciamento a jusante e a montante utilizando os *primers* KANFP-1 e KANRP-2 que anelam nas extremidades do transposn.

O resultado da análise dos mutantes TC3.4.2R3 defectivos no controle de *Fusarium* spp. permitiu a identificação de genes associados ao ciclo de nitrogênio, transportador celular dentre outras possíveis. As sequências flaqueadoras sequenciadas de cada mutante apresentaram a mesma identidade quando blastadas. Os mutantes M15 e M28 mostraram nocaute do gene codificador da glutamato sintase. Os mutantes M9 e M21 apresentaram mutação no gene codificador da FAD. Também houve o nocaute do gene codificador da proteína TolB (mutante M17). Os demais mutantes cujos genes nocauteados não foram sequenciados, serão avaliados *a posteriori* (Tabela 4).

Tabela 4: Análise das regiões flanqueadoras do transposon de mutantes de *B. seminalis* TC3.4.2R3, que apresentaram defectividade no controle do crescimento do *F. verticillioides* FV-01-CTC.

Mutante	(Blast X)
	Identificação, similaridade, E value e nº de acesso
M15	glutamate synthase (95%, 1e-26, ABF77603.1)
M21	FAD-linked oxidase (99%, 5e-52, KOR18682.1)
M28	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1 (99%, 1e-62, POM19843.1)
M9	FAD-linked oxidase (96%, 1e-45, KOR18682.1)
M17	TolB (100%, 5e-43, WP_034187207.1)

Todas as seqüências de DNA dos mutantes identificados apresentaram alta similaridade e todas as amostras compatíveis com espécies do gênero *Burkholderia*.

6.6 Análises *in silico* dos mutantes M15, M17 e M28 da linhagem TC3.4.2R3

As seqüências dos genes glutamato sintase, FAD e TolB provenientes da linhagem TC3.4.2R3 foram analisados *in silico* quanto a presença de domínios putativos.

O sequenciamento das regiões flanqueadoras do transposon Tn5 no mutante M15 mostrou a inserção na região intergênica ao gene codificador da glutamato sintase. O domínio funcional conservados desse gene nocauteado encontra-se aproximadamente de 200-280 pb, sendo obtida a mesma predição independente do banco de dados acessado (Tabela 5).

Tabela 5: Descrição da identidade do gene mutato corresponde a glutamato sintase em diferentes bancos de dados

Nome	Acesso	Descrição	Intervalo	E-value
GltS_FMN	Cd02808	Glutamate synthase (GltS) FMN-binding domain. GltS is a complex iron-sulfur flavoprotein	200-280	1.54e-06
Glu_synthase	pfam01645	Conserved region in glutamate synthase; This family represents a region of the glutamate	209-280	2.85e-06
GltB2	COG0069	Glutamate synthase domain 2 [Amino acid transport and metabolism];	200-280	2.93e-06
gltB	PRK11750	glutamate synthase subunit alpha; Provisional	191-280	2.78e-05
GOGAT_sm_gam	TIGR01317	glutamate synthases, NADH/NADPH, small subunit; This model represents one of three built for	116-199	7.24e-0

No mutante M17 foi nocauteado o gene codificador da proteína TolB. O domínio conservado desse gene encontra-se 3-224 pb. Foi encontrada a superfamília DPPIV_N (peptidases de serina). A família TolB_N é uma proteína putativa sendo um componente periplasmático essencial para o sistema de translocação dependente (*Tol-Pal system*) (Tabela 6).

Tabela 6: Descrição da identidade do gene mutato correspondente a proteína TolB em diferentes bancos de dados

Nome	Acesso	Descrição	Intervalo	E-value
TolB	PRK02889	Proteína de translocação TolB	3-224	9.60e-33
TolB_N	pfam04052	TolB é um essencial componente periplasmática	3-224	6.39e-17
propeller_TolB	TIGR02800	Sistema Tol-Pal proteína de reparo TolB	3-221	4.04e-12
TolB	COG0823	Componente periplasmático do sistema Tol de transporte de biopolímeros	15-218	1.55e-09

6.7 Análise *in silico* de metabólitos secundários produzidos por *Burkholderia seminalis* linhagem TC3.4.2R3

Com a utilização do programa *antiSMASH* verificamos 18 *clusters* gênicos potencialmente envolvidos na biosíntese de metabólitos secundários identificados no genoma da linhagem

TC3.4.2R3 (Tabela 7). Foram identificados *clusters* relacionado com a síntese de ectoína que apresenta importantes funções como proteção de raios ultravioleta e estresse hídrico. Foi identificado *clusters* relacionados a síntese de bacteriocinas e fosfanato. Também foram identificados *clusters* gênicos responsáveis pela biossíntese dos seguintes metabólitos secundários: terpeno, T1 pks, Arylpolyene, Hserlactone e NRPs. Nenhum desses foram observados como nocauteados nos mutantes que selecionamos neste trabalho.

Tabela 7: *Clusters* gênicos de metabólitos secundários de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 obtidos por meio do do banco de dados antiSMASH (*Antibiotics Secondary Metabolic Analysis Shell*)

Cluster	Produto	Contig (N. de acesso no NCBI)	Localização do <i>cluster</i> gênico
Cluster 1	Ectoine	<i>Contig 2</i> (LAEU01000002)	125937 – 136335
Cluster 2	Terpene	<i>Contig 3</i> (LAEU01000003)	201908 – 223947
Cluster 3	Bacteriocin	<i>Contig 4</i> (LAEU01000004)	244016 - 257057
Cluster 4	Nrps	<i>Contig 5</i> (LAEU01000005)	59406 - 114051
Cluster 5	Phosphonate	<i>Contig 6</i> (LAEU01000006)	3778 - 45463
Cluster 6	Terpene	<i>Contig 6</i> (LAEU01000006)	179395 - 200459
Cluster 7	Nrps	<i>Contig 8</i> (LAEU01000008)	10228 - 63008
Cluster 8	Terpene	<i>Contig 10</i> (LAEU01000010)	19167 - 43268
Cluster 9	Otherks	<i>Contig 11</i> (LAEU01000011)	1 - 32617
Cluster 10	Terpene	<i>Contig 11</i> (LAEU01000011)	64038 - 85120
Cluster 11	Bacteriocin	<i>Contig 11</i> (LAEU01000011)	157010 -167825
Cluster 12	Terpene	<i>Contig 20</i> (LAEU01000020)	1 - 16821
Cluster 13	Terpene	<i>Contig 21</i> (LAEU01000021)	38902 - 59936
Cluster 14	Hserlactone	<i>Contig 21</i> (LAEU01000021)	67684 - 88292
Cluster 15	T1pks	<i>Contig 25</i> (LAEU01000025)	15920 - 63548
Cluster 16	Other	<i>Contig 27</i> (LAEU01000027)	1 - 29126
Cluster 17	Terpene	<i>Contig 33</i> (LAEU01000033)	56300 - 77370
Cluster 18	Arylpolyene	<i>Contig 34</i> (LAEU01000034)	33932 - 75182

6.8 Caracterização dos mutantes para glutamato sintase e TolB avaliados na inibição do crescimento do patógeno *F. verticillioides* FV-01-CTC

Os mutantes selecionados caracterizados para a perda da atividade da glutamato sintase (M15, MR3), e a linhagem restituída com o gene original da glutamato (2gg) e a proteína TolB (M17) foram avaliados quanto ao antagonismo de *F. verticillioides* FV-01-CTC. Foi observado que a

linhagem restituída 2gg apresenta níveis de controle do crescimento do fungo maior do que a dos outros mutantes entretanto inferior à linhagem selvagem TC3.4.2R3 (Figura 9).

Figura 9: Avaliação do teste de antagonismo por pareamento *in vitro* da linhagem selvagem e dos mutantes M15 e M17 obtidos por meio da inserção do transposon Tn5, e pelos mutantes obtidos por troca alélica cepa com silenciamento do gene do glutamato (MR3) e a cepa com o gene silenciado mais sua complementariedade (2gg) contra o fungo *F. verticillioides* FV-01-CTC. A taxa de inibição foi mensurada após 7 dias de inoculação e a média do crescimento da colônia foi avaliada com 4 repetições (placas). Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

6.8.1 Comparação da curva de crescimento entre a linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes em tempo determinado

Com a exceção da linhagem selvagem TC3.4.2R3, os demais mutantes cresceram em meio de cultura contendo seus respectivos antibióticos para seleção. Mesmo com a presença de antibiótico não houve uma diferença significativa do crescimento das linhagens mutadas em relação a linhagem selvagem TC3.4.2R3 (Figura 10).

Figura 10: Curvas de crescimento da linhagem TC3.4.2R3 selvagem e seus mutantes em meio cultura LB. Sendo suplementado da seguinte forma: M15 e M17 suplementado com canamicina 200 $\mu\text{g/mL}$; MR3 foi suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol; e o mutante 2gg suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol mais 200 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina. Os dados mostrados são representativos de 3 repetições por tratamento sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a uma $\text{OD}_{600\text{nm}}$ em diferentes tempos.

6.9 Análise de *Southern Blot*

Para a análise de *Southern Blot* utilizamos os mutantes M15 e M17 para verificar o número de cópias que foram inseridas no genoma. A determinação do número de cópias do transposon foi avaliada utilizando um fragmento de 399pb do transposon como sonda para os dois mutantes selecionados. Após a análise, o mutante M15 apresentou somente uma banda de hibridização indicando que a inserção do transposon foi única. E o mutante M17 também apresentou uma única banda. Nenhum sinal de hibridização foi observado para a linhagem selvagem TC3.4.2R3. A diferença nos tamanhos das bandas de hibridização indica que a inserção do transposon ocorreu em regiões próximas porém distintas do genoma da linhagem TC3.4.2R3.

7. DISCUSSÃO

Em virtude dos prejuízos causados pelo fungo do gênero *Fusarium* e ao crescente interesse pela utilização de métodos de controle não tão agressivos ao meio ambiente e tão honeroso, agricultores e pesquisadores passaram a considerar o uso do controle biológico para o controle de doenças. Uma vez que, com a utilização de microrganismos antagonísticos, é possível proporcionar diferentes níveis de controle em diversas doenças (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

As bactérias associadas às plantas podem ser agrupadas em bactérias que incluem bactérias rizosféricas (nas proximidades da raiz) e rizoplânicas (na superfície da raiz) e bactérias endofíticas. O termo "bactérias endofíticas" é referido àquelas bactérias que colonizam o interior das partes da planta, raiz, caule ou sementes sem causar nenhum efeito prejudicial na planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997; LACAVA et al., 2004; CHRISTINA et al., 2013).

Estudos apontam que as bactérias endofíticas e rizobactérias apresentam grande importância no cenário biotecnológico como peças-chaves na promoção de crescimento e controle de doenças e pragas (BERG & HALLMANN, 2006; DUDEJA, 2016). Estudos voltados para análise molecular destes microrganismos vêm crescendo nos últimos tempos visando uma melhor compreensão da associação benéfica que existe entre microrganismo e planta (DUDEJA, 2016).

Espécies do gênero *Burkholderia* apresentam alta versatilidade ecológica e diferentes perfis de interação no ambiente (MENDES et al., 2007). Essas interações podem causar doenças em plantas e animais, mas também podem ser benéficas para algumas plantas, promovendo seu crescimento e suprimindo ataques de doenças de fitopatógenos devido à produção de biomoléculas com atividade antimicrobiana (LUVIZOTTO et al., 2010). Embora alguns membros do gênero sejam patógenos ou associados há alguma doença em seus hospedeiros, a grande maioria das espécies associadas às plantas não são patogênicas e podem apresentar uma interação neutra ou benéfica com seus hospedeiros (ARAUJO et al., 2016).

Burkholderia spp. tem sido estudadas quanto à capacidade na produção de sideróforos, ácido indol acético, solubilização de fosfato, produção de metabólitos antifúngicos e antibacteriano: pirrolnitrina, fenazina, cepacina, cepaciamida, cepacidina (QUAN et al. 2006; MOREIRA et al., 2016), sendo responsáveis pelo controle de patógenos de inúmeras culturas (BACH et al., 2016; SANDANAKIROUCHENANE et al., 2017).

O efeito do biocontrole pode estar ligado à ação antagonística de microrganismos por síntese de antibióticos com efeito fungicida como por exemplo enzimas que degradam a parede celular. Nesta busca, pesquisas vêm demonstrando que a utilização de microrganismos de

rizosfera pode atuar como um antagonista natural em uma gama de agentes patogênicos de plantas (AL-MUGHRABI, 2010; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Levando em consideração o histórico bibliográfico do gênero *Burkholderia* em produzir agentes antimicrobianos, a linhagem TC3.4.2R3 da rizosfera de cana-de-açúcar foi selecionada para estudos mais aprofundados sobre as possíveis funções gênicas envolvidas no processo do controle da fusariose mais especificamente em *F. verticillioides* FV-01-CTC.

Na avaliação do teste de antagonismo por pareamento a bactéria selvagem apresentou inibição clara contra as espécies de *Fusarium* testadas (*F. oxysporum* R5, *F. oxysporum* R2 238 *F. verticillioides* FV-01-CTC, *F. verticillioides* T4Ø). Resultados similares de controle biológico inicialmente *in vitro* de diferentes patógenos, tem sido publicados com outras espécies do gênero *Burkholderia*, mostrando a eficácia no controle biológico de severas doenças causadas por fungos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia solani* que causam respectivamente doenças como podridão da maçã, murcha de fusário em tomate, podridão da raiz em ervilha, dentre outras (CARTWRIGHT & BENSON, 1995; KANG et al. 1998; SIJAN & DIKIN, 2005).

Parke & Rand (1991) relataram que sideróforos sintetizados pelo gênero *Burkholderia* constituem uma opção viável para biocontrole, pois a planta pode suprimir o crescimento de patógenos pela retirada do ferro daquele ambiente, visto que é um fator limitante para o crescimento de muitos agentes patogênicos na rizosfera. No trabalho realizado por Luvizzotto et al. (2010) com a linhagem TC3.4.2R3 foi observado a capacidade da produção de sideróforo por este microrganismo e o teste para a avaliação de antagonismo mostrou um controle sobre *F. verticillioides* e *Xanthomonas albilineans* os quais são patógenos de importância para a cultura de cana de açúcar. Mendes et al. (2007) verificaram a capacidade de produção de pirrolnitrina por TC3.4.2R3, que é um metabólito antifúngico com atividade antagonista contra uma grande variedade de fungos patogênicos de plantas e até patogênicos humanos. Soria et al., (2012) realizaram testes por pareamento com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Burkholderia* sp. onde foi observado atividades antagonísticas para o fitopatógeno *F. circinatum*, sendo comprovada pela formação de halo de inibição entre bactérias e fungo. Estes dados corroboram com nosso estudo mostrando o grande potencial de controle biológico pode ser encontrado no gênero *Burkholderia* em especial linhagem TC3.4.2R3.

Poucos são os estudos que visam identificar e caracterizar os genes responsáveis por tal controle. Visto tamanho potencial, é de suma importância estudar os mutantes defectivos no controle da doença devido à possibilidade de conhecer a função gênica e o produto responsável pelo controle biológico. Neste intuito, utilizamos então a biblioteca de mutantes da linhagem TC3.4.2R3 (ARAUJO et al., 2016) e dentre os 1788 analisamos 682 mutantes.

Zhou et al., (2018) identificaram e caracterizaram um gene glutamato sintase MoGLT1 em *Magnaporthe oryzae* fungo que ataca arroz. O gene MoGLT1 foi constitutivamente expresso, mas apresentou o maior nível de expressão em apressórios. A supressão do MoGLT1 resultou em uma redução significativa na conidiação e virulência. Os mutantes DMoglt1 eram defeituosos na penetração do apressório, na diferenciação e disseminação de hifas em células vegetais. Com a restituição do gene no mutante defeituoso a virulência do fungo era restituída, mostrando assim que gene MoGlt1 é importante para patogênese e desenvolvimento no fungo na cultura do arroz.

Gallagher et al., (2013) construíram uma biblioteca de mutantes com quase 42.000 mutantes únicos utilizando a bactéria *Burkholderia thailandensis*, um substituto de baixa virulência para o agente causador da melioidose (*Burkholderia pseudomallei*). A biblioteca foi gerada usando transposon Tn5 e criaram uma biblioteca secundária com dois genes por mutante, para a qual a maioria dos locais de transposon foi confirmada por resequenciamento. O intuito da criação destas bibliotecas foi facilitar a triagem de mutantes abrangentes para servir de cepas testes para estudos posteriores com as associações genótipo-fenótipo.

Dentre os mutantes avaliados da linhagem TC3.4.2R3, foram encontrados 8 mutantes defectivos na inibição contra o *F. verticillioides* FV-01-CTC. Esses foram melhor investigados. A avaliação semi-quantitativa por pareamento demonstrou que houve reversão do fenótipo no mutante M20. Este resultado mostra a importância da repetição do experimento e a comprovação por meio da análise estatística para a validação de resultados qualitativos.

O ensaio de termoestabilidade demonstrou que mesmo após a autoclavagem a linhagem selvagem e o mutante M20 continuaram inibindo o patógeno FV-01-CTC. De los Santos-Villalobos et al. (2012) estudaram a atividade antagônica das bactérias *Burkholderia cepacia* XXVI e *Bacillus* sp contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando o teste de metabólitos termoestável em diferentes temperaturas. Os autores demonstraram que os metabólitos de *B. cepacia* XXVI quando submetidos a temperaturas superior a 70°C sofria uma possível degradação térmica diminuindo os efeitos de inibição. Porém o mesmo resultado não foi visto para com *Bacillus* sp., onde os autores sugerem que o metabólito produzido por este isolado seja o responsável pela inibição do patógeno o qual seria resistente a degradações térmicas à altas temperaturas. Provavelmente a linhagem TC3.4.2R3 produz compostos termoestáveis relacionados ao controle de *F. verticillioides* FV-01-CTC.

Foi observado que a linhagem selvagem e o mutante M9 continuam inibindo o fitopatógeno no teste livre de células. Kim et al., (2017) utilizando a técnica de metabólitos livre de células, avaliaram 4 linhagens de *Paenibacillus polymyxa* quanto ao controle de *Cylindrocarpum destructans* (fungo causador de doença em videira), onde somente uma linhagem promoveu

inibição significativa do fitopatógeno. Ji et al. (2010), estudaram o efeito antagonista de metabólito livre de células de espécies de *Bacillus* sp. contra *F. incarnatum*. Os autores utilizaram duas metodologias: uma com a utilização de discos de papel e outro com diferentes dosagens da suspensão bacteriana, a fim de verificar a inibição da germinação do conídio do fungo. A inibição foi vista claramente por uma zona clara ao redor dos discos com o metabólito e com a suspensão de células. Foi observado que a zona de inibição foi maior no tratamento com suspensão bacteriana e que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos com a suspensão.

Da Silva Araújo et al., (2017) investigaram por espectrometria de massas de ionização (MALDI-MSI) a composição de metabólitos secundários de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e a inibição *Fusarium oxysporum*. O sideróforo pioquelina e o ramnolípídeo Rha-Rha-C15-C14 foram detectados na linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e também em seus mutantes porém estes com variações e apresentando rupturas em conjuntos de genes associados com o composto antimicrobiano. Duas micotoxinas foram produzidas por *F. oxysporum* durante a co-cultura com *B. seminalis*, sendo estas relacionadas com os metabólitos do mecanismo de defesa do fungo. Este resultado vem corroborar com os resultados obtidos no presente projeto, que demonstraram que a difusão de compostos produzidos por TC3.4.2R3 são capazes de inibir *Fusarium* spp.

A utilização diferentes técnicas nos ensaios de antagonismo se justifica, uma vez que, tanto a técnica utilizada, como a escolha do microrganismo antagônico podem modular o resultado da interação. Aparentemente, a cultura de filtrados livre de células da bactéria, inibiu melhor o crescimento do *F. verticillioides* FV-01-CTC em relação aos metabólitos bacterianos submetidos a autoclavagem mas não superou os resultados obtidos no teste de pareamento, demonstrando que mais de um composto deve estar envolvido no potencial de controle biológico da TC3.4.2R3.

O comprovado potencial da linhagem selvagem TC3.4.2R3 em produzir diversos agentes antimicrobianos foi comprovado por meio dos diferentes genes nocauteados em TC3.4.2R3 envolvidos do processo de antagonismo ao *F. verticillioides* FV-01-CTC. Ficou evidente que os genes codificadores glutamato sintase, TolB e FAD são diretamente ou indiretamente relacionados ao controle de FV-01-CTC. Esses compostos também estão relacionados ao controle de outros *Fusarium* spp.

As vias de síntese de glutamato compartilham muitas propriedades funcionais. No entanto, três classes de glutamato-sintases são definidas com base em suas seqüências de aminoácidos e a natureza do doador de elétrons (VANONI & CURTI, 1999), primeira: o GltS dependente de NADPH bacteriano consiste em duas subunidades (subunidade α de

aproximadamente 150 kDa e subunidade β de aproximadamente 50 kDa). Estes formam a holoenzima $\alpha\beta$ cataliticamente ativa, que contém um FAD, um FMN e três agregados de ferro-enxofre. Segunda: o GltS dependente de Ferredoxina é encontrado nas células fotossintéticas. Este tipo de GltS contém um cluster FMN e um 3Fe-4S e compartilha homologia considerável em toda a sua sequência com a subunidade α do GltS bacteriano. Terceira: Levedura, fungos e animais inferiores contêm uma cadeia única de GltS dependente de H de NAD (P) H de cerca de 200 kDa. É formado pela fusão de dois fragmentos, que são semelhantes às subunidades α e β do GltS bacteriano, respectivamente. O GltS dependente de NADPH da bactéria fixadora de nitrogênio *Azospirillum brasilense* está entre as sintases de glutamato melhor caracterizadas (SAIKIA et al., 2012). Mutantes auxotróficos de glutamina de *A. brasilense*, defeituosos na síntese de glutamato, liberam amônio sob condições de fixação de N_2 ; estes mutantes não têm atividade de absorção de amônio (HARTMANN et al., 1984). Em mutantes prototróficos de *A. brasilense* resistente à metionina sulfoximina (MSX), ocorre a fixação constitutiva de N_2 , mas nenhuma molécula de amônio é liberada (HARTMANN, 1982). Com esta informação, especulou-se que mecanismos para a liberação de compostos de nitrogênio está presente nas bactérias associadas a de fixação de N_2 , mas esta propriedade está sob o controle fisiológico dos fatores determinados pela planta (HARTMANN, 1988; LANA et al., 2012). Apesar de bem descrito o papel da glutamato sintase no via do nitrogênio, ainda são incipientes estudos relacionados ao seu papel no controle de fitopatógenos.

Nandineni et. al., 2004 relataram que em bactérias o glutamato não é somente precursor de outros aminoácidos, mas também está envolvido na osmorregulação e em alguns casos como precursor da biossíntese de ferro, como substrato de proteínas carreadoras e fonte de grupos amino para a produção de antibióticos e antitumorais. Sob condições limitantes de ferro, alguns dos biocontroladores secretam sideróforo, que quela ferro disponível de solo e, por vezes, de microrganismos coabitantes, privando os fungos patogênicos deste elemento (COMPANT et al., 2005). Talvez a menor produção de sideróforos por TC3.4.2R3 devido ao nocaute do glutamato sintase esteja relacionado ao controle de *Fusarium* spp., entretanto mais estudos devem ser realizados.

Outro papel do glutamato síntese produzido por TC3.4.2R3 que deve ser explorado é na promoção de crescimento de plantas. A homeostase do glutamato desempenha um papel vital no metabolismo central do nitrogênio e coordena várias funções metabólicas chaves. Trabalhos anteriores realizados com esta linhagem TC3.4.2R3 por Luvizotto et al., (2010) comprovaram a capacidade de fixação de nitrogênio com ensaio *in vitro* em com a utilização de *primers* específicos para fixação de nitrogênio. Neste âmbito podemos concluir que a linhagem TC3.4.2R3 tem o

gene que é expresso para a fixação de nitrogênio. Estudos relatam a síntese da glutamina, glutamato e amônia, é de grande importância para a manutenção dos níveis estacionários intracelulares os quais inibem a formação de apressórios nos fungos (MARROQUIN-GUZMAN & WILSON, 2015).

Recentemente Zhou et al., (2018) realizaram estudo no controle do fungo *Magnaporthe oryzae* patógeno de arroz, onde caracterizaram um gene relacionado a síntese de glutamato (MoGLT1). Eles utilizaram uma estirpe selvegem do fungo, e um mutante defectivo e outro constitutivo com o gene MoGLT1. E verificaram que as estirpes com o gene ativo apresentaram maior nível de expressão em apressórios e a supressão deste gene resultou em uma redução significativa na condição de virulência, na penetração e formação de apressório. A falta do glutamato em TC3.4.2R3 pode indiretamente estar inibindo o controle de *Fusarium* spp.

O mutante M17 apresentou nocaute no gene codificador da proteína TolB que faz parte do sistema Tol-Pal, omplexo multiproteico encontrado no envelope celular de muitas bactérias gram-negativas (CASCALES et al., 2007). Até o momento, o papel celular da proteína TolB não é claro. No entanto, existem propostas para as diferentes funções que podem ser realizadas e utilizadas para benefício celular. Os componentes do sistema Tol-Pal podem estar envolvidos na manutenção da membrana externa, uma vez que mutações nas proteínas TolB resultam em extravazamento o conteúdo do periplasma, assim como uma hipersensibilidade a alguns detergentes, antibióticos e outros agentes (LLOUBÈS et al., 2001). Podem também, desempenhar um papel na ancoragem da membrana externa à camada de peptidoglicano através das interações que ocorrem entre TolB, Pal, Lpp e OmpA (BOUVERET et al., 1995). Zhang et al., (2010) estudando o sistema Tol-Pal em *E. coli* comprovaram que a interação da proteína TolB no periplasma das células promovem o transporte do domínio citotóxico de colicina através do envelope celular. Evidenciando o papel exercido da proteína TolB na região membranar sendo responsável pela liberação de entrada e saída de diferentes moléculas.

As bacteriocinas ou colicinas são potentes antibióticos proteicos, com especificidade ditada por suas interações proteína-proteína dentro do envelope celular de bactérias gram negativas (PAIK et al., 2018). A translocação de bacteriocinas alvo para liberação celular é facilitada através da interação com componentes do sistema Tol-Pal entre eles a proteína TolB. A interação com o sistema é mediado por ligação no terminal N da bacteriocina usando porinas não específicas para passar pelo periplasma, onde são selecionados seus alvos (RASSAM et al., 2018).

Correlacionando estas informações, a bactéria *B. seminalis* TC3.4.2R3 produz bacteriocinas e outros compostos capazes de inibir o crescimento do *Fusarium* spp. que devem ser secretados

pelo sistema Tol-Pal. A falta da proteína TolB no mutante M17 pode impedir a secreção desses compostos, tornando-o assim defectivo no controle de *Fusarium* spp.

Genes que codificam vias biossintéticas responsáveis pela produção de metabólitos secundários normalmente ficam próximos em uma certa posição no cromossomo e são referidos seu conjunto como “*cluster* gênico” (MEDEMA et al., 2015). Por meio do programa *antiSMASH* foi observando que no genoma parcial de *B. seminalis* TC3.4.2R3 apresenta 18 *cluster* gênico para a biossíntese de metabólitos secundários, a maioria deles envolvida na produção de terpeno (7 *clusters*). Entre os genes nocauteados não foi encontrado nenhum codificador para metabólitos secundários, entretanto o conhecimento da presença dos mesmo é importante para entender o papel indireto do TolB como possível componente secretor desses.

Os papéis biológicos e ecológicos para terpenos ainda são conhecidos (GERSHENZON & DUDAREVA, 2007). A produção de NRPs gerou 2 *cluster* os quais são preditos produtos naturais muito diversificados, com uma gama extremamente ampla de atividades biológicas e propriedades farmacológicas. São muitas vezes toxinas, sideróforos e pigmentos (XU et al., 2012). Na produção de ectoína (1 *cluster*) um composto natural encontrado em várias espécies de bactérias. É um soluto que serve como uma substância protetora, agindo como um osmólito auxiliando os organismos a sobreviverem a um estresse osmótico extremo. Ectoína é encontrada em altas concentrações em microrganismos halofílicos e em uma ampla gama de bactérias gram-negativas e gram-positivas conferindo resistência ao estresse salino e à temperatura (PETERS et al., 1990; BEBLO-VRANESEVIC et al., 2017). Sendo de grande interesse para a indústria farmacêutica por ser um ingrediente ativo em produtos de cuidados com a pele e proteção solar (STÖVEKEN et al., 2011).

Dois *clusters* foram identificados na produção de bacteriocinas que se trata de uma proteína tóxica sintetizada por bactérias no intuito de inibir o crescimento de microrganismos sendo muito diverso estruturalmente, fisiologicamente e ecologicamente.

Um *cluster* identificado como hserlactone conhecido também como uma halmoserina lactona que está relacionado como um sinal químico de defesa, *quorum sensi* bacteriano permitindo que as células bacterianas regulem a expressão gênica dependendo da densidade populacional (HENSE et al., 2007.). Estes metabólitos são detectados em sua maior parte em *quorum* bacteriano gram-negativo (BAUER et al., 2004). Trabalho realizado por Wei et al., (2007) fizeram a deleção do gene *pcrI*, (responsável pela produção de halmoserina lactona em *Pseudomonas fluorescens* 2P24), a qual deixou o mutante defectivo na formação de biofilme, não colonizando a rizosfera de trigo comprometendo a capacidade de biocontrole contra patógenos. Já com a cepa restituída

com gene *pcol* a atividade de biocontrole se aproximou do nível da cepa tipo selvagem. Resultado semelhante ao obtido em nosso trabalho para o gene do glutamato.

Para o *cluster* arilpolieno foi encontrado somente 1 representante. Este metabólito é descritos como pigmentos bacterianos e sua estrutura é semelhante aos carotenóides encontrados em plantas (SCHÖNER et al., 2016). No trabalho de Schöner et al., (2016) foi relatado pela primeira vez que esta classe de pigmentos protege a bactéria de espécies reativas de oxigênio, similarmente ao que é conhecido pelos carotenóides.

Outro *cluster* identificado foi para fosfanato, que são ácidos fosfônicos compostos organofosforados. Ácidos fosfônicos, tipicamente manuseados como sais, são geralmente sólidos não voláteis e pouco solúveis em solventes orgânicos, mas solúveis em água e álcoois comuns. Muitos compostos comercialmente importantes são fosfonatos, incluindo o glifosato (STRUGER et al., 2015), o herbicida "Roundup" (CHEKAN et al., 2016), e o ethephon, um regulador de crescimento de plantas amplamente utilizado (ZARAD et al., 2016). Em biologia e química medicinal, grupos fosfonato são usados como bioisómeros estáveis para fosfato, como no análogo de nucleotídeo antiviral, Tenofovir, um dos pilares da terapia anti- HIV (MACKMAN et al., 2010), hepatite B entre outros (MENÉNDEZ-ARIAS et al., 2014). Na natureza, as bactérias desempenham um papel importante na degradação dos fosfonatos devido à presença de fosfonatos naturais no meio ambiente, as bactérias desenvolveram a capacidade de metabolizar como fontes de nutrientes de fósforo voltado para o crescimento (HUANG et al., 2005). Os aminofosfonatos também podem ser usados como única fonte de nitrogênio por algumas bactérias (HUANG et al., 2005). Os polifosfonatos usados na indústria diferem muito dos fosfonatos naturais, como o ácido 2-aminoetilfosfônico, porque são muito maiores, carregam uma carga negativa alta e são complexados com metais. Testes de biodegradação com lodo de estações municipais de tratamento de esgoto com polifosfonatos não mostraram nenhuma indicação para qualquer degradação. No entanto, há cepas bacterianas capazes de degradar aminopolifosfonatos sob condições limitadas de fósforo (NOWACK, 2003).

Estes resultados mostram a gama de utilização dos metabólitos secundários que são gerados a partir da expressão gênica de *clusters* específicos da linhagem TC3.4.2R3 de *B. seminalis* e que devem ser melhor estudados por meio de nocaute sítio dirigido em etapas futuras.

Como observado no presente projeto, o uso da técnica de nocaute sítio dirigida foi de vital importância para validar o papel do glutamato no controle de *Fusarium* spp., visto que o mutante MR3 validou o dados obtidos com os mutante randômico M15.

Não foi conclusivo do papel direto dos genes nocauteados glutamato e proteína TolB no controle de *Fusarium* spp.. Esses genes como descrito previamente podem estar envolvidos em

diversos processos fisiológicos na bactéria *B. seminalis*. Assim, o presente projeto abre novas perspectivas de estudo, certamente os mecanismos de controle da fusariose por *B. seminalis* TC3.4.2R3 é amplo e sinérgico não apresentando grande especificidade de acordo com a espécie fungica. Há uma enorme perspectiva em desvendar o papel do glutamato e TolB no controle de fitopatógenos. Além disso pela análise *in silico* dos metabólitos secundários novos genes candidatos foram encontrados para futuros estudos com nocaute sítio dirigido. Finalmente os mutantes caracterizados, como exemplo o M15, pode ser fonte de novos estudos para o complexo entendimento da interação microrganismo-planta-patógeno.

Com estes resultados daremos continuidade ao trabalho com experimentos *in vivo*, para de verificar o papel do glutamato proveniente da linhagem TC3.4.2R3 na promoção de crescimento vegetal.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- 1) A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 apresentou potencial em produzir compostos com atividades antifúngica *in vitro*, sendo capaz de controlar o crescimento de FV-01-CTC;
- 2) A inibição de FV-01-CTC é realizada por meio de compostos termoestáveis e de componentes livres de células. Com tudo, o melhor resultado foi obtido com o antagonismo por meio do pareamento entre a colônia fúngica e a bacteriana.
- 3) O nocaute do gene glutamato sintase e TolB reduziram o potencial de controle *in vitro* do fitopatógeno FV-01-CTC pela linhagem TC3.4.2R3.
- 4) A linhagem TC3.4.2R3 possui pelo menos 18 *clusters* de metabólitos secundários que podem estar envolvidos na síntese de compostos antimicrobianos, promotores de crescimento em plantas, biocontroladores de doenças e pragas, dentre outros.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. *Plant pathology*, 4.
- Alexandratos, Nikos et al. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. Rome, FAO: ESA Working paper.
- Al-Mughrabi, K. I. (2010). Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control*, 53(3), 280-284.
- Andreote, F. D., Gumiere, T., & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia agrícola*, 71(6), 528-539.
- Araújo, W. L. et al. (2016). Genome sequencing and transposon mutagenesis of *Burkholderia seminalis* TC3. 4.2 R3 identify genes contributing to suppression of orchid necrosis caused by *B. gladioli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29 (6), 435-446.
- Ashraf, Q. H.; Weil, D. N.; Wilde, J. (2013). The effect of fertility reduction on economic growth. *Population and development review*, 39(1), 97-130.
- Azevedo, J. L., & Araújo, W. L. (2007). Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. *Fungi: multifaceted microbes*, 1, 189-207.
- Bach, E.; dos Santos Seger, G. D., de Carvalho Fernandes, G., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 99, 141-149.
- Bauer, W. D., & Mathesius, U. (2004). Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 429-433.
- Beblo-Vranesevic, K., Galinski, E. A., Rachel, R., Huber, H., & Rettberg, P. (2017). Influence of osmotic stress on desiccation and irradiation tolerance of (hyper)-thermophilic microorganisms. *Archives of microbiology*, 199(1), 17-28.
- Berg, G. & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. *Microbial root endophytes*, p. 53-69.
- Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., & Chiarini, L. (2000). Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, 31(3-4), 225-231.
- Bouveret, E., Derouiche, R., Rigal, A., Lloubes, R., Lazdunski, C., & Benedetti, H. (1995). Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11071-11077.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 27, 30-37.

- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews microbiology*, 3(3), 238.
- Burkhead, K. D., Schisler, D. A., & Slininger, P. J. (1994). Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Applied and environmental microbiology*, 60(6), 2031-2039.
- Carrer Filho, R., Dianese, É. D. C., & Cunha, M. G. D. (2015). Suppression of *Fusarium* wilt in tomato plants by rhizobacteria from the *Bacillus* genus. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45(3), 356-363.
- Carrer, H.; Barbosa, A. L.; Ramiro, D. A. (2010). Biotecnologia na agricultura. *Estudos avançados*, 24(70), 149-164.
- Cartwright, D. K., Chilton, W. S., & Benson, D. M. (1995). Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5 B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 211-216.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(1), 158-229.
- Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Chen, W., & Zhang, H. (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *International journal of food microbiology*, 125(3), 215-222.
- Chekan, J. R., Cogan, D. P., & Nair, S. K. (2016). Molecular basis for resistance against phosphonate antibiotics and herbicides. *MedChemComm*, 7(1), 28-36.
- Chelkowski, J. E. (1989). Formation of mycotoxins produced by *Fusarium* in heads of wheat, triticale and rye. In *Fusarium* (pp. 63-84).
- Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., & Visca, P. (2006). *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in microbiology*, 14(6), 277-286.
- Christina, A., Christopher, V., & Bhore, S. J. (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Pharmacognosy reviews*, 7(13), 11.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society.
- da Silva Araújo, F. D., Araújo, W. L., & Eberlin, M. N. (2017). Potential of *Burkholderia seminalis* TC3. 4.2 R3 as biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* evaluated by mass spectrometry imaging. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(5), 901-907.
- Davis, R. M., Colyer, P. D., Rothrock, C. S., & Kochman, J. K. (2006). *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. *Plant Disease*, 90(6), 692-703.

- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., & Peña-Cabriaes, J. J. (2012). *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2615-2623.
- de Souza, Rocheli et al. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and soil*, 366(1-2), 585-603.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). *Compendium of soil fungi. Volume 1*. Academic Press (London) Ltd.
- Dordević, M., Vatchev, T., Girek, Z., Šević, M., Zečević, B., Zdravković, J., & Ivanović, M. (2012). Reaction of different tomato cultivars toward race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Genetika*, 44(1), 109-118.
- Dudeja, Surjit Singh (2016). Beneficial Effects and Molecular Diversity of Endophytic Bacteria in Legume and Nonlegumes. In: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*. Springer, New Delhi, p. 245-256.
- Duffy, B., Keel, C., & Défago, G. (2004). Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1836-1842.
- El-banna, N., & Winkelmann, G. (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 69-78.
- Flores, P. S., Otoni, W. C., Dhingra, O. D., de Souza Diniz, S. P. S., Dos Santos, T. M., & Bruckner, C. H. (2012). In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108(1), 37-45.
- Fortunato, A. A., Rodrigues, F. Á., Baroni, J. C. P., Soares, G. C. B., Rodriguez, M. A. D., & Pereira, O. L. (2012). Silicon suppresses *Fusarium* wilt development in banana plants. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12), 674-679.
- Freitas, L. G., Neves, W. S., Fabry, C. S., & Marra, B. M. (2005). Isolamento e Seleção de Rizobactérias para Controle de Nematóides formadores de Galhas (Meloidogyne spp.) na Cultura do Tomateiro1. *Nematologia Brasileira*, 29(2), 215-220.
- Gallagher, L. A., Ramage, E., Patrapuvich, R., Weiss, E., Brittnacher, M., & Manoil, C. (2013). Sequence-defined transposon mutant library of *Burkholderia thailandensis*. *MBio*, 4(6), e00604-13.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., ... & O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 473-479.
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7), 408.
- Ghatak, K. L. (2011). *Techniques and Methods in biology*. PHI Learning Pvt. Ltd.

- Godlewska, R., Wiśniewska, K., Pietras, Z., & Jagusztyn-Krynica, E. K. (2009). Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS microbiology letters*, 298(1), 1-11.
- Goryshin, I. Y., and Reznikoff, W. S. (1998). Tn5 in vitro transposition. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7367-7374.
- Goswami, D., Handique, P. J., & Deka, S. (2014). Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*—the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. *Journal of basic microbiology*, 54(6), 548-557.
- Gupta, A. K., Baran, R., & Summerbell, R. C. (2000). *Fusarium* infections of the skin. *Current opinion in infectious diseases*, 13(2), 121-128.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.
- Hartmann, A. (1982). Antimetabolite effects on nitrogen metabolism of *Azospirillum* and properties of resistant mutants. *Experientia Suppl*, 42, 59-68.
- Hartmann, A. (1988). Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. *Plant and Soil*, 110(2), 225-238.
- Hartmann, A., Kleiner, D., & Klingmüller, W. (1984). Ammonium uptake and release by *Azospirillum*. In *Advances in nitrogen fixation research* (pp. 227-227). Springer, Dordrecht.
- Hense, B. A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., & Kreft, J. U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing?. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 230.
- Hilton, A., Zhang, H., Yu, W., & Shim, W. B. (2017). Identification and Characterization of Pathogenic and Endophytic Fungal Species Associated with Pokkah Boeng Disease of Sugarcane. *The plant pathology journal*, 33(3), 238.
- Ho, Y. N., Chiang, H. M., Chao, C. P., Su, C. C., Hsu, H. F., Guo, C. T., ... & Huang, C. C. (2015). In planta biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant and soil*, 387(1-2), 295-306.
- Holtmark, I., Eijsink, V. G., and Brurberg, M. B. (2007). Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS microbiology letters*, 280(1), 1-7.
- Huang, J., Su, Z., & Xu, Y. (2005). The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. *Journal of molecular evolution*, 61(5), 682-690.
- Hwang, J., Chilton, W. S., & Benson, D. M. (2002). Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of Rhizoctonia stem rot of poinsettia. *Biological control*, 25(1), 56-63.
- Instituto Leibniz DSMZ-German Coleção de Microorganismos e Culturas Celulares, Alemanha, Nomenclatura procariótica atualizada [setembro 2017], (<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>)

- Ji, Xianling et al.(2010). Colonization of *Morus alba* L. by the plant-growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC microbiology*, 10(1), 243.
- Jiao, Y., Yoshihara, T., Ishikuri, S., Uchino, H., & Ichihara, A. (1996). Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron letters*, 37(7), 1039-1042.
- Joffe, A. Z. (1986). *Fusarium species: their biology and toxicology*. John Wiley & Sons.
- Ju, K. S., Doroghazi, J. R., & Metcalf, W. W. (2014). Genomics-enabled discovery of phosphonate natural products and their biosynthetic pathways. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(2), 345-356.
- Jung, Boknam et al. (2018). Cooperative interactions between seed-borne bacterial and air-borne fungal pathogens on rice. *Nature communications*, 9(1), 31.
- Kang, Y., Carlson, R., Tharpe, W., & Schell, M. A. (1998). Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3939-3947.
- Kim, Y. C., Tarr, A. W., Penfold, C. N. (2014). Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1717-1731.
- Kim, Y. S., Balaraju, K., & Jeon, Y. H. (2017). Biological characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* AK-0 and suppression of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Journal of applied microbiology*, 122(1), 166-179.
- Kolter, R., & Moreno, F. (1992). Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 141-161.
- Lacava, P. T., Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., & Azevedo, J. L. (2004). Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in applied microbiology*, 39(1), 55-59.
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F., Lamers, G. E., Punt, P. J., Van den Hondel, C. A., Lugtenberg, B. J., & Bloembergen, G. V. (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(2), 172-179.
- Lana, M. D. C., Dartora, J., Marini, D., & Hann, J. E. (2012). Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres*, 59(3), 399-405.
- Lanubile, A., Ferrarini, A., Maschietto, V., Delledonne, M., Marocco, A., & Bellin, D. (2014). Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance. *BMC genomics*, 15(1), 710.

- Lasca, C. C., Vechiato, M. H., Fantin, G. M., & Kohara, E. Y. (2005). Efeito do tratamento químico de sementes de milho sobre a emergência e a produção. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 72(4), 461-468.
- Lea, P. J., & Mifflin, B. J. (2018). Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. *Annual plant reviews*, 1-40.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., & Journet, L. (2001). The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity?. *Research in microbiology*, 152(6), 523-529.
- Lopes, L. D., Pereira e Silva, M. D. C., & Andreote, F. D. (2016). Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. *Frontiers in microbiology*, 7, 1341.
- Lopes-da-Silva, Marcelo & Sugayama, Regina & Eduardo Rangel, Luis & Carlos Ribeiro, Luis. (2015). *Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas*.
- Lucy, M.; Reed, E.; Glick, B.R. (2014). *Applications of free living plant growth- promoting rhizobacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek, Wageningen,
- Luvizotto, D.M. et al. (2010). Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1829-1836.
- Macedo, R. et al. (2017). Potential worldwide distribution of *Fusarium* dry root rot in common beans based on the optimal environment for disease occurrence. *PloS one*, 12(11), e0187770.
- Mackman, R. L., Ray, A. S., Hui, H. C., Zhang, L., Birkus, G., Boojamra, C. G., ... & Laflamme, G. (2010). Discovery of GS-9131: Design, synthesis and optimization of amidate prodrugs of the novel nucleoside phosphonate HIV reverse transcriptase (RT) inhibitor GS-9148. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(10), 3606-3617.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Jovi, D. B. S. S., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K., & Sa, T. (2004). Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiological research*, 159(3), 233-243.
- Maia, P. P., Rath, S., & Reyes, F. G. R. (2009). Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal-Uma Revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 16(1), 49-64.
- Mander, L., & Liu, H. W. (2010). *Comprehensive natural products II: Chemistry and Biology* (Vol. 1). Elsevier.
- Mano, Emy Tiyo (2011). Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de *Pectobacterium carotovora*. 101f. dissertação de (mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2011.
- MAO, S., Lee, S. J., Hwangbo, H., Kim, Y. W., Park, K. H., Cha, G. S., ... & Kim, K. Y. (2006). Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. *Current microbiology*, 53(5), 358-364.

- Marcon, J. Efeito de cana de açúcar geneticamente modificada sobre comunidades bacterianas. 2007 96p. (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, 2007.
- Marroquin-Guzman, M., & Wilson, R. A. (2015). GATA-dependent glutaminolysis drives appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* by suppressing TOR inhibition of cAMP/PKA signaling. *PLoS pathogens*, 11(4), e1004851.
- Marshall, S. H., & Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 271-284.
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78-92.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., ... & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W339-W346.
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., ... & Cruz-Morales, P. (2015). Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nature chemical biology*, 11(9), 625.
- Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., Araujo, W. L., & Raaijmakers, J. M. (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7259-7267.
- Menéndez-Arias, L., Álvarez, M., & Pacheco, B. (2014). Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Current opinion in virology*, 8, 1-9.
- Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2001). On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiology Letters*, 196(2), 207-214.
- Moreira, F.S. et al. (2016). Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Genetics and molecular biology*, v. 39, n. 1, p. 111-121.
- Müller, C. A., Oberauner-Wappis, L., Peyman, A., Amos, G. C., Wellington, E. M., & Berg, G. (2015). Mining for nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase genes revealed a high level of diversity in the Sphagnum bog metagenome. *Applied and environmental microbiology*, 81(15), 5064-5072.
- Nacamulli, C., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., & Chiarini, L. (1997). Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(3), 183-193.

- Nandineni, M. R., Laishram, R. S., & Gowrishankar, J. (2004). Osmosensitivity associated with insertions in *argP* (*iciA*) or *glnE* in glutamate synthase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(19), 6391-6399.
- Neves, A. A. C. 2011. Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao antagonismo a microrganismo fitopatogênicos., 62f. dissertação de (mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2011.
- Nowack, B. (2003). Environmental chemistry of phosphonates. *Water research*, 37(11), 2533-2546.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015*, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en
- Paik, S. J., Damm, A., Manzi, J., Dahan, M., Bassereau, P., Margeat, E., & Levy, D. (2018). Functional and Structural Studies of Interplay between an ABC Transporter and its Surrounding Membrane Environment. *Biophysical Journal*, 114(3), 188a-189a.
- Parke, J. L., & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 225-258.
- Parke, J. L., Rand, R. E., Joy, A. E., & King, E. B. (1991). Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant disease*, 75(10), 987-992.
- Parker, W. L., Rathnum, M. L., Seiner, V., Trejo, W. H., Principe, P. A., & Sykes, R. B. (1984). Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *The Journal of antibiotics*, 37(5), 431-440.
- Penfold, C. N., Li, C., Zhang, Y., Vankemmelbeke, M., & James, R. (2012). Colicin A binds to a novel binding site of TolA in the *Escherichia coli* periplasm.
- Pereira, G. S. et al. (2017). Selection of maize inbred lines and gene expression for resistance to ear rot. *Genetics and Molecular Research*, 16(3).
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5-6), 325-336.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J. I., Estrada-De Los Santos, P., Reis, V. M., & Caballero-Mellado, J. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1931-1937.
- Peters, P., Galinski, E. A., & Trüper, H. G. (1990). The biosynthesis of ectoine. *FEMS microbiology letters*, 71(1-2), 157-162.
- Punja, Z. K., & Utkhede, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *TRENDS in Biotechnology*, 21(9), 400-407.

- Quan, C. S., Zheng, W., Liu, Q., Ohta, Y., & Fan, S. D. (2006). Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(6), 1276-1284.
- Quecine, M. C. (2010). *Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (Saccharum sp., L.)* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Quecine, M. C., Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Shaffer, B. T., Henkels, M. D., Zabriskie, T. M., & Loper, J. E. (2016). An Interspecies Signaling System Mediated by Fusaric Acid Has Parallel Effects on Antifungal Metabolite Production by *Pseudomonas protegens* Strain Pf-5 and Antibiosis of *Fusarium* spp. *Applied and environmental microbiology*, 82(5), 1372-1382.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 341-361.
- Rassam, P., Housden, N., & Kleanthous, C. (2018). Depicting the Translocation Process of the Protein Antibiotic Colicin E9 through OmpF. *Biophysical Journal*, 114(3), 188a.
- Richards, N. G., Humkey, R. N., Li, K., Meyer, M. E., & de Sintjago, T. C. C. (2010). Tunnels and Intermediates in the Glutamine-Dependent Amidotransferases.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5-6), 357-364.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., ... & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440.
- Rossetto, P. B. Interação entre cana de açúcar e bactérias associadas. 2008. 148 p. Tese (doutorado em Agronomia) Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2008.
- Rossetto, R.; & Santiago, A. D. (2007). Adubação: resíduos alternativos. *Brasília, DF: EMBRAPA*. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html. Acesso em: 11 de abril de 2018.
- Sahu, Binod B. et al. (2017). Investigation of the *Fusarium virguliforme* Transcriptomes Induced during Infection of Soybean Roots Suggests that Enzymes with Hydrolytic Activities Could Play a Major Role in Root Necrosis. *PLoS one*, 12(1), e0169963.
- Saikia, S. P., Bora, D., Goswami, A., Mudoi, K. D., & Gogoi, A. (2012). A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. *African Journal of Microbiology Research*, 6(6), 1085-1102.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001.
- Sandanakirouchenane, A., Haque, E., & Geetha, T. (2017). Recent Studies on N₂ Fixing *Burkholderia* isolates as a Biofertilizer for the Sustainable Agriculture. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(11), 2780-2796.

- Schöner, T. A., Gassel, S., Osawa, A., Tobias, N. J., Okuno, Y., Sakakibara, Y., ... & Bode, H. B. (2016). Aryl polyenes, a highly abundant class of bacterial natural products, are functionally related to antioxidative carotenoids. *ChemBioChem*, 17(3), 247-253.
- Schouten, A., van den Berg, G., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C., ... & Raaijmakers, J. M. (2004). Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2, 4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(11), 1201-1211.
- Seifert, H. S., Chen, E. Y., SO, M., & Heffron, F. (1986). Shuttle mutagenesis: a method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(3), 735-739.
- Shuping, D. S. S.; Eloff, J. N.(2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 14(4), 120.
- Sijam, K. A. M. A. R. U. Z. A. M. A. N., and Dikin, A. (2005). Biochemical and physiological characterization of *Burkholderia cepacia* as biological control agent. *Int J Agric Biol*, 7, 385-388.
- Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., & Mounteer, A. (2004). Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology*, 152(6), 371-375.
- Soria, S., Alonso, R., & Bettucci, L. (2012). Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 281.
- Souza, E. L. D., Silva, C. A. D., & Sousa, C. P. D. (2005). Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4), 559-566.
- Stöveken, N., Pittelkow, M., Sinner, T., Jensen, R. A., Heider, J., & Bremer, E. (2011). A Specialized Aspartokinase Enhances the Biosynthesis of the Osmoprotectants Ectoine and Hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Journal of bacteriology*, 193(17), 4456-4468.
- Struger, J., Van Stempvoort, D. R., & Brown, S. J. (2015). Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater?. *Environmental pollution*, 204, 289-297.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbial Ecology*, 63(2), 249-266.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459.

- Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., Xu, Y., & Shen, Q. (2013). Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection*, 43, 134-140.
- Tremacoldi, C.R. (2010). Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle. *Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Tyrrell, J., Whelan, N., Wright, C., Sá-Correia, I., McClean, S., Thomas, M., & Callaghan, M. (2015). Investigation of the multifaceted iron acquisition strategies of *Burkholderia cenocepacia*. *Biometals*, 28(2), 367-380.
- Vanoni, M. A., & Curti, B. (1999). Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(4), 617-638.
- Vial, Ludovic et al. (2007). *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(9), 1407-1429.
- Walburger, A., Lazdunski, C., & Corda, Y. (2002). The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Molecular microbiology*, 44(3), 695-708.
- Wei, H. L., & Zhang, L. Q. (2006). Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(2), 267-280.
- Xu, L. M., Liang, Y. F., Ye, Q. D., Yang, Z., Foley, M., Snyder, S. A., . & Wong, H. N. (2012). Organic Chemistry-Breakthroughs and Perspectives.
- Zarad, S. I., Nimkar, N. R., Desai, K. R., Solanki, M. S., Gandhi, D. M., Gandhi, H. M., ... & Suraliwalla, M. N. (2016). Measurement of Uncertainty Associated with Quantification of Ethephon. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(45).
- Zhang, Y., Li, C., Vankemmelbeke, M. N., Bardelang, P., Paoli, M., Penfold, C. N., & James, R. (2010). The crystal structure of the TolB box of colicin A in complex with TolB reveals important differences in the recruitment of the common TolB translocation portal used by group A colicins. *Molecular microbiology*, 75(3), 623-636.
- Zhou, W., Shi, W., Xu, X. W., Li, Z. G., Yin, C. F., Peng, J. B., ... & Yang, J. (2018). Glutamate synthase MoGlt1-mediated glutamate homeostasis is important for autophagy, virulence and aconidiation in the rice blast fungus. *Molecular plant pathology*, 19(3), 564-578.