EMY TIYO MANO

Prospecção de genes de *Burkholderia seminalis*
TC3.4.2R3 com potencial para o biocontrole

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP / Instituto
Butantan / IPT, para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2015

EMY TIYO MANO

Prospecção de genes de *Burkholderia seminalis*
TC3.4.2R3 com potencial para o biocontrole

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP / Instituto
Butantan / IPT, para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biologia
Molecular e Genética de Micro-
organismos

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz
de Araújo

Versão original

SÃO PAULO
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Mano, Emy Tiyo.

Prospecção de genes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 com potencial para o biocontrole / Emy Tiyo Mano. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Interação planta/micro-organismo; prospecção, clonagem e expressão de genes para o biocontrole.

Versão do título para o inglês: Prospection of genes of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 with potential for biocontrol.

1. Patatina 2. *Oncidium* 3. Controle biológico 4. Necrose 5. Orquídeas 6. Interação micro-organismo/hospedeiro I. Araújo, Prof. Dr. Welington Luiz de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB062/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Emy Tiyo Mano.

Título da Tese: Prospecção de genes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 com potencial para o biocontrole.

Orientador(a): Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICO

*A minha família,
pelo exemplo e uma vida de dedicação,
pelos ensinamentos que estão a guiar meus passos ...*

OFEREÇO

*Aos meus orientadores, aos amigos
e aos colegas de trabalho, por me
acompanharem nessa jornada,
tornando-a mais feliz*

OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado, me ajudando a levantar em cada queda, e cada vez mais forte para enfrentar os novos desafios. Sem ele nada disso seria possível.

A minha família, que a maturidade e o tempo tem tornado mais próxima, a quem me orgulho grandemente pela batalha diária, a honestidade, os princípios, e tudo que de alguma forma me ensinaram e me deram base para aprender a caminhar sozinha, e responsável por parte do que sou hoje.

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, pela oportunidade dada para concretizar mais um importante passo profissional e por confiar em mim mais esse desafio.

A Aline Neves e Almir Ferreira, pela colaboração no projeto *Burkholderia*, e também aos corridos happy hours depois de um dia cansativo de laboratório, mas antes de encarar uma jornada de 3 horas de transporte público.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana e Laboratório de Bioprodutos do Professor Dr. Welington Luiz de Araújo: Almir, Daiene, Linoca, Raíssa, Lina, Lila, Isa, Mabel, Pri, Jeni, Lili, Felipe, Ricardo, Dri, Manuella, Lele, Roberta e agregados.

A todos os amigos, colegas e integrantes do laboratório do professor Dr. Gabriel Padilla Maldonado: Alejandra, Roger, Maria Paula, Aline Costa, Simone, Ruth, Mari, Vanessa, Fernanda, Carlinha, Renata e agregados, e claro, ao Dr. Gabriel Padilla Maldonado, pela elegância e simpatia com que sempre nos recebe.

A todos os colegas, professores, funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela convivência, o uso de equipamentos, pela troca de experiências e conhecimentos que contribuíram para o meu crescimento científico.

A Dra. Maria Carolina Quecine, hoje professora e pesquisadora do Departamento de Genética da ESALQ, por compartilhar da sua inteligência e sempre a disposição para contribuir com algo em nosso trabalho.

A Dra. Roberta Cristina Ruedas Martins pela colaboração nos ensaios de dosagem de etileno.

Aos amigos e colegas do Núcleo Integrado de Biotecnologia, onde a parte inicial do projeto foi desenvolvida, no Laboratório de Genética de Microrganismos, e colaboração do Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e do Laboratório de Genômica Funcional e Estrutural, da Universidade de Mogi das Cruzes.

Ao Prof. Dr. Leo Eberl, do Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich, pela oportunidade de treinamento em seu laboratório para execução dos últimos experimentos relativos ao projeto de doutorado, e a minha co-orientadora Dra. Maria Sanchez-Contreras, por todo aprendizado e tempo dedicado durante meu treinamento.

A todos integrantes do laboratório de Microbiologia do Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich: Kirsty, Aurelien, Steven, Elizabeth, Gerardo, Antri, Christian, Martina, Olga, Anugraha, Aspasia, Marta, Angela, Daniel, Gabriela, Alessandra, Alexandra e Isa Scholl. Thank you! Danke! Merci! Gracias! Ευχαριστώ! Dhan'yavāda!

Aos meus primeiros companheiros de moradia durante meu doutorado sanduíche em Zurique, da Voltastrasse 18, Adalberto, Erica, Dung, Mulwa e Kobil, e ao meu segundo lar em Zurique, Moritz, seus familiares e amigos, o violoncelo e seu polêmico gato Lasse. Muito obrigada pela companhia, jantares, “brigas”, risadas e passeios durante esta grande oportunidade de experiência profissional e pessoal.

A todos os amigos fora desse “mundo acadêmico”, e alguns muitos que também vieram de lá, obrigada pelos momentos de entretenimento, desabafos, conselhos, risadas, companheiros de atividade físicas, do inglês, rodinhas de violão, da fisioterapia, viagens, e tudo mais que torna a vida um pouco mais leve e feliz.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Nº Processo 2011/11271-0) e suporte durante todo o projeto e no doutorado sanduíche na Universität Zürich, Suíça.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, afinal foram mais de quatro longos anos, e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”

Carl Sagan

RESUMO

MANO, E. T. **Prospecção de genes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 com potencial para o biocontrole.** 2015. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O gênero *Burkholderia* é composto por bactérias Gram-negativas, que apresentam uma elevada diversidade fisiológica e genética. Bactérias do gênero estão sendo objeto de estudos e amplamente utilizadas para uma série de aplicações biotecnológicas, como agentes de biocontrole, promotores de crescimento vegetal, bioremediação/biodegradação e como produtor de importantes moléculas de interesse na medicina, agricultura e indústria. Foi demonstrado que a linhagem *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3, isolada endofiticamente a partir de raízes de cana de açúcar (Proc. FAPESP 2002/14143-3), é capaz de controlar fungos e bactérias patogênicas, bem como produzir antibióticos (Proc. FAPESP 2008/52406-2; Proc. FAPESP 2008/56505-5). A identificação de genes nocauteados em mutantes defectivos no controle da necrose por *Burkholderia gladioli* ORQF-04F em *Oncidium Alowa* Iwanaga, sugere que este controle está correlacionado com uma resposta à complexa interação entre as bactérias envolvidas e a planta hospedeira. A análise de perfil fisiológico, através da determinação da liberação de etileno, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica da planta hospedeira evidenciam, porém, que não há o envolvimento de respostas de defesa da planta no controle dos sintomas da necrose e que o sucesso do controle é dependente do contato direto do agente de biocontrole *B. seminalis* com o patógeno *B. gladioli* dentro dos tecidos da planta. Ensaios de antagonismo demonstram que *B. seminalis* TC3.4.2R3 possui atividade antimicrobiana *in vitro* contra *B. gladioli*, sendo observado um halo de inibição de 1-3mm em meio sólido ao redor da colônia de *B. seminalis* e redução de 40% da densidade de *B. gladioli* em co-cultura líquida com *B. seminalis*, quando avaliada por qPCR. As análises citadas foram realizadas também para o mutante M01 defectivo no controle da necrose, que apresenta uma inserção do transposon Tn5 em uma região intergênica da patatina-ferritina e não mostrou diferenças significativas comparado ao isolado selvagem. Os resultados propõem que existe atividade antimicrobiana de *B. seminalis* sobre *B. gladioli*, mas talvez este não seja o mecanismo central de controle da doença.

Palavras-chave: Patatina. *Oncidium*. Controle biológico. Necrose. Orquídeas. Interação micro-organismo/hospedeiro.

ABSTRACT

MANO, E. T. **Prospection for genes of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 with potential for biocontrol.** 2015. 121 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The genus *Burkholderia* consists of Gram-negative bacteria, which has a high physiological and genetic diversity. Bacteria of this genus are the subject of studies and widely used for a number of biotechnological applications, as biocontrol agents, plant growth promoters, bioremediation / biodegradation and as such a producer of important and useful molecules in medicine, agriculture and industry. It was shown that *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 strain, endophytically isolated from sugar cane roots (Proc. FAPESP 2002 / 14143-3), is capable of controlling fungi and bacteria pathogenic growth, as well as producing antibiotics (Proc. FAPESP 2008 / 52406-2; Proc FAPESP 2008 / 56505-5). The identification of genes knocked out in mutants defective in necrosis controlling caused by *Burkholderia gladioli* ORQF-04F in *Oncidium Alowa* Iwanaga, shows that this control is correlated with a response to a complex interaction between the bacteria involved and the host plant. The physiological profile analysis, by determining the release of ethylene, hydrogen peroxide and lipid peroxidation of the host plant, however, showed that there is no involvement of plant defense responses in controlling of necrosis symptoms and the success of control is dependent on direct contact of the biocontrol agent *B. seminalis* TC3.4.2R3 with the pathogen *B. gladioli* within the plant tissues. Antagonism assays showed that *B. seminalis* has antimicrobial activity *in vitro* in solid medium against *B. gladioli*, it has been observed a inhibition halo between 1-3 mm around the colony of *B. seminalis* and also it has been observed a 40% reduction in density of *B. gladioli* in liquid co-cultivation with *B. seminalis* when assessed by qPCR. The presented analyzes were also performed for the defective in controlling necrosis M01 mutant which has a insertion of transposon Tn5 in the intergenic region between a patatin gene and a hypothetical protein of ferritin superfamily. However, no significant difference between M01 mutant and the wild type strain were found. The results suggested that *B. seminalis* has antimicrobial activity against *B. gladioli*, but, it is supposed which it is not the only central mechanism for controlling soft rot disease in *Oncidium Alowa* Iwanaga.

Keywords: Patatin. *Oncidium*. Biological control. Necrosis. Orchids. Microorganism/host interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Espécies da família Orchidaceae: (A) *Ondidium* Alowa Iwanaga, (B) *Cymbidium cricket*, (C) *Cattleya forbesii*, (D) *Brasilela purpurata russeliana*, (E) *Dendrobium lodigesii*, (F) *Phalaenopsis* híbrida branca, (G) *Miltonia spectabilis*, (H) *Brassia* e (I) *Oncidium* Sharry Baby Sweet Fragrance. Fonte: Colibri Orquídeas (<http://www.colibriorquideas.com/lista.php>) ----- 41
- Figura 02** - Segmentos demarcados em *Oncidium* Alowa Iwanaga para determinação da densidade de colonização de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e mutantes Tn5 ----- 49
- Figura 03** - Muda em estágio de plântula de *Oncidium* Alowa Iwanaga condicionado em vidro com tampa de borracha para retenção de gases produzidos pela planta ---- 56
- Figura 04** - (a) Sintomas da necrose em pimentão (*Capsicum annuum* L.); (b) sintomas da necrose na folha de uma planta jovem de *Oncidium* Alowa Iwanaga. (MANO, 2011) ----- 59
- Figura 05** - Identificação da linhagem ORQF-04F isolada de *Oncidium* Alowa Iwanaga, capaz de causar sintomas da necrose em pimentão e tecidos de *Oncidium* Alowa Iwanaga. Enraizamento da árvore pelo método Neighbor-joining (Jukes & Kantor, 1969) baseado nos dados de sequência parcial do gene 16S rRNA de espécies de *Burkholderia*. O número nos ramos indica o valor de bootstrap, o qual foi calculado após 1000 réplicas. Barra de escala de 0.01 indica o número de substituição na posição de nucleotídeos. ----- 60
- Figura 06** - Teste de diferenciação de *P. aeruginosa* em meio KING B. Ausência de produção de pioverdina (pigmento fluorescente) sobre luz ultra-violeta da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 em meio KING B (a); produção de pioverdina (fluoresceína) em *P. aeruginosa* ATCC 9027, pigmento de cor verde-amarelada observável sobre luz-ultravioleta (b). ----- 62
- Figura 07** - Ensaio de biocontrole de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na inibição dos sintomas de *B. gladioli*, após 30 dias em temperatura ambiente ----- 64
- Figura 08** - Ensaio de biocontrole de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na inibição dos sintomas de *B. gladioli*, após 30 dias em temperatura ambiente ----- 65
- Figura 09** - Sintomas da necrose causada por (a) *B. gladioli* ORQF-04F, apresentando uma lesão de bordas regulares, (b) lesão de bordas irregulares quando *B. seminalis* TC3.4.2R3 é inoculado um dia antes do patógeno há uma distância de 1 cm. Ausência de sintomas nos demais tratamentos (c,d,e) ----- 67
- Figura 10** - Controle dos sintomas da podridão de *B. gladioli* sobre o halo de infiltração de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (indicado pelo traço vermelho). O halo de infiltração de *B. gladioli* é indicado pelo traço azul ----- 68

Figura 11 - *Pulse Field Gel Electrophoresis* de plugs do DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3, (a) digerido com a enzima de restrição MssI (PmeI); (b) DNA íntegro. Marcador molecular *Sacharomyces cerevisiae* YPH80 ----- 70

Figura 12 - Anotação e contexto gênico da inserção do transposon Tn5 no mutante M01 Tn5:patatina-ferritina, e comparação com os genomas de *B. cenocepacia* AU1054, *B. cenocepacia* J2315, *Burkholderia* sp. 383 e *B. ambifaria* AMDD ----- 76

Figura 13 - Região do cromossomo de *B. seminalis* TC3.4.2R3 entre os *locus* Bsem_02385 a Bsem_02389. Gráfico interno mostra a predição de proteínas codificadoras sendo: maior (verde) e menor (vermelho) probabilidade ----- 76

Figura 14 - Curva de crescimento de *B. seminalis* TC3.4.2R3, e o mutante M01Tn5:patatina-ferritina, ao longo de 30 horas. (*) Diferença estatisticamente significativa pelo teste t-Student ($P>0,95$) ----- 82

Figura 15 - Densidade bacteriana do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, nos segmentos F1, F2, F3 de folhas, e o segmento único do bulbo de *Oncidium* Alowa Iwanaga, após 6 dias da inoculação ---- 84

Figura 16 - Densidade bacteriana do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, nos segmentos F1, F2 e F3 de folhas, e o segmento único do bulbo de *Oncidium* Alowa Iwanaga, após 12 dias da inoculação -- 85

Figura 17 - Gel de eletroforese dos produtos de PCR dos primers fad, pio, pha, lip, tiol, andtd e burkrecN, com os templates (A) DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3; (B) DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F; DNA total extraído de *Oncidium* Alowa Iwanaga inoculado com *B. seminalis* TC3.4.2R3 (C) de 6 dias e (D) 12 dias. Marcador molecular 1 Kb (Fermentas) ----- 87

Figura 18 - Gel de eletroforese dos produtos de PCR dos primers gla-fw/gla-rv, glaf1/glar1 e glaf2/glar1, com os templates (A) DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e (B) DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F. Marcador molecular 1 kb (Fermentas) ----- 89

Figura 19 - Curva de amplificação das amostras de DNA genômico extraído de cultura pura de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (53,4 ng/μl), diluídas em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ----- 90

Figura 20 - Monitoramento da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, em 6 e 12 dias, em pseudobulbo macerado de *Oncidium* Alowa Iwanaga em interação com *B. gladioli* ORQF-04F. *Teste Tukey ($P>0,05$) ----- 91

Figura 21 - Monitoramento da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, em 6 e 12 dias, em tecido de folha (secção 01) macerado de *Oncidium* Alowa Iwanaga em interação com *B. gladioli* ORQF-04F. *Teste Tukey ($P>0,05$) ----- 92

Figura 22 - Monitoramento da densidade de *B. gladioli* ORQF-04F, *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, em co-cultura após 24 horas a 28 °C sob agitação ----- **94**

Figura 23 - Zonas de inibição da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 frente a bactéria *B. gladioli* ORQF-04F. As setas indicam o halo de inibição ----- **95**

Figura 24 - Dosagem da liberação de etileno em plantas de *Oncidium Alowa Iwanaga* inoculadas com *B. seminalis* TC3.4.2R3, *B. gladioli* ORQF-04F, *B. seminalis* TC3.4.2R3 + *B. gladioli* ORQF-04F, tampão PBS e plantas sem nenhum inóculo. Tempos de coleta de 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 dias e 7 dias ----- **96**

Figura 25 - Determinação da liberação de H₂O₂ em *Oncidium Alowa Iwanaga* na interação com *B. seminalis* TC3.34.2R3, o mutante M01 tn5:patatina-ferritina e *B. gladioli*, em 3 e 20 horas. *Duncan Test Statistical (P>0,95) ----- **99**

Figura 26 - Determinação da peroxidação lipídica (MDA) *Oncidium Alowa Iwanaga* na interação com *B. seminalis* TC3.34.2R3, o mutante M01 tn5:patatina-ferritina e *B. gladioli*, em 3 e 20 horas. *Duncan Test Statistical ----- **101**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Espécies e variedades de orquídeas avaliadas para os ensaios de espectro de atividade de *B. gladioli* ORQF-04F e *B. seminalis* TC3.4.2R3----- **40**

Tabela 02 - Primers de *B. seminalis* TC3.4.2R3 para ensaio de quantificação absoluta por qPCR ----- **50**

Tabela 03 - Primers sintetizados para monitoramento de *B. gladioli* ORQF-04F por qPCR ----- **51**

Tabela 04 - Anotação de genes adjacentes a inserção do transposon no mutante M01 Tn5:patatina-ferritina ----- **73**

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Curva padrão de etileno (área do cromatograma de óxido de etileno x concentração em nmol de etileno), obtidos de amostras de óxido de etileno nas concentrações: 35 nmol/mol, 178.6 nmol/ml, 357.1 nmol/mol e 714.3 nmol/ml. Coeficiente de correlação 0,992.----- **119**

Anexo B - Curva padrão de H₂O₂ para determinação da equação linear, utilizando peróxido de hidrogênio comercial nas concentrações de 0 mM; 0,049 mM; 0,098 mM; 0,196 mM; 0,294 mM; 0,392 mM; 0,49 mM; 0,588 mM; 0,78 mM; e 0,98 mM. - **120**

Anexo C - Curva padrão de crescimento de *B. seminalis* TC3.4.2R3 para determinação da equação linear. ----- **121**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
atpD	ATP synthase beta chain
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> Complex
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
ct	Cycle threshold
gltB	Glutamate synthase large subunit
gyrB	DNA Gyrase subunit B
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ISA	Induced systemic resistance
lepA	GTP binding protein
LMP	Low melting pointing
LPS	Lipolissacarídeos
MDA	Malondialdeído
MLSA	Multilocus sequences analysis
NCBI	Nacional Center Biotechnology Information
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polimerase chain reaction
phaC	Acetoacetyl-CoA reductase
PMFS	Phenylmethanesulphonyl fluoride
PRs	Proteínas relacionadas à patogênese
pv	Patovar
qPCR	Quantitative polimerase chain reaction
RecA	Recombinase A
RFC	Rotation particle couple
SAR	Systemic acquired resistance
SRA	Sequence read archive
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricoloacético
trpB	Tryptophan synthase subunit

TSA	Trypic soy agar
TSB	Trypic soy broth
TSS6	Type secretion system 6
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O GÊNERO <i>Burkholderia</i>	23
2.1.1 Aplicações do gênero <i>Burkholderia</i> no controle de fitopatógenos	24
2.1.2 Espécies de <i>Burkholderia</i> fitopatogênicas	26
2.1.2.1 <i>Burkholderia gladioli</i> (<i>Pseudomonas gladioli</i> ou <i>P. marginata</i>)	27
2.1.2.2 <i>B. gladioli</i> como patógeno em orquídeas	29
2.1.3 Interações interespecíficas dentro do gênero <i>Burkholderia</i>	31
2.2 MECANISMOS GERAIS ENVOLVIDOS NO ANTAGONISMO MICROBIANO E CONTROLE BIOLÓGICO	32
2.2.1 Estudo de genes envolvidos em mecanismos de controle biológico de fitopatógenos	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Burkholderia</i> CAPAZES DE CONTROLAR A NECROSE CAUSADA POR <i>B. gladioli</i> EM <i>Oncidium</i> ALOWA IWANAGA	37
4.1.1 Isolamento e identificação do patógeno <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	37
4.1.2 Caracterização da linhagem <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 capaz de controlar a necrose em <i>Oncidium</i> Alowa Iwanaga por <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	38
4.2 ESPECTRO DE HOSPEDEIROS AO PATÓGENO <i>B. gladioli</i> ORQF-04F E O CONTROLE POR <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	39
4.3 INTERAÇÃO ENTRE <i>B. gladioli</i> ORQF-04F E <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 EM <i>Oncidium</i> ALOWA IWANAGA	41
4.4 GENOMA DE <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 E PROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA NECROSE	42
4.4.1 Sequenciamento do genoma de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	42
4.4.1.1 Pulse-Field Gel Electrophoresis (Gel de Eletroforese de Campo Pulsado) do DNA genômico de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	42

4.4.1.1.1 Preparo dos blocos (plugs) de DNA genômico de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	----	43
4.4.1.1.2 Digestão do bloco (plugs) com enzima de restrição	-----	43
4.4.1.1.3 Corrida de eletroforese de campo pulsado do DNA genômico de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 digeridos	-----	44
4.4.1.2 sequenciamento de nova geração 454 gs flx titanium	-----	44
4.4.1.2.1 Montagem genômica de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	-----	45
4.4.1.2.2 Análise de qualidade das sequências	-----	45
4.4.1.2.3 Anotação genômica de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	-----	45
4.4.1 Estudo do contexto gênico <i>in silico</i> do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina	-	
	-----	46
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE M01 TN5:PATATINA-FERRITINA DEFECTIVO NO CONTROLE DA NECROSE M <i>Oncidium</i> ALOWA IWANAGA POR <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	-----	46
4.5.1 Curva de crescimento do isolado selvagem e do mutante M01 Tn5 de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	-----	47
4.5.2 Colonização do isolado selvagem de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina nos tecidos de <i>Oncidium</i> Alowa Iwanaga	-----	47
4.5.3 Determinação da densidade de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina por qPCR na interação com <i>B. gladioli</i>	-----	49
4.5.3.1 Desenvolvimento de primers para detecção de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e <i>B. gladioli</i> ORQF-04F por qPCR	-----	49
4.5.3.2 Monitoramento da densidade de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina em folha e pseudobulbo de <i>Oncidium</i> Alowa Iwanaga por qPCR		51
4.5.3.3 Determinação da densidade de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina e <i>B. gladioli</i> ORQF-04F em co-cultura por qPCR	-----	53
4.5.4 Perfil fisiológico de <i>Oncidium</i> Alowa Iwanaga em resposta a interação de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 com <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	-----	54
4.5.4.1 Determinação de etileno	-----	55
4.5.4.2 Determinação de peróxido de hidrogênio	-----	56
4.5.4.2 Determinação da peroxidação lipídica	-----	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	-----	59
5.1 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Burkholderia</i> CAPAZES DE CONTROLAR A NECROSE CAUSADA POR <i>B. gladioli</i> EM <i>Oncidium</i> ALOWA IWANAGA	-----	59

5.1.1 Isolamento e identificação do patógeno <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	59
5.1.2 Caracterização da linhagem <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 capaz de controlar a necrose em <i>Oncidium Alowa Iwanaga</i> por <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	61
5.2 ESPECTRO DE HOSPEDEIROS DE <i>B. gladioli</i> ORQF-04F E O CONTROLE POR <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	62
5.3 INTERAÇÃO DE <i>B. gladioli</i> ORQF-04F E <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 EM <i>Oncidium ALOWA IWANAGA</i>	66
5.4 GENOMA DE <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 E PROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA NECROSE	68
5.4.1 Sequenciamento do genoma de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	68
5.4.1.1 Pulse-Field Gel Electrophoresis (Gel de Eletroforese de Campo Pulsado) do DNA genômico de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	69
5.4.1.2 sequenciamento de nova geração 454 gs flx titanium	70
5.4.1.2.1 Montagem genômica de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	70
5.4.1.2.2 Anotação genômica de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	71
5.4.1 Estudo do contexto gênico <i>in silico</i> do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina	71
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE M01 TN5:PATATINA-FERRITINA DEFECTIVO NO CONTROLE DA NECROSE EM <i>Oncidium ALOWA IWANAGA</i> POR <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	81
5.5.1 Curva de crescimento do isolado selvagem e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	81
5.5.2 Colonização do isolado selvagem de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina nos tecidos de <i>Oncidium Alowa Iwanaga</i>	83
5.5.3 Determinação da densidade de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina por qPCR na interação com <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	86
5.5.3.1 Desenvolvimento de primers para detecção de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e <i>B. gladioli</i> ORQF-04F por qPCR	86
5.5.3.2 Monitoramento da densidade de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina em folha e pseudobulbo de <i>Oncidium Alowa Iwanaga</i> por qPCR	89
5.5.3.3 Determinação da densidade de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina e <i>B. gladioli</i> ORQF-04F em co-cultura por qPCR	93

5.5.4 Perfil fisiológico de <i>Oncidium Alowa</i> Iwanaga em resposta a interação de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 com <i>B. gladioli</i> ORQF-04F	95
5.5.4.1 <i>Determinação de etileno</i>	95
5.5.4.2 <i>Determinação de peróxido de hidrogênio</i>	97
5.5.4.2 <i>Determinação da peroxidação lipídica</i>	100
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
7 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Burkholderia* é caracterizado por apresentar grande versatilidade nutricional, podendo metabolizar mais de 200 diferentes fontes orgânicas de carbono. Esta capacidade reflete na sua habilidade em colonizar os mais variados nichos, sendo isolados 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. São inúmeros os relatos na literatura sobre suas aplicações no manejo agrícola, para o biocontrole, biodegradação/biorremediação, promoção do crescimento vegetal, mostrando a grande importância ecológica e biotecnológica do grupo.

Estudos anteriores demonstraram que um isolado endofítico identificado como *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 foi capaz de controlar os sintomas da necrose de *Burkholderia gladioli* ORQF-04F em diferentes espécies de orquídeas. No Brasil onde o controle de doenças bacterianas em orquídeas é problemático, uma vez que produtos químicos com boa eficiência não estão disponíveis para controle destes patógenos, e por não haver antibióticos registrados para uso em orquídeas, o uso de *Burkholderia* no controle biológico torna-se de interesse, pois mesmo que eficientes no controle do patógeno, os antibióticos vendidos no mercado externo podem apresentar problemas de fitotoxidez ou manchas em flores. Por outro lado, o controle biológico ocorre com o envolvimento de diversos mecanismos, os quais podem estar associados à indução de resistência sistêmica na planta, à produção de substâncias antimicrobianas, a competição por nutrientes e nicho ecológico, predação e parasitismo, produção de enzimas líticas, produção de toxinas, entre outros mecanismos diversos, sendo de relevante interesse o entendimento destes mecanismos a fim de garantir o sucesso do biocontrole.

Atualmente diversas ferramentas estão disponíveis, contribuindo de forma significativa na compreensão de quais processos biológicos, em nível molecular, estão envolvidos nas interações da tríade planta-patógeno-agente de biocontrole, direcionando estudos mais detalhados. Dentre as ferramentas atualmente disponíveis, podem ser citadas a mutagênese aleatória através de transposons, onde mutantes com características defectivas de interesse podem ter seus genes nocauteados e identificados; o sequenciamento em larga escala dos transcritos de uma célula em uma

dada condição, entre outras ferramentas. Por meio deste, pôde ser observado o nível de complexidade da interação entre agentes de biocontrole e patógenos, permitindo o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O GÊNERO *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* foi criado em 1992 por Yabuuchi et al., baseado em análises de sequências do gene 16S rRNA, valores de homologia DNA-DNA, composição de ácidos graxos e lipídeos celulares, além de outras características fenotípicas. Este gênero é composto por bactérias pertencentes ao grupo II de homologia ao RNA do gênero *Pseudomonas*, excluindo *P. pickettii* e *P. solanacearum* (gênero *Ralstonia*). Inicialmente, sete espécies do gênero *Pseudomonas* foram transferidas para o novo gênero, este nomeado de *Burkholderia*, em homenagem ao bacteriologista americano Walter Burkholder, o qual descreveu o agente etiológico da podridão em cebola, provocada por *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) (YABUUCHI et al., 1992).

O gênero compreende bactérias gram-negativas, aeróbicas, não formadoras de esporos, taxonomicamente pertencente à subdivisão β -proteobacteria. Atualmente, o gênero é composto por 89 espécies válidas segundo a Lista de Nomes Procarióticos (LPSN, 2015).

As espécies do gênero *Burkholderia* possuem grande versatilidade nutricional, são capazes de metabolizar mais de 200 diferentes fontes orgânicas de carbono, refletindo na sua capacidade em habitar os mais variados nichos, sendo isolados 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 do gênero também já foram utilizadas no manejo agrícola (HOLMES et al., 1998), para o biocontrole (MEYER et al., 2001), biodegradação/biorremediação (ADJEI; OHTA, 1999) e promoção do crescimento vegetal (PERIN et al., 2006; SANTOS et al., 2001).

Grande atenção tem sido dada a um grupo de *Burkholderia* em particular, o Complexo *cepacia* (Bcc), atualmente representado por pelo menos 18 espécies (ou genomovares) estreitamente relacionadas (COENYE et al., 2001), sendo elas: *Burkholderia cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* (COENYE et al., 2001;

MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; VERMIS et al., 2002), *B. latens*, *B. diffusa* (VANLAERE et al., 2008), *B. metallica*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. ubonensis*, *B. contaminans*, *B. lata* (VANLAERE et al., 2009), e mais recentemente, uma linhagem isolada de humanos em ambiente clínico e ambiental, denominado de genomovar *B. pseudomultivorans* sp./nov., que apresentou diferenças bioquímicas e na sequência do gene *recA* em MLSA (Multilocus Sequence Analysis), quando comparada com outras espécies do complexo Bcc (PEETERS et al., 2013).

Seu genoma consiste de replicons múltiplos, com 2 a 4 cromossomos, tamanho total variando de 4Mb a 9Mb. A rápida evolução é uma característica inerente a aquisição de DNA exógeno no genoma de quase todas as espécies de *Burkholderia*, com aproximadamente 10% do seu genoma consistindo de ilhas genômicas. Um grande número de genes em plasmídeos, bacteriófagos e sequências de inserção também contribuem para a plasticidade genotípica e diversidade do genoma no gênero, promovendo extensa variabilidade genética e fisiológica (LESSIE et al., 1996; MAHENTHIRALINGAM; DREVINEK, 2006). Existem fortes evidências de que membros do complexo Bcc vivem comensalmente em plantas, em íntima associação com as raízes, sendo uma das bactérias mais predominantes na raiz e na rizosfera (BREDJA et al., 1994; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; NACAMULLI et al., 1997).

2.1.1 Aplicação de bactérias do gênero *Burkholderia* no controle de fitopatógenos

Experimentos em campo mostram que bactérias do gênero são capazes de 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; COENYE; VANDAMME, 2003). O controle biológico utilizando burkholderias poderia substituir parcialmente a utilização de pesticidas químicos comuns, como captan, thiran, PCNB, benomil e tiabendazol, assim como fumigantes, como brometo de metil (composto químico com alto potencial de destruição do ozônio), cloropicrin e todos os fungicidas ou biocidas de amplo espectro (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001).

Uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana, produzidos

por espécies de *Burkholderia* já foi relatada, entre elas as cepacinas, pirrolnitrinas, cepaciamidas, cepacidinas, alteridinas, quinolonas, fenazinas, sideróforos e lipopeptídeos, em sua maioria, compostos com atividade antifúngica (HILL et al., 1994; HUANG; WRONG, 1998; MAO et al., 2006; PAKKER et al., 1984), no entanto, o envolvimento destes metabólitos, assim como os mecanismos de controle não são bem conhecidos para estas bactérias.

Pakker et al. (1984) citaram dois novos antibióticos acetilênicos isolados de *B. cepacia* SC11,783, identificados como cepacina A, que apresentou boa atividade antagônica contra estafilocos e, cepacina B, que apresentou excelente atividade contra estafilococos e bactérias Gram-negativas. A produção do antifúngico pirrolnitrina por uma linhagem de *Pseudomonas cepacia* B37w esteve associada à inibição dos sintomas da seca da raiz por *Fusarium sambucinum* (BURKHEAD et al., 1994). Da mesma forma, a linhagem 5.5B produtora de pirrolnitrinas foi capaz de suprir a podridão das hastes em poinsettia causada por *Rhizoctonia solani*, enquanto linhagens mutantes RR13-1 e UV 19-4, que produziam quantidades entre 5000 a 20000 vezes menor do metabólito, foram menos capazes em inibir a doença (HWANG; CHILTON; BENSON, 2002).

Bevinino et al. (2000) observaram que a linhagem de *B. cepacia* MC17, já descrito como excelente agente promotor de crescimento de plantas de milho, também teve um efeito positivo sobre o seu crescimento quando cultivadas em solo infestado por *Fusarium moliniforme*, afetando negativamente a infestação pelo fungo nos estágios iniciais de crescimento da planta, fase em que é observada uma maior densidade da bactéria. Os autores do estudo sugerem que mais de um mecanismo, como a competição por substrato, a exclusão do nicho, antibiose e a indução de resistência, podem estar ocorrendo ao mesmo tempo e serem responsáveis pelos resultados observados (NACAMULLI et al., 1997).

Outra linhagem, a *Burkholderia* 2.2.N, foi capaz de inibir o crescimento de diversas bactérias, leveduras e fungos, sendo observada uma zona de inibição ao redor de frações da cultura. Uma zona de inibição, porém de menor extensão, também foi observada para frações de cultura livre de células obtidas por filtração, e também de culturas pasteurizadas, revelando que a atividade antimicrobiana não depende da presença de células vivas, mas da produção de moléculas secretadas para o meio (CAIN et al., 2000)

No estudo de Heungens e Parke (2000) foi observado que a linhagem selvagem

de *B. cepacia* AMMDR1 foi capaz de reduzir significativamente a colonização em sementes pelo fungo *Pythium aphanidermatum*, e a produção de oogonia de *Aphanomyces euteiches* em raízes, ambas de plantas de ervilha, mas somente quando a bactéria foi inoculada juntamente e em densidades muito altas. Já mutantes defectivos na antibiose, não exibiram controle significativo em todas as condições avaliadas, sugerindo que este seja o mecanismo primário do controle, mas dependente da densidade do agente de controle, do estágio de desenvolvimento do patógeno e também da interação com a planta hospedeira.

Como foi possível observar, a aplicação de linhagens de *Burkholderia* para o controle de patógenos tem sido frequente, em parte devido a sua alta versatilidade, provavelmente em função do tamanho e variabilidade genotípica que possuem. O perfil genético destas bactérias as torna em parte, um grupo potencialmente explorável para novas abordagens, com inúmeras aplicações no campo da indústria, da medicina e agricultura, justificando o interesse e a importância em estudos com espécies deste gênero, principalmente por pouco ainda se saber sobre os mecanismos envolvidos a nível molecular.

2.1.2 Espécies de *Burkholderia* fitopatogênicas

Bactérias do gênero *Burkholderia* interagem com plantas em busca de nutrientes, podendo resultar em promoção de crescimento ou proteção contra patógenos e pragas. Entretanto, algumas espécies podem interagir com a planta resultando em doença ou morte do hospedeiro. Espécies de *Burkholderia* fitopatogênicas dispõem de um amplo espectro de fatores extracelulares os quais permitem que causem doenças em diferentes hospedeiros. Algumas espécies produzem enzimas que afetam a estrutura da parede e a integridade do tecido vegetal, permitindo o acesso aos nutrientes; enquanto outras espécies produzem toxinas não específicas ao hospedeiro que permitem o acesso a nutrientes, crescimento e proliferação. A análise genômica de espécies fitopatogênicas fornece uma visão sobre os mecanismos envolvidos na adaptação e patogênese (GONZALEZ; VENTURI; ENGLENDOW, 2007), mostrando que mesmo dentro de um gênero, diferentes perfis genômicos que conferem diferentes interações micro-

organismo/planta hospedeira podem ser observados.

As doenças bacterianas causam prejuízo à exploração comercial de plantas ornamentais, desde injúrias que afetam a aparência e aceitação comercial das mesmas, ou ainda podendo provocar a morte das plantas afetadas. A *Burkholderia gladioli*, assim como *Pectobacterium carotovora* (sin.: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), *Dickeya* sp. (sin.: *Erwinia chrysanthemi*), e *Ralstonia solanacearum* (sin.: *Pseudomonas solanacearum*), são alguns exemplos de fitobactérias que não apresentam especificidade e podem afetar, além de variedades ornamentais vastamente apreciadas comercialmente, como as orquídeas, um grande número de gêneros e famílias botânicas. Sendo assim, após o estabelecimento da bactéria fitopatogênica em determinada área, a sua erradicação torna-se muito difícil, senão impossível (MALAVOLTA JR; ALMEIDA, 2012), visto que podem colonizar diferentes nichos, interagindo de diferentes maneiras com outras espécies vegetais ou bacterianas no solo. A ocorrência de *B. gladioli* já foi relatada nos seis continentes, segundo dados compilados da CABI Distribution Maps Data of Plant Pests and Distribution Maps of Plant Diseases e da Crop protection Compendium Data (PLANTWISE, 2015).

2.1.2.1 *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas gladioli* ou *P. marginata*)

A espécie *B. gladioli* (Sin.: *P. gladioli* ou *P. marginata*) foi originalmente descrita por Severini (1913), como responsável pela podridão do pseudobulbo de *Gladiolus*, uma planta bulbosa florífera da família Iridaceae. Além de tratar-se de um patógeno humano oportunista (CHURCH et al., 2009; DURSU et al., 2012), registros na literatura a respeito da ocorrência de *B. gladioli* como fitopatógeno já foram citados em diferentes hospedeiros, entre elas a necrose de folhas de tabaco e arroz (FURUYA et al., 1997); podridão interna da palha de milho (LU; HENN, 2007); ferrugem da panícula do arroz (NANDAKUMAR et al., 2009); podridão de brotos e folhas de açafrão, e manchas nas folhas e rebentos (FIORI; LIGIOS; SCHAFFINO, 2011); podridão de *Leucojum aestivum*, uma planta de importância medicinal e em risco de extinção (STOYANOVA et al., 2013), entre outros hospedeiros, incluindo diversas plantas ornamentais de interesse econômico.

Basicamente, a espécie *B. gladioli* é considerada um típico fitopatógeno, e atualmente pode ser dividido em quatro patovares, sendo estes, *B. gladioli* pv. *alliicola*, *B. gladioli* pv. *agaricola*, *B. gladioli* pv. *gladioli* e *B. gladioli* pv. *cocovenerans*, os quais geralmente são classificados de acordo com sua especialização em relação à planta hospedeira (BULL et al., 2010; JIAO et al., 2003).

O patovar *B. gladioli* pv. *alliicola* tem sido associado à necrose com encharcamento e lesões de coloração parda em bulbo de *Allium cepa* (cebola) (LEE et al., 2005). Um segundo patovar, a *B. gladioli* pv. *agaricola*, também tem sido associado à necrose, causando lesões com encharcamento e pardas em uma variedade de cogumelos cultivados, incluindo os populares champignon, shitake e shimeji (VALENZUELA, 2013).

O patovar *B. gladioli* pv. *gladioli* geralmente está associado às infestações em arroz, gladiolos, batata, *cocos* (açafraão) e diversas plantas ornamentais, podendo manifestar-se através de pintas arredondadas de cor amarelo pálido que podem esmaecer a marrom, e em outras plantas, causar a necrose (STOYANOVA et al, 2011; VALENZUELA, 2013).

Por fim, o patovar *B. gladioli* pv. *cocovenerans*, antes considerado como a espécie *Burkholderia cocovenerans*, foi descrito como um patovar de *B. gladioli* após análises de dados de 16S rRNA (99% similaridade), hibridização DNA-DNA (80% a 96% de similaridade), e de ácidos graxos (JIAO et al., 2003). Este patovar tem sido associado a casos severos de intoxicação alimentar em países asiáticos, ocasionado pela produção de duas moléculas altamente tóxicas, a toxoflavina e o ácido bongkréquico, uma toxina potencialmente letal para mamíferos (mais de 40% de letalidade), após a ingestão de coco e milho fermentado e *Tremella faciformis* (cogumelo branco) deteriorado.

De maneira geral, os sintomas de *B. gladioli* ocorrem de forma variável em seus hospedeiros, incluindo necrose, quando há morte ou degeneração do tecido, lesões enegrecidas, manchas cloróticas, necrose com ou sem encharcamento, podendo levar ao comprometimento de órgãos ou mesmo resultar na morte da planta (FURUYA et al., 1997; KEITH; SEWAKE; ZEE, 2005). Embora os sintomas de *B. gladioli* se assemelhem aos sintomas induzidos por outros fitopatógenos já bem descritos como a *Pectobacterium carotovora* e *Burkholderia glumae*, os mecanismos de fitopatogenicidade de *B. gladioli* ainda não são bem conhecidos (KIRZINGER; NADARASAH; STARVRINIDES, 2011). Furuya et al. (1997) observaram que a toxina toxoflavina é essencial para indução dos sintomas de patogenicidade nas plantas hospedeiras e necrose em plantas

não hospedeiras, por linhagens virulentas de *B. glumae*. No entanto, quando mutantes de *B. gladioli* para a produção da mesma toxoflavina foram avaliados, eles continuavam a induzir rapidamente os sintomas de necrose em folhas de tabaco, demonstrando que outros fatores estão envolvidos em sua virulência. Em *B. gladioli*, estima-se que sua fitopatogenicidade esteja envolvida com um espectro de fatores extracelulares que permitem obter nutrientes, afetando a membrana celular e a integridade estrutural dos tecidos vegetais da planta susceptível compatível (GONZALEZ; VENTURI; ENGLENDOW, 2007).

2.1.2.2 *B. gladioli* como patógeno em orquídeas

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, uma das maiores famílias de Angiospermas, com mais de 25000 espécies distribuídas em cerca de 1000 gêneros, não considerando a grande quantidade de híbridos e variedades produzidas por orquidicultores. Dentre os gêneros mais cultivados e de importância econômica destacam-se *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Oncidium*, *Vanda*, *Lycaste*, *Miltonia*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Stanhopea*, e *Paphiopedilum* (MALAVOLTA JR.; ALMEIDA, 2012; MORAES; CALVACANTE; FARIA, 2002).

Embora os valores de exportação entre os anos de 2008-2009 tenham sofrido uma expressiva queda devido à deflagração e acirramento da crise internacional, contrária a tendência sucessiva de crescimento apresentada desde o ano de 2000, as exportações do setor florista movimentaram no ano de 2013, cerca de 23,81 milhões de dólares (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014a), e no mercado nacional, essa movimentação ficou em cerca de 5,7 bilhões de reais no ano de 2014, e há uma estimativa de crescimento na ordem de 8% para o ano de 2015 (IBRAFLOR, 2015).

Existem atualmente no Brasil, cerca de 8.248 produtores de flores e plantas ornamentais, os quais em conjunto cultivam uma área de aproximadamente 14.992 hectares, gerando algo em torno de 215.475 empregos diretos, sendo 33,37% relativos a produção, 3,9% relacionados a distribuição, 55,87% no varejo, e 3,8% em outras funções, demonstrando sua importância econômica para o país (IBRAFLOR, 2015)

As regiões Sul (28,6%) e Sudeste (53,3%) concentram grande parte dos

produtores nacionais de plantas ornamentais, com destaque ao Estado de São Paulo, que liderou o ranking nacional 2013 em termos de Valor Bruto da Produção (VBP), que representa os valores efetivos recebidos pelos produtores de flores e plantas ornamentais, agregando 73,74% da participação, confirmando seu elevado grau de concentração da atividade florícola nacional (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014b).

No Brasil, as orquídeas constituem um dos mais apreciados grupos de plantas ornamentais exploradas comercialmente, e dentre os setores agrícolas em fase de expansão, seu cultivo vem se destacando. No entanto, com o aumento da produção devido à expansão da demanda no mercado, observa-se um aumento no ataque de várias doenças e pragas. Cultivadas em ambientes fechados, sob condições de alta umidade, temperatura e densidade de plantas, cria-se um ambiente com condições ideais para a disseminação de patógenos e a manifestação dos sintomas. Em cultivos comerciais, a fonte do inóculo primário geralmente é constituída principalmente pelo uso de mudas contaminadas, muitas delas introduzidas por meio de mudas importadas não certificadas, e o contato dos exsudados dessas plantas pelos manipuladores permite que estes sejam facilmente disseminados (DAUGHTREY; BENSON, 2005; MALAVOLTA JR.; ALMEIDA, 2012; RAAIJMAKERS et al., 2008; VALARINI, 2006).

Em orquídeas, inúmeras doenças e pragas têm sido registradas, sendo estas causadas por insetos, ácaros, moluscos, nematóides, fungos, bactérias, e pelo menos 32 diferentes vírus (CAMPOS, 2002; DUFF; DALY, 2002; MALAVOLTA JR.; ALMEIDA, 2012). Dentre as doenças bacterianas, a necrose causada por *B. gladioli* vem sendo relatada como agente responsável por causar desde pequenas a grandes manchas foliares com ou sem maceração, em diferentes gêneros de orquídeas, incluindo *Dendrobium*, *Oncidium*, *Miltonia* e híbridos, onde sintomas avançados da doença são observados geralmente em plantas expostas ao ambiente ou irrigadas excessivamente (KEITH; SEWAKE; ZEE, 2005; MANO et al., 2015). A *P. carotovora* é a espécie mais descrita e tem um papel como responsável em causar doenças bacterianas, incluindo a necrose. No entanto, pode ser observado que os sintomas de *B. gladioli* são muito parecidos, podendo facilmente ser confundido com os das pectobacterias, e possivelmente por essa razão, ter sua ocorrência subrepresentada na literatura como um patógeno em orquídeas. No Brasil, a incidência de *B. gladioli* em flores de orquídeas de gênero não identificado foi relatada no Estado de Manaus e também no Estado de São Paulo, provocando danos em cultivos comerciais de *Dendrobium*, *Oncidium* e *Phalaenopsis* (MALAVOLTA JR.; ALMEIDA, 2012).

2.1.3 Interações interespecíficas dentro do gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* apresenta espécies/genótipos tanto benéficos do ponto de vista biotecnológico e ecológico, como patógenos oportunistas em determinadas condições do hospedeiro vegetal ou animal. Além disso, podem ser observadas relações de antagonismo entre diferentes espécies de *Burkholderia*. Exemplos de relações antagônicas entre espécies de *Burkholderia* são recorrentes na literatura. Lin et al. (2011) avaliaram a interação entre isolados de *B. multivorans* e *B. cenocepacia* contra o patógeno *B. pseudomallei*, agente causal da melioidose, uma doença infecciosa fatal para animais. Foi demonstrado que estas espécies apresentavam atividade antagônica *in vitro* contra *B. pseudomallei*, com halos de inibição variando de 7 mm a 32 mm. Também demonstraram que essa inibição não era dependente de contato, de forma que, apenas o contato com fatores solúveis permeáveis a membranas de 45 µm já resultavam na inibição do crescimento do patógeno. Além disso, como todas as linhagens haviam sido isoladas de uma comunidade do solo, a interação destas bactérias foi avaliada por meio da detecção por PCR de amplicons específicos em uma mistura de solo estéril inoculada. Amplicons de *B. multivorans* foram detectados por todo o período do ensaio, sendo que para *B. pseudomallei*, amplicons específicos foram observados apenas até o vigésimo dia, não sendo mais detectado após 30 dias. Ensaio prévios demonstraram que todos os isolados sobreviveram por mais de 100 dias quando inoculados sozinhos, demonstrando que a não detecção de *B. pseudomallei* ocorreu em consequência da supressão devido a uma interação negativa com os isolados de *B. multivorans*.

Outro estudo desenvolvido por Marshall et al. (2010), também avaliando o antagonismo contra *B. pseudomallei*, demonstrou que algumas linhagens de *Burkholderia* foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* deste patógeno, possivelmente pela produção de bacteriocinas, sendo que, para *B. ubonensis* essa inibição ocorreu por moléculas com espectro restrito de atividade, e para *B. thailandensis* essa inibição ocorreu para menos de 20% dos isolados de *B. pseudomallei* avaliados, no entanto, sua atividade foi de amplo espectro quando avaliado contra outros gêneros bacterianos. Esses exemplos demonstram que diferentes mecanismos podem estar envolvidos nas interações antagônicas entre espécies de *Burkholderia*.

2.2 MECANISMOS GERAIS ENVOLVIDOS NO ANTAGONISMO MICROBIANO E CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico pode ocorrer de maneira direta, quando o antagonismo envolve o binômio antagonista-patógeno, ou indiretamente, quando envolve o trinômio patógeno-planta-antagonista por meio de indução de resistência (DUFFY; KEEL; DÉFAGO, 2004). Em todos os casos, essas interações são complexas e relativamente pouco estudadas, e podem ainda ocorrer simultaneamente.

De acordo com Romero (2007) o antagonismo direto pode envolver diferentes mecanismos, como: (1) a **produção de substâncias antimicrobianas**, incluindo os antifúngicos, antibióticos e as bacteriocinas, sendo o mecanismo universal e que aparece com grande frequência, embora não necessariamente o único e mais importante; (2) a **competição por nutrientes**, a forma mais básica e universal de antagonismo, uma vez que nem sempre estes estão disponíveis em quantidades abundantes, dando vantagem para aqueles organismos fisiologicamente mais versáteis; (3) **competição por nichos ecológicos**, que ocorre para organismos que ocupam os mesmos nichos preferenciais, sendo que um deles possui a habilidade de se proliferar com mais rapidez; (4) **produção de compostos antimicrobianos voláteis**, substâncias capazes de inibir o crescimento ou a multiplicação de outros micro-organismos, incluindo alcoóis, aldeídos, cetonas, sulfetos, entre outros; (5) **detoxificação**, quando há a degradação de substâncias tóxicas produzidas pelo patógeno, por exemplo, como um mecanismo de antagonismo ou de escape deste; (6) **hiperparasitismo**, este mecanismo se relaciona aos bacteriófagos, vírus que infectam bactérias e podem levar a morte da célula bacteriana por colapso após a geração de fagos-filhos; (7) **predação e parasitismo**, mecanismo que ocorre para os actinomicetos, que podem parasitar hifas de fungos, e a medida que se proliferam podem causar o colapso do citoplasma de células e de oósporos do hospedeiro; (8) **produção de enzimas líticas**, incluindo quitinases, β -1,3-glucanases, celulases, lipases e proteases, são enzimas que destroem hifas e propágulos, produzidas por bactérias no antagonismo a fungos; (9) **produção de toxinas**, envolve a competição de patógenos através da produção de toxinas e/ou degradação dos mesmos; (10) **silenciamento gênico do competidor**, mecanismo descrito recentemente graças aos progressos da genômica e proteômica, envolve substâncias químicas que podem

modular ou bloquear a síntese de agentes antimicrobianos ou enzimas, através do silenciamento gênico; (11) **interferência no fenômeno *quorum sensing***, entre elas estão as acil-homoserina lactonas (AHLs), moléculas sinalizadoras produzidas pelas bactérias que modulam a expressão de genes dependente da densidade celular no meio. As AHLs podem coordenar a transcrição de genes de virulência no momento certo, garantindo o sucesso na colonização e virulência do patógeno. Assim, um mecanismo de antagonismo pode ser a capacidade de outros micro-organismos em degradar essas AHLs; (12) **produção de sideróforos**, importante molécula para quelação ou sequestro de ferro, e também ajuda no seu transporte para dentro da célula. O ferro é um mineral muito importante tanto para as plantas como para os micro-organismos uma vez que é constituinte dos citocromos e outros grupos heme e não-hemeproteínas, além de cofator de diferentes enzimas. Embora este mineral seja relativamente abundante na natureza, apresenta baixa biodisponibilidade, podendo ser um fator limitante para o crescimento e multiplicação de micro-organismos; (13) **produção de ácido cianídrico**, específica para alguns micro-organismos que a produzem, este ácido é um potente inibidor da citocromo-oxidase, possuindo um espectro de atividade amplo contra a maioria dos micro-organismos, a não ser que o mesmo disponha de mecanismos que inativem ou inibam a sua síntese.

Além dos mecanismos diretos de controle biológico, existem os mecanismos indiretos. Certas bactérias são capazes de disparar um fenômeno de resistência na planta através da sua indução após exposição a elicitores, sejam eles abióticos ou bióticos, de forma que ocorre uma resposta imediata dos tecidos, que reagem mais eficientemente às tentativas de colonização pelo patógeno. Este tipo de controle biológico é o que envolve mecanismos indiretos, pois é mediada também pelo hospedeiro. Tal fenômeno pode ser dividido em duas categorias distintas, que apesar de apresentarem um resultado fenotípico semelhante, são induzidos, desencadeados e governados por mecanismos bioquímicos diferentes. A primeira, a **SAR (Sistemic Acquired Resistance)** desenvolve-se quando a planta ativa com sucesso o mecanismo de resposta à infecção primária por um patógeno. Uma reação hipersensitiva (HR) limita a lesão necrótica, descartando apenas o tecido afetado, e está associada à produção de proteínas (PR) relacionadas à patogênese, mediada por um processo que requer o acúmulo de ácido salicílico na planta. Diferentemente, na **ISR (Induced Sistemic Resistance)** não ocorre o acúmulo de PRPs, sendo mediada por uma rota de sinalização

jasmonato/etileno, sem a ocorrência de alterações visíveis na planta. Esta última é induzida por não-patógenos, e a amplitude da indução é geralmente generalizada (ROMEIRO, 2007; ZELLER, 2006).

2.2.1 Estudo de genes envolvidos em mecanismos de controle biológico de fitopatógenos

A crescente preocupação com o meio ambiente tem elevado a importância das pesquisas científicas que visam diminuir a agressão constante que o ecossistema vem sofrendo com intervenções antrópicas, combinado ao elevado custo dos defensivos agrícolas e seleção de resistência em patógenos, de forma que, o número de pesquisas envolvendo micro-organismos capazes de promover o controle biológico de pragas e doenças agrícolas tem aumentado (DESTÉFANO, 2003). Apesar desta perspectiva de aumento, em muitos casos em que a dificuldade de se introduzir e/ou manter estes micro-organismos no ambiente de forma a realizar um controle biológico eficaz, tem limitado sua adoção. Contudo, com o progresso atual no campo da engenharia genética de micro-organismos e plantas, surgem alternativas concretas para viabilizar sua eficácia, com a possibilidade de obtenção e uso de micro-organismos recombinantes e também de plantas transgênicas, contendo traços de micro-organismos capazes de realizar o controle biológico. Frente a isso, pesquisas com foco na prospecção de genes de micro-organismos com interesse biotecnológico tem se expandido nos últimos anos, estando disponíveis diferentes estudos sobre o assunto.

Uma estratégia recentemente utilizada é a geração de biblioteca de mutantes aleatórios pelo uso de transposons. Esta estratégia permite o estudo de diversos processos fisiológicos, uma vez que inserido em uma região, é possível determinar, de forma relativamente fácil, as sequências de nucleotídeos de regiões adjacentes, identificando os genes e possíveis vias e características fenotípicas associadas ao gene mutado (PAJUNEN et al., 2005).

Bibliotecas de mutantes geradas por transposons e a análise de clones têm sido ferramentas muito utilizadas para o estudo de genes envolvidos na virulência de bactérias patogênicas (ERIKSSON et al., 1998; STASKAWICZ, 2001; TUNG; KUO, 1999), de genes envolvidos na biossíntese de moléculas de interesse biotecnológico ou genes de

importância na adaptação de micro-organismos a condições diversas (GEORGAKOPOULOS et al., 1994).

Seguindo o mesmo raciocínio, na busca por novos compostos bioativos contra fitopatógenos derivados de micro-organismos e a importância de estudos de forma mais aprofundada sobre um aspecto genômico e metabolômico, além da sua aplicação prática, trabalhos anteriores, tem resultado na seleção de mutantes defectivos no controle de bactérias e fungos patogênicos. O sequenciamento das regiões flangeadoras nocauteadas desses mutantes derivados de uma biblioteca de *B. seminalis* TC3.4.2R3 de inserção aleatória do transposon Tn5, com características de interesse ao estudo dos mecanismos de antagonismo microbiano e controle biológico, revelaram similaridade a genes que podem estar envolvidos em respostas de defesa em plantas, mas com função ainda desconhecida no gênero, além de genes que podem estar envolvidos na interação entre micro-organismos ou em vias de síntese e liberação de bioprodutos de interesse biotecnológico, a exemplo da glicosil e metiltransferases, glutamato sintase, bomba de efluxo de drogas, transportadores, reguladores transcricionais, polihidroalcanoato depolimerase intracelular, redutases e outras proteínas hipotéticas (MANO, 2011; NEVES, 2011; SANTOS, 2010).

Assim, até o presente trabalho, a obtenção de 12 mutantes defectivos no controle da necrose por *B. gladioli* em fragmentos foliares de *Oncidium* Alowa Iwanaga, forneceu uma oportunidade para um estudo mais aprofundado da interação patógeno e agente de biocontrole, e as vias afetadas no genoma, que podem contribuir para o controle biológico quando íntegras, auxiliando assim na elucidação de quais mecanismos que podem estar envolvidos no controle (MANO, 2011). A análise mais aprofundada a respeito do mutante M01, que teve a inserção do transposon Tn5 em uma região intergênica entre um gene da patatina e uma proteína hipotética com um domínio conservado da família das ferritinas, foi focada neste estudo.

Estas moléculas podem representar um alvo potencial para uma aplicação biotecnológica, desta forma, com um maior conhecimento sobre suas propriedades, podem contribuir para o desenvolvimento de produtos aplicáveis, com uso de tecnologias apropriadas, para a geração de formulações agrícolas, geração de micro-organismos recombinantes, plantas geneticamente modificadas, entre outras aplicações, além da contribuição para o conhecimento sobre os complexos mecanismos envolvidos no controle biológico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os mecanismos genéticos envolvidos no controle biológico da necrose causada por *B. gladioli* ORQF-04F em *Oncidium* Alowa Iwanaga por *B. seminalis* TC3.4.2R3.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antagônico *in vitro* e *in vivo* de *B. seminalis* TC3.4.2R3 sobre *B. gladioli* ORQF-04F.
- Avaliar a resposta fisiológica da planta hospedeira *Oncidium* Alowa Iwanaga na interação com *B. seminalis* e o patógeno *B. gladioli*.
- Sequenciar, montar e anotar o genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3.
- Compreender a dinâmica de colonização da linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 defeitivo no controle da necrose em *Oncidium* Alowa Iwanaga.
- Caracterizar as regiões flanqueadoras da inserção do transposon Tn5 no mutante M01, em uma região intergênica ao gene putativo da patatina e uma proteína hipotética com domínio conservado da família das ferritinas, defeitivo no controle da necrose de *B. gladioli*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Burkholderia* CAPAZES DE CONTROLAR A NECROSE CAUSADA POR *B. gladioli* EM *Oncidium* ALOWA IWANAGA

4.1.1 Isolamento e identificação do patógeno *B. gladioli* ORQF-04F

A linhagem de *B. gladioli* ORQF-04F foi isolada previamente (MINAMI, 2006) a partir de um isolamento de lesões em amostras de folhas e bulbos de *Oncidium* Alowa Iwanaga de diferentes plantas sintomáticas. Para tal, foi feita a desinfecção superficial das folhas por tratamento em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2% cloro ativo por 1 minuto, álcool 70% por 1 minuto e duas lavagens sucessivas em hipoclorito de sódio. Os fragmentos estéreis superficialmente foram incubados a 28 °C em meio triptonado TSA 5% suplementado com o fungicida Benomyl [50 µg.ml⁻¹] a 28 °C. A confirmação da patogênese do isolado foi feita através do modelo de Takatsu et al. (1981), com a inoculação do isolado em pimentões através de um orifício feito através de uma ponteira estéril, dispostos em câmara úmida e incubados a 28 °C por até 3 dias.

A confirmação da identidade foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Para isso, a PCR foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer P027 (forward) e R1387 (reverse), 3.7 mM MgCl₂, 0.4U de Taq Polimerase. A reação foi mantida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 96 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento a 61,5 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C durante 45 segundos, seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. O produto da amplificação foi submetido ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. A identificação foi realizada por meio da ferramenta BLASTn no site do NCBI (National Center Biotechnology Information), contra a base de dados do GenBank, e o agrupamento para construção da árvore filogenética baseada na sequência do 16S rDNA foi calculado de acordo com o método de Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com base nas

matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor (1969). A sequência consenso do gene parcial do 16S rRNA foi submetido ao banco de dados do GeneBank com o número KP735965. Paralelamente a identificação molecular, foi realizada a caracterização bioquímica da linhagem pelo sistema API (BioMérieux Clinical Diagnostics, Marcy-l'Étoile, FRA), onde foi avaliada a capacidade de metabolização do citrato de sódio, D-glicose e L-arabinose e reação de oxidase através do reagente N,N,N',N' tetrametil-p-fenilediadimina diclorido instantâneo (GORDON; McLEOD, 1928).

4.1.2 Caracterização da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 capaz de controlar a necrose em *Oncidium* Alowa Iwanaga por *B. gladioli* ORQF-04F

A seleção de linhagens de *Burkholderia* capazes de controlar a necrose de *B. gladioli* em *Oncidium* Alowa Iwanaga foi realizada utilizando isolados de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). As bactérias foram isoladas por Marcon (2007) e Rossetto (2008) durante o desenvolvimento do projeto: “Interação entre populações microbianas e Plantas Geneticamente Modificadas”. (Processo FAPESP 02/14143-3), coordenado pelo Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo. Estes isolados foram previamente caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (MENDES et al., 2008) e por (LUVIZOTO et al., 2010). Foram avaliados 34 isolados de *Burkholderia*, endofíticos de raiz e isolados da rizosfera de cana-de-açúcar, quanto a sua capacidade em inibir os sintomas da necrose causada por *B. gladioli* ORQF-04F em fragmentos foliares mantidos em câmara úmida, e *in vivo*, em folhas de plantas adultas de *Oncidium* Alowa Iwanaga, através de um mix das duas culturas (5×10^8 UFC ml⁻¹) inoculado em ferimento nas folhas da planta hospedeira obtido com ponteira estéril. Após a triagem inicial, foram selecionados 25 isolados que apresentaram capacidade de inibir a necrose de *Oncidium*. Destes, foi selecionado o isolado *B. seminalis* TC3.4.2R3, um isolado endofítico de raiz, que controlou satisfatoriamente os sintomas da doença tanto em fragmentos foliares como na planta (MANO, 2011).

Na tentativa de caracterizar a linhagem de *B. seminalis* TC3.4.2R3, pré-identificado como *Burkholderia cenocepacia/cepacia* apenas pela análise do gene 16S rRNA e recA, o DNA genômico de linhagem TC3.4.2R3 foi submetida a análise filogenética de multilocos (MLSA – Multilocus Sequence Analysis) com amplificação e

sequenciamento dos genes *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e *trpB*, de várias espécies de *Burkholderia*. O agrupamento para construção da árvore filogenética baseada nos multilocos foi calculado de acordo com o método de Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor (1969).

Paralelamente a identificação molecular, foi realizada a caracterização bioquímica da linhagem pelo sistema API® (BioMérieux Clinical Diagnostics, Marcy-l'Étoile, FRA), onde foi avaliada a capacidade de metabolização da L-lisina e L-ornitina, e reação de oxidase através do reagente N,N,N',N' tetrametil-p-fenilediadinina diclorido instantâneo (GORDON; McLEOD, 1928). Também foi realizado o teste de diferenciação de *Burkholderia* para *Pseudomonas aeruginosa*, pela inibição da produção de piocianina e produção de pioverdina em meio King B (KING et al., 1954).

4.2 ESPECTRO DE HOSPEDEIROS AO PATÓGENO *B. gladioli* ORQF-04F E O CONTROLE POR *B. seminalis* TC3.4.2R3

Com a finalidade de avaliar a especificidade do patógeno *B. gladioli* ORQF04F e o espectro de ação de biocontrole de *B. seminalis* TC3.4.2R3, a interação entre as duas linhagens foi avaliada em diferentes espécies e variedades de orquídeas.

Foram avaliadas nove espécies de orquídeas (Tabela 01), adquiridas comercialmente no orquidário Colibri Orquídeas (São Lourenço da Serra, São Paulo, Brasil) e a Green Plugs Mudas de Flores e Plantas (Mogi das Cruzes, São Paulo - Brasil).

Dentre estas espécies foram avaliadas 7 espécies pertencentes à família Orchidaceae, incluindo *Cymbidium cricket*, *Cattleya forbesii*, *Brasilela purpurata russeliana*, *Dendrobium lodiagesii*, *Phalaenopsis* híbrida branca, *Miltonia spectabilis*, *Brassia* e duas variedades de *Oncidium*, a *Oncidium Sharry Baby Sweet Fragance* e *Oncidium Alowa Iwanaga* (Figura 01), sendo estas de grande apreciação e importância econômica na área de plantas ornamentais.

Tabela 01 - Espécies e variedades de orquídeas avaliadas para os ensaios de espectro de atividade de *B. gladioli* ORQF-04F e *B. seminalis* TC3.4.2R3.

Espécie	Estágio
<i>Oncidium</i> Alowa Iwanaga	Plântula-Jovem
<i>Cymbidium</i> cricket	Jovem-adulto
<i>Cattleya</i> forbesii	Jovem-adulto
<i>Brasilela</i> purpurata russeliana	Jovem-adulto
<i>Dendrobium</i> lodigesii	Jovem
<i>Phalaenopsis</i> híbrida branca	Jovem
<i>Miltonia</i> spectabilis	Jovem
<i>Brassia</i>	Jovem
<i>Oncidium</i> Sharry Baby Sweet Fragrance	Jovem

Os isolados de *B. gladioli* ORQF-04F e *B. seminalis* TC3.4.2R3 foram crescidos em 5 ml de caldo TSB 5% a 28 °C por 24 horas e 5 µl da cultura bacteriana diluída em tampão fosfatado (PBS – phosphate buffer solution) (5×10^8 UFC ml⁻¹) foram inoculados em folhas perfuradas com uma ponteira estéril. Após inoculação, as plantas foram mantidas em temperatura ambiente e irrigadas periodicamente. O ensaio foi montado em triplicata, onde foram avaliados 4 tratamentos, sendo eles: (a) *B. gladioli* ORQF-04F, (b) Tampão fosfatado PBS, utilizado para diluição dos inóculos (c) *B. seminalis* TC3.4.2R3, (d) mix de *B. gladioli* ORQF-04F com *B. seminalis* TC3.4.2R3.

Figura 01 - Espécies da família Orchidaceae: (A) *Oncidium Aloha Iwanaga*, (B) *Cymbidium cricket*, (C) *Cattleya forbesii*, (D) *Brasilelia purpurata russeliana*, (E) *Dendrobium lodigesii*, (F) *Phalaenopsis* híbrida branca, (G) *Miltonia spectabilis*, (H) *Brassia* e (I) *Oncidium Sharry Baby Sweet Fragance*. Fonte: Colibri Orquídeas (<http://www.colibriorquideas.com/lista.php>).

4.3 INTERAÇÃO ENTRE *B. gladioli* ORQF-04F E *B. seminalis* TC3.4.2R3 EM *Oncidium* ALOWA IWANAGA

A fim de compreender melhor o mecanismo de *B. seminalis* TC3.42R3 envolvidos no controle da necrose de *Oncidium Aloha Iwanaga* causada por *B. gladioli*, as bactérias foram também inoculadas a 1 cm de distância e em momentos diferentes. Todos os

isolados foram crescidos em 5 ml de caldo triptonado TSB 5% a 28 °C por 24 horas e 5 µl da cultura bacteriana diluída (5×10^8 UFC ml⁻¹) foram inoculados nas folhas perfurados com uma ponteira estéril. Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida a temperatura ambiente. O ensaio foi montado em triplicata, onde foram avaliados 5 tratamentos, sendo eles: (a) *B. gladioli*, (b) *B. gladioli* inoculado a 1 cm de distância da inoculação prévia em um 1 dia de *B. seminalis* TC3.4.2R3; (c) mix de *B. gladioli* com *B. seminalis* TC3.4.2R3 inoculadas simultaneamente, (d) *B. seminalis* TC3.4.2R3 e (e) Tampão de diluição PBS.

Para avaliar se mesmo após seis dias de inoculação prévia, a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 era capaz de inibir os sintomas da necrose, uma suspensão bacteriana em tampão PBS (5×10^8 UFC ml⁻¹) foi inoculada por infiltração utilizando uma seringa equipada com uma agulha 0,33 mm até preencher um diâmetro aproximado de 3 cm. Após 6 dias, uma suspensão bacteriana de *B. gladioli* em tampão PBS (5×10^8 UFC ml⁻¹) foi inoculada também por infiltração utilizando uma seringa equipada com uma agulha 0,33 mm, no ponto médio entre o ponto de inoculação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e a margem de infiltração da mesma.

4.4 GENOMA DE *B. seminalis* TC3.4.2R3 E PROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA NECROSE

4.4.1 Sequenciamento do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3

De forma a auxiliar a identificação e o mapeamento dos genes associados a fenótipos dos mutantes derivados da biblioteca de inserção aleatória do transposon Tn5 no genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3, defectivos no controle da necrose, foi submetido ao seqüenciamento de nova geração através da plataforma 454 GS FLX Titanium Roche (Roche Diagnostics Corporation, Basel, SWI).

4.4.1.1 Pulse-Field Gel Electrophoresis (Gel de Eletroforese de Campo Pulsado) do DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3

Paralelamente ao sequenciamento de nova geração, foi realizado o pulse Field do DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3, em colaboração da doutoranda Aline Aparecida Camargo das Neves, do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo), para visualização dos cromossomos e estimativa do tamanho do genoma, para auxiliar na determinação da cobertura necessária do sequenciamento.

4.4.1.1.1 Preparo dos blocos (plugs) de DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3

O preparo dos blocos (plugs) de agarose com o DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foram preparados de acordo com Kieser et al. (1992). Para isso, 30 ml de cultura bacteriana de *B. seminalis* TC3.4.2R3 incubado a 18 °C em meio TSB 10%, sob agitação, overnight, foi centrifugado a 3600 RFC (g) por 20 minutos. O pellet bacteriano foi ressuspensionado em 25 ml de TE 25- sucrose e novamente centrifugado. O pellet foi então novamente ressuspensionado em TE 25-sucrose a uma OD₆₀₀ entre 1.9 a 2.0 (9×10^9 UFC ml⁻¹) e 500 µl desta suspensão bacteriana foram misturados a 1,5 ml de gel LMP (low melting pointing) a 50 °C, e moldado por 10 minutos a 4 °C. Os *plugs* obtidos foram tratados com lisozima [20 ng.ml⁻¹] por 2 horas a 37 °C. Posteriormente, a lisozima foi removida e foi adicionada aos *plugs* uma solução de proteinase K 0,05% em NDS, incubado por 12 a 24 horas a 50 °C. A proteinase K foi então removida por lavagens dos blocos com TE + 0,1 mM de PMFS (phenylmethanesulphonyl fluoride) por 1 hora, no mínimo três lavagens.

4.4.1.1.2 Digestão do bloco (plugs) com enzima de restrição

Os *plugs* de DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foram digeridos com a enzima MssI (PmeI) (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Primeiramente, o *plug* foi incubado na solução tampão universal Tango 1 x, por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após o período de incubação, apenas o plug foi transferido para

outro tubo com 20U da enzima de restrição, 40 µl de tampão da enzima 1x, completada para 400 µl com água ultra-pura (Milli-Q) e incubada a 37 °C por 18 horas.

4.4.1.1.3 Corrida de eletroferese de campo pulsado do DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 digeridos

Os plugs de DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 íntegro e digerido com a enzima MssI (PmeI) foram aplicados em gel LMP (low melting pointing) 1,0%, a uma voltagem de 6V.cm⁻¹, com pulsos variando de 50 a 90 segundos (grau de angulação de 120%), em TBE 0,5 x, no sistema CHEF –DR III Pulse Field Electrophoresis Systems (BioRad, Hercules, California, USA).

4.4.1.2 Sequenciamento de nova geração 454 GS FLX Titanium

O DNA genômico para sequenciamento foi extraído da cultura pura de *B. seminalis* TC3.4.2R3 através do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e a integridade do mesmo verificada em gel de agarose 1%. Ao mínimo, 5 µg de DNA genômico íntegro de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi enviado em solução Buffer EB para a empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Simplificadamente, o fluxo de trabalho do sistema Genome Sequencer FLX Titanium se resume em cinco etapas. (1) Na primeira etapa o DNA é fracionado em fragmentos de 300 a 800 pares de bases por meio de nebulização; (2) na segunda etapa é feita então a preparação da biblioteca com a ligação aos adaptadores as extremidades 3' e 5' dos fragmentos; (3) cada fragmento de DNA ligado a um adaptador é imobilizado em um bead, que são como reatores individuais; (4) na quarta etapa, ocorre o PCR em emulsão, onde cada fragmento ligado a um bead é amplificado; (5) por fim, cada bead é carregado em uma placa PicoTiter onde é realizado o sequenciamento, de cada bead individualmente. Após todo esse processo, a placa PicoTiter é então carregada no aparelho GS FLX e a leitura é feita por sinais de quimioluminescência, produzidos pela conversão do pirofosfato em ATP pela ATP luciferase, onde este ATP é utilizado pela

luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal que é então registrado em uma câmera CCD (charged-coupled-device) acoplada ao equipamento (CARVALHO; SILVA, 2010).

4.4.1.2.1 Montagem genômica de *B. seminalis* TC3.4.2R3

A montagem inicial do genoma foi realizada por meio da plataforma gsAssembler (montagem *de novo*) e gsMapper (montagem ancorada a um genoma de referência) do programa Newbler v. 2.3, fornecido pela Roche 454. Posteriormente, as leituras do seqüenciamento foram reanalisadas em parceria do Prof. Dr. Jeff H. Chang, do Departamento de Botânica e Patologia de Plantas, da Oregon State University, Cordley, Corvallis. A estratégia de montagem utilizada combinou os softwares Velvet e Mira. Os scaffolds foram obtidos por curadoria e a extensão dos *contigs* foram realizadas com os softwares SeqManN GeneSeqMan (<http://www.dnastar.com/>). Os *contigs* não-extendidos foram mapeados utilizando Workbench CLC Genomics (CLC bio, Inc.) para montagem *de novo* e maior extensão.

4.4.1.2.2 Análise de qualidade das sequências

Para avaliar a qualidade das sequências, foi utilizado o programa CONSED (<http://www.phrap.org>). Esta ferramenta foi utilizada para edição e visualização da anotação genômica e correção dos erros oriundos do sequenciamento baseado na qualidade de cada base, o que permitiu a visualização do valor de PHRED de cada base, a cobertura da região em número de leituras, bem como a averiguação da qualidade de região inteira do genoma. Desse modo, o CONSED permitiu a remoção ou inserção, quando necessária, de bases ou regiões que apresentaram um valor PHRED não confiável.

4.4.1.2.3 Anotação genômica de *B. seminalis* TC3.4.2R3

Após a obtenção da sequência consenso representativa do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3, foi realizado a predição dos prováveis genes presentes no genoma, que aliada à curadoria e manual representam alguns dos principais passos na anotação de um genoma. Desta forma, foram incorporadas todas as informações gênicas correspondentes ao genoma utilizando-se a plataforma Prokka v. 1.5.2. (<http://www.vicbioinformatics.com>) (SEEMANN, 2014), especialmente desenhada para bactérias, arqueas e vírus. O pipeline do Prokka inclui a busca de dados no ARAGORN (predição de genes tRNA e tmRNA) (LASLETT; CANBACK, 2003), RNAmmer (predição de genes rRNA que utiliza o modelo: Hidden Markov Models – HMM (LAGESEN et al., 2007); Prodigal (predição de proteínas-codificadoras – CDS) (HYATT et al., 2010); SignalP (predição de peptídeos sinais in CDS) (PETERSEN et al., 2011); BLAST+ (busca similaridade contra uma biblioteca de sequências de proteínas) (CAMACHO et al., 2009); e o HMMER3 (busca similaridade contra perfis de famílias protéicas e famílias de proteínas ncRNA) (EDDY, 2011). O processo de anotação também foi realizado em colaboração do Prof. Dr. Jeff H. Chang, da Oregon State University, Cordley, Corvallis.

4.4.2 Estudo do contexto gênico *in silico* do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina

Buscando entender qual o possível mecanismo central do controle da necrose por *B. seminalis* TC3.4.2R3, foi avaliado *in silico*, a região onde, para o mutante M01 tn5:patatina-ferritina, o transposon Tn5 foi inserido. Este mutante perdeu a habilidade de controlar necrose causada por *B. gladioli* em fragmentos foliares de *Oncidium Alowa Iwanaga*. A anotação dos genes foi editada no programa Artemis Release v. 14.0.0 e no Geneious v. 7.1.7, e a estrutura e função de genes e proteínas analisadas inicialmente com as ferramentas disponíveis no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), do Softberry (www.softberry.com), entre outros.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE M01 TN5:PATATINA-FERRITINA DEFECTIVO NO CONTROLE DA NECROSE em *Oncidium ALOWA IWANAGA* POR *B. gladioli* ORQF-04F

4.5.1 Curva de crescimento do isolado selvagem e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina de *B. seminalis* TC3.4.2R3

A linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e o mutante M01 defectivo para o controle da necrose causada por *B. gladioli*, foram crescidas por 18 horas em uma pré-cultura de 5 ml de caldo TSB 10%, para determinação da curva de crescimento. Esta pré-cultura foi adicionada novamente a 10 ml de caldo TSB 10%, onde todas as culturas foram estabelecidas inicialmente a uma densidade ótica igual a OD₆₀₀ 0.04 (8×10^6 UFC ml⁻¹), sendo considerada a leitura de 0 horas. As culturas foram incubadas sob agitação a 210 RFC (g) e 28 °C. Amostras de 1 ml foram retiradas para leitura em espectrofotômetro após 6, 12, 24, 18, 24 e 30 horas. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro UV-visível Ultrospec 2100pro (Amersham Biosciences, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), a um comprimento de onda de 600nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para cada isolado em cada tempo de leitura.

A curva padrão para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC ml⁻¹) foi feita por diluição seriada cultura da linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, com sete pontos de leitura, semeadas em meio TSA 10% nas menores diluições que possibilitassem a contagem de células viáveis. Os dados de crescimento bacteriano foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste de t-Student a 5% de probabilidade no software PAST v. 2.17c.

4.5.2 Colonização do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina em tecidos de *Oncidium Alowa* Iwanaga

Com o intuito de avaliar a colonização de *Oncidium Alowa* Iwanaga por *B. seminalis* TC3.4.2R3 e o mutante M01 gerado pela inserção aleatória do Tn5 que foi defectivo no controle da necrose da orquídea, foi feita a inoculação de uma suspensão bacteriana de cada linhagem e o reisolamento após 6 e 12 dias. O reisolamento foi realizado a partir de três secções da folha e uma secção única do pseudobulbo da planta. O experimento foi delineado com quatro plantas para cada tratamento (plantas

inoculadas com cada linhagem) e os controle 1 (plantas inoculadas apenas com PBS) e controle 2 (plantas sem inóculo).

Para o inóculo, culturas com 24 horas foram centrifugadas e ressuspensas em Tampão PBS. Cinco μl de diluições com $\text{DO}_{600} = 1.0$ (aproximadamente $2 \times 10^9 \text{ UFC ml}^{-1}$) foram inoculadas na base da folha, próximo à inserção com o pseudobulbo, por meio de um ferimento gerado com uma ponteira estéril. As plantas foram mantidas a temperatura ambiente (temperatura entre 23°C – 28°C) com regas apenas quando necessário. Após o período de colonização determinado (6 e 12 dias) as plantas foram desinfetadas superficialmente (imersão em etanol 70% por 30 segundos, cloro 2% por 10 segundos, etanol 70% por 30 segundos, e duas lavagens sucessivas em água destilada autoclavada). As folhas foram fracionadas em três segmentos de 2 cm, designados de F1 (0-2 cm), F2 (2-4 cm) e F3 (4-6 cm), e uma secção do pseudobulbo (B) de 1 cm (Figura 02).

Cada fragmento teve seu peso anotado para normalização posterior, e foram macerados em 500 μl de tampão PBS com auxílio de um micropistilo. O macerado foi mantido por 1 hora em temperatura ambiente, no intuito de permitir a migração de bactérias de dentro dos tecidos para o tampão. Após o repouso, suspensões puras e diluídas foram semeadas sobre meio TSA 10%, incubadas a 28°C , por pelo menos 24 horas. Os dados de isolamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste de t-Student a 5% de probabilidade no software PAST v. 2.17c.

Figura 02 - Segmentos demarcados em *Oncidium* Alowa Iwanaga para determinação da densidade de colonização de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e mutantes Tn5.

4.5.3 Determinação da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina por qPCR na interação com *B. gladioli* ORQF-04F

Para avaliar a densidade de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 do mutante M01 resultante da inserção do transposon Tn5 na região intergênica entre o gene da patatina e ferritina, em tecido de *Oncidium* Alowa Iwanaga e em co-cultura, na interação com o patógeno *B. gladioli* ORQF-04F, foi realizado um ensaio de qPCR (quantitative PCR) com o DNA extraído de fragmentos foliares inoculados e co-cultura, utilizando primers específicos para *B. seminalis* TC3.4.2R3.

4.5.3.1 Desenvolvimento de primers para detecção de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F por qPCR

Inicialmente foi sintetizado e testado um conjunto de sete primers (Tabela 02) a fim de se avaliar a densidade da linhagem de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 patatina-ferritina em tecidos de *Oncidium* Alowa Iwanaga e co-cultura, em interação com

B. gladioli ORQF-04F. Os primers foram desenhados a partir do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com auxílio do Software Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (UNTERGASSER et al., 2012).

Tabela 02 - Primers de *B. seminalis* TC3.4.2R3 para ensaio de quantificação absoluta por qPCR.

Primer	Sequência	Locus	Gene alvo (tamanho produto PCR)
fadF/fadR	5'-TTCGAAGTACCCGATTCTCG-3'/5'- TGGTTGTTGTGCAGCTCTTC-3'	Bsem_01991	ácido graxo desaturase (236pb)
pioF/pioR	5'-GTGGTCGTACGTGATGCTTG-3'/5'- GGACTGCAAACCAACTGGA-3'	Bsem_00076	placa basal de fago putativa piocina (228pb)
phaF/phaR	5'-CGCATTGGGATTCTACCAG-3'/5'- CGTCCTTGACGATCTGATGA-3'	Bsem_01821	polihidroxialcanoato depolimerase intracelular (652pb)
lipF/lipR	5'-GCCCCATCTGGAGACTGAT-3'/ 5'-GGATTCGCGTCAGCAATG-3'	Bsem_00188	Lipase GDLS (188pb)
tiolF/tiolR	5'-TACATCGGCGGATCGTAGTT-3'/5'- GACCTGAAGGGCAAGGTCTA-3'	Bsem_02348	tiol dissulfido oxidoreductase (155pb)
antd15F/antd15R	5'-TGTGTTGTACGGGAACGTCG-3'/5'- AAGATCGTCACGAACGTCAG-3'	Bsem_01919	antígeno D15 de superfície (150pb)
burkrecNF/burkrecNR	5'-AATGGGACGAAGTCAGCAAC-3'/5'- GACAGCGAATAGACGGCTTC-3'	Bsem_02987	recombinase N (235pb)

Para o monitoramento de *B. gladioli* ORQF-04F foram testados o par de primers gla-fw e gla-rv, para regiões específicas do gene *gyrB* de *B. gladioli*, o qual amplifica um fragmento de 478 pb (MAEDA et al., 2006), e primers internos (glaf1, glar1 e glaf2) a região do gene *gyrB*, desenhados com auxílio do software Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), testados *in silico* contra o genoma de *B. gladioli* BSR3 e *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Tabela 03). As análises *in silico* prévias demonstram que estes primers se anelam em regiões específicas presentes somente em *B. gladioli*, embora em condições menos sensíveis, como baixa temperatura, possa amplificar fragmentos em *B. glumae* e *B. plantarii*.

Tabela 03 - Primers sintetizados para monitoramento de *B. gladioli* ORQF-04F por qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')
Gla-fw	CTGCGCCTGGTGGTGAAG
Gla-rv	CCGTCCCGCTGCGGAATA
Glaf1	GGCACGGTCGAGTATCACTA
Glar1	ATCCTTCTCGCCGATGATGT
Glaf2	GTGCACTTCATGGCCGATC

Para o PCR convencional, foi utilizada a reação com volume final de 25 µl, contendo 1 µl do DNA template (DNA genômico de cultura pura de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F), 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas, Life Technologies, California, USA), 0,2 µM de cada dNTP, 0,1 µM de cada primer, 0,1U µl⁻¹ de Taq polimerase (Fermentas, Life Technologies, California, USA). Após a amplificação, os produtos de PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose (1%) e fotodocumentados.

4.5.3.2 Monitoramento da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 TN5:patatina-ferritina em folha e pseudobulbo de *Oncidium Alowa Iwanaga* por qPCR

Para monitorar a densidade da linhagem de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 em comparação ao mutante M01 patatina-ferritina, suspensões bacterianas de 5 µl em tampão PBS (aproximadamente 2 x 10⁹ UFC ml⁻¹), foram inoculados na base da folha de *Oncidium Alowa Iwanaga*, próximo à inserção da folha no bulbo, através de um orifício obtido da perfuração com uma ponteira estéril e mantidos em temperatura ambiente por 6 e 12 dias. Foram utilizados 4 tratamentos: (a) mutante M01 patatina-ferritina; (b) *B. seminalis* TC3.4.2R3; (c) mix das culturas de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F; (d) mix das culturas do mutante M01 com *B. gladioli* ORQF-04F, e (e) o controle, com plantas inoculadas apenas com o tampão PBS. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após o período de colonização, as plantas foram seccionadas na folha apenas para o segmento F1 (fragmento de 0-2 cm a partir da base de inoculação) e

no pseudobulbo B (fragmento de 1 cm a partir da base de inoculação), rapidamente congelados e macerados em nitrogênio líquido. Uma alíquota de 40 mg de tecido foi macerada e condicionada em microtubos, mantidos no freezer a -80 °C. Posteriormente o DNA total foi extraído com o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e utilizado em análise em qPCR.

A reação de amplificação por PCR em tempo real para quantificação absoluta foi realizada no aparelho Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) programado para uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Ao final dos ciclos, uma etapa adicional de dissociação foi realizada para geração de uma curva de melting, a qual permite verificar a especificidade dos primers. Cada reação foi realizada com um volume final de 25 µl, contendo de 2-6 µl do DNA template, 10 µM de cada primer e 12,5 µl de solução do kit SYBR Green qPCR Mix 2 x (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do software Real-Time System RQ Study v. 1.3.19 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Por meio deste software foi determinado o limiar de detecção (threshold), de cada amostra testada. Este limiar corresponde a um ponto de referência, uma vez que neste ponto todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o threshold, foi estabelecido o número de CT (do inglês threshold cycle) de cada amostra. O número de CT serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclos no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o threshold estabelecido.

Para determinar a quantificação absoluta de uma amostra desconhecida, uma curva padrão foi construída a partir da quantificação de diluições de um template de DNA de concentração conhecida, determinadas no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) amplificadas com o primer selecionado a partir do DNA da *B. seminalis* TC3.4.2R3 e de *B. gladioli* ORQF-04F. Para estimar a quantidade de células, conforme Sambrook & Russel (2001), foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\text{n}^\circ \text{ cópias} = \frac{\text{X g/}\mu\text{l DNA}}{\text{tamanho do clone em pb} \times 649} \times 6,022 \times 10^{23}$$

onde: **X g/μl DNA** é a concentração de uma dada amostra de DNA a ser determinada; **tamanho do clone em pb** representa o tamanho do genoma total do organismo, sendo para a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 aproximadamente **7.3 Mb**, e para o isolado *B. gladioli* ORQF-04F foi utilizado como referência o genoma de *B. gladioli* BSR3, com tamanho aproximado de **8.1 Mb**; **649** o peso molecular médio de um par de bases; e **6,022 x 10²³**, a constante de Avogrado, que corresponde ao número de entidades elementares (seja átomos, moléculas, íons, radicais, elétrons, fótons).

Os dados de monitoramento da densidade bacteriana nas plantas foram submetidos á análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste t-Student a 5% de probabilidade no software PAST v. 2.17c.

4.5.3.3 Determinação da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3, do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina e *B. gladioli* ORQF-04F na interação em co-cultura por qPCR

A fim de se avaliar se *B. seminalis* TC3.4.2R3 exerce algum efeito na densidade da população de *B. gladioli* ORQ-04F, foi avaliada a densidade bacteriana de co-culturas de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F, por meio de qPCR (PCR quantitativo) utilizando primers específicos para cada isolado. Da mesma forma, foi avaliada a densidade de *B. gladioli* em co-culturas com o mutante M01 patatina-ferritina. Como controle, culturas puras de cada isolado também foram monitoradas.

O ensaio de co-cultura foi delineado para interação entre células de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 patatina-ferritina com *B. gladioli* ORQF-04F. Para isso, foram avaliados os seguintes tratamentos: (a) 5 ml de caldo TSB 10% adicionado de uma mistura de 50 μl de cultura de *B. seminalis* com 50 μl de cultura de *B. gladioli*; (b) 5 ml de caldo TSB 10% adicionado da mistura de 50 μl de cultura do mutante M01 com 50 μl de cultura de *B. gladioli*; (c) 5 ml de caldo TSB 10% adicionado de 50 μl de cultura de *B. seminalis*; (d) 5 ml de caldo TSB 10% adicionado de 50 μl de cultura do mutante M01; e (e) 5 ml de caldo TSB 10% adicionado de 50 μl de cultura de *B. gladioli*. Todos os pré-

inóculos estavam a $OD_{600} = 1.0$ (aproximadamente 2×10^9 UFC ml⁻¹). O experimento foi realizado em triplicada, por 24 horas a 28 °C sob agitação.

Após 24 horas de incubação, o DNA total foi extraído com auxílio do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A reação de amplificação por qPCR também foi conduzida no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) sob as mesmas condições descritas anteriormente (item 4.6.3.2). Para realizar a quantificação absoluta de uma amostra desconhecida, uma curva padrão foi construída a partir da quantificação de amostras de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F com concentração conhecida, determinadas no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Os dados de monitoramento da densidade bacteriana nas co-culturas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no software BioEstat v. 5.0.

A atividade antagônica *in vitro* em meio de cultura sólido do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 para *B. gladioli* ORQF-04F foi avaliada utilizando o método de sobrecamada. O isolado de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi crescido em meio TSA 5%, em triplicata, em três repiques pontuais, e incubado por 24 horas, a 28 °C. Após as 24 horas incubadas, as placas foram cobertas em sua superfície com uma sobrecamada de aproximadamente 5 ml de meio semi-sólido fundente (0,8%), contendo 100 µl de cultura da bactéria *B. gladioli* a OD_{600} 0.4. As placas agora em sobrecamada foram novamente incubadas por 24-48 horas a 28 °C, e após a incubação, a efetividade da atividade antibacteriana foi confirmada pela formação de um halo claro de inibição ou não em torno da colônia de *B. seminalis* TC3.4.2R3.

4.5.4 Perfil fisiológico de *Oncidium Alowa Iwanaga* em resposta a interação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F

Como diversos mecanismos podem estar envolvidos no controle biológico, e podem também ocorrer simultaneamente, foram investigadas as alterações fisiológicas que ocorrem em *Oncidium Alowa Iwanaga* em consequência a inoculação de *B. gladioli* ORQF-04F e/ou *B. Seminalis* TC3.4.2R3 e o mutante M01 patatina-ferritina. Para isso, foi

realizada a determinação da liberação de etileno, a produção de peróxido de hidrogênio e a peroxidação lipídica em *Oncidium Alowa Iwanaga* após inoculação com *B. gladioli* ORQF-04F e *B. seminalis* TC3.4.2R3, e suas interações.

4.5.4.1 Determinação de etileno

A determinação da liberação de etileno foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, da Profa. Dra. Heloisa Ramos Barbosa, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com colaboração da Dra. Roberta Cristina Ruedas Martins. Os ensaios foram montados em triplicata para cada tempo de leitura: zero, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 dias, 7 dias. Foram avaliados 5 tratamentos: (a) *B. gladioli* ORQF04F, (b) *B. seminalis* TC3.4.2R3, (c) *B. gladioli* ORQF04F + *B. seminalis* TC3.4.2R3, (d) tampão de diluição PBS e (e) planta sem inoculação. As plantas foram inoculadas com 5 µl (5×10^8 UFC ml⁻¹) a partir de um fermento obtido com auxílio de uma ponteira esterilizada. As plantas foram acondicionadas dentro de tubos de vidro com uma pequena quantidade de musgo *Sphagnum* umedecido, e assim que a planta foi inoculada, o vidro foi fechado com uma tampa de borracha e lacre de metal (Figura 03), para permitir que os gases fossem acumulados em seu interior, para posterior dosagem. Os ensaios foram incubados em estufa de fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C.

Para determinação da liberação de etileno pelas plantas de *Oncidium Alowa Iwanaga*, foi testada quantitativamente injetando-se 1 ml da fase aérea em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), com coluna Porapak-N 80/100 – INOX a 70 °C, injetor a 180 °C e detector a 230 °C. As concentrações foram calculadas comparando os valores obtidos com uma curva padrão de etileno e aplicando a equação geral dos gases: $n = RT/PV$ onde n = número de moles de etileno, R = constantes dos gases = 0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹, T = temperatura em K, P = pressão em atm e V = volume da amostra em litros (Anexo A).

Figura 03 - Muda em estágio de plântula de *Oncidium* Alowa Iwanaga condicionado em vidro com tampa de borracha para retenção de gases produzidos pela planta.

4.5.4.2 Determinação de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi determinada para folhas de *Oncidium* Alowa Iwanaga inoculadas com os seguintes tratamentos: (a) apenas com o tampão fosfatado PBS; (b) com *B. seminalis* TC3.4.2R3; (c) com o mutante M01 patatina-ferritina; (d) apenas com o patógeno *B. gladioli* ORQF-04F; e para as interações (e) mix de culturas de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F e (f) mix de culturas do mutante M01 patatina-ferritina com *B. gladioli* ORQF-04F. As plantas foram inoculadas com $5 \mu\text{l}$ (5×10^8 UFC ml^{-1}) a partir de um orifício obtido com a perfuração utilizando uma ponteira estéril. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, mantidas em temperatura ambiente e avaliados após 3 e 20 horas. Após este período, as folhas foram rapidamente recortadas há um centímetro radial ao ponto de inoculação, pesadas, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C .

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). As amostras vegetais (100 mg) maceradas foram misturadas com 1ml de TCA 0,1%. Após a completa homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 9700 RFC (g) por 15 minutos, a 4°C . Do sobrenadante, foram retirados 200 μl aos quais foram

adicionados 200 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µl de solução de KI 1 M. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, foram adicionados 200 µl de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em banho de gelo e mantidos no escuro por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) a um comprimento de onda de 390 nm. A quantidade de H₂O₂ foi expressa em µmol/g de tecido fresco utilizando-se curva de calibração com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

Para a curva de calibração de H₂O₂ (Anexo B) foram utilizadas nove amostras do produto comercial (Synth, São Paulo, BR) de concentração conhecida diluída em água destilada, e uma amostra zero apenas com água, também submetidas à reação com iodeto e fosfato de potássio, e medidas no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 390 nm. Os resultados foram submetidos à análise de variância de comparações múltiplas pelo teste de Duncan, que compara as médias, onde as médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível nominal de 5% de significância (DUNCAN; DUNCAN, 1955), no software R Statistics.

4.5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica de *Oncidium Alowa* Iwanaga foi avaliada nos tratamentos onde as plantas foram inoculadas com (a) o tampão PBS; (b) com *B. seminalis* TC3.4.2R3; (c) com o mutante M01 patatina-ferritina; (d) com o patógeno *B. gladioli* ORQF-04F; (e) mix de culturas de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F e (6) mix de culturas do mutante M01 patatina-ferritina com *B. gladioli* ORQF-04F. As plantas foram inoculadas com 5 µl (5 x 10⁸ UFC ml⁻¹) a partir de um orifício obtido pela perfuração com uma ponteira estéril. Da mesma forma, as plantas foram avaliadas em triplicata após 3 e 20 horas. Para isso as folhas foram recortadas, pesadas, maceradas em nitrogênio líquido, e estocadas em freezer a -80 °C.

Para a determinação da peroxidação lipídica, foram utilizados 300 mg de material vegetal macerado em 1,3 ml (1/4,5) de ácido tricloroacético (0,1%). Após homogeneização, 1,4 ml do macerado foram transferidos para tubos e centrifugados a

14500 RFC (g) por 5 min. Foram adicionados 1 ml de ácido tricloroacético (20%, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico) em 250 µl do sobrenadante e a mistura foi mantida por 30 minutos a 95 °C. Após este período a amostra foi resfriada em gelo, e 1,4ml foram transferidos para tubos e centrifugados a 14500 RFC (g) por 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro DO₅₃₅ e DO₆₀₀. As determinações das concentrações de MDA forma realizadas através da fórmula:

$$C = \text{ABS (535-600)}/E.B$$

onde, E = coeficiente de extinção = 155 mM⁻¹/cm; b = comprimento óptico

A partir disso, foi obtido que: $C = \text{ABS (535-600)} / 155 \text{ mM}^{-1}$, sendo os resultados expressos em mMol de MDA/g de massa fresca. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância (DUNCAN; DUNCAN, 1955), no software R Statistics.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Burkholderia* CAPAZES DE CONTROLAR A NECROSE CAUSADA POR *B. gladioli* EM *Oncidium* ALOWA IWANAGA

5.1.1 Isolamento e identificação do patógeno *B. gladioli* ORQF-04F

O isolado ORQF-04F, utilizado no presente estudo, foi obtido de folhas de plantas de *Oncidium* Alowa Iwanaga apresentando sintomas típicos a necrose por Minami (2006). Inicialmente, este isolado foi definido como *Pectobacterium* pelo método fitopatológico de Takatsu e colaboradores (1981), que se utiliza o pimentão (*Capsicum annuum* L.) como modelo para detecção de bactérias pectinolíticas (Figura 04a), onde a introdução deste deve induzir aos sintomas da necrose. Seguindo os passos do postulado de Koch (1876), o patógeno foi reintroduzido em uma planta jovem saudável não sintomática de *Oncidium* Alowa Iwanaga, a qual em cerca de uma semana, também apresentou lesões verde-escuras a marrom ao redor da maceração, radialmente ao ponto de inoculação nas folhas (Figura 04b), características da necrose (MANO, 2011).

Figura 04 - (a) Sintomas da podridão mole em pimentão (*Capsicum annuum* L.); (b) sintomas da podridão mole na folha de uma planta jovem de *Oncidium* Alowa Iwanaga. (MANO, 2011).

Além da identificação inicial pelos métodos fitopatológicos, a análise da sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado ORQF-04F apresentou alta similaridade com sequências de *Burkholderia gladioli*, e a construção da árvore filogenética da sequência do gene 16S rRNA demonstrou o agrupamento da sequência da linhagem ORQF-04F com linhagens de *B. gladioli* (Figura 05). A caracterização bioquímica demonstrou que a linhagem *B. gladioli* ORQF-04F foi oxidase positiva, capaz de utilizar citrato de sódio, glicose e arabinose, de acordo com os resultados esperados para esta espécie.

A sequência parcial com 776 pb do gene 16S rRNA da linhagem de *B. gladioli* ORQF-04F, do presente estudo, foi depositada no banco de dados do *GenBank*, com o número de acesso KP735965.

Figura 05 - Identificação da linhagem ORQF-04F isolada de *Oncidium Alowa Iwanaga*, capaz de causar sintomas de necrose em pimentão e tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*. Enraizamento da árvore pelo método Neighbor-joining (Jukes e Kantor, 1969) baseado nos dados de sequência parcial do gene 16S rRNA de espécies de *Burkholderia*. O número nos ramos indica o valor de bootstrap, o qual foi calculado após 1000 réplicas. Barra de escala de 0.01 indica o número de substituição na posição de nucleotídeos.

5.1.2 Caracterização da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 capaz de controlar a necrose em *Oncidium Alowa Iwanaga* por *B. gladioli* ORQF-04F

No trabalho desenvolvido por Minami (2006), na busca de uma alternativa para o controle da necrose em orquídeas, foram avaliados *in vivo*, 28 bactérias endofíticas de *Oncidium flexuosum*, juntamente com 5 isolados de *Burkholderia* obtidos de eucalipto e cana-de-açúcar. Nenhum isolado endofítico de *O. flexuosum* foi capaz de inibir os sintomas de necrose, onde somente espécies de *Burkholderia* inibiram o aparecimento dos sintomas da necrose em fragmentos foliares, sendo a linhagem SpII2 de *Eucalyptus* sp. a mais eficiente. A inoculação conjunta *in planta* do patógeno *B. gladioli* juntamente com a bactéria endofítica de eucalipto, *Burkholderia* sp. SpII2, resultou no controle de 100% dos sintomas.

Em continuidade ao estudo, visando compreender quais os mecanismos envolvidos no controle, foi realizada uma nova triagem entre 34 isolados de raízes e rizosfera de cana de açúcar, previamente identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Desta triagem, a linhagem TC3.4.2R3 isolada de raízes de cana-de-açúcar foi selecionada, demonstrando potencial para o controle da necrose em *Oncidium Alowa Iwanaga* (MANO, 2011).

A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi identificada por MLSA (Multi Locus Sequency Analysis) utilizando os genes *recA* (DNA recombinase A), *atpD* (ATP synthase β chain), *gltB* (glutamate synthase large subunit), *gyrB* (DNA gyrase subunit β), *lepA* (GTP binding protein), *phaC* (acetoacetyl-CoA reductase), e *trpB* (tryptophan synthase subunit β) e comparação com a sequência de espécies de *Burkholderia*. O método MLSA mede diretamente as variações nas sequências de DNA de um conjunto de genes housekeeping e caracteriza linhagens pelo seu perfil alélico único. Os genes housekeeping são genes tipicamente constitutivos e requeridos para a manutenção das funções celulares básicas, sendo a análise de multilocos muito útil para estudos epidemiológicos e de genética de populações, delineamento de espécies, e a designação de linhagens para definir espécies bacterianas no gênero *Burkholderia* (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2013; SPILKER et al., 2009;). Para o Complexo Cepacia, a tipagem por seqüenciamento de multilocos tem sido efetiva na identificação de cepas classificadas inadequadamente (SPILKER et al., 2009). A construção da árvore filogenética com enraizamento pelo método Neighbor-joining (JUKES; CANTOR, 1969), baseada em multilocos, resultou no agrupamento da

linhagem TC3.4.2R3 com linhagens da espécie *B. seminalis*, interno ao Complexo Cepacia.

A caracterização bioquímica demonstrou que a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi oxidase positiva, capaz de metabolizar L-lisina e L-ornitina o que é esperado para espécies do Complexo Bcc. O teste de diferenciação de *Pseudomonas* demonstrou que a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 não foi capaz de produzir pioverdina, a 37 °C em meio KING B, enquanto que foi possível observar a produção de fluoresceína (pioverdina), um pigmento de cor verde-amarelada fluorescente sobre luz ultra-violeta por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Figura 06).

Figura 06 - Teste de diferenciação de *P. aeruginosa* em meio KING B. Ausência de produção de pioverdina (pigmento fluorescente) sobre luz ultra-violeta da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 em meio KING B (a); produção de pioverdina (fluoresceína) em *P. aeruginosa* ATCC 9027, pigmento de cor verde-amarelada observável sobre luz-ultravioleta (b).

5.2 ESPECTRO DE HOSPEDEIROS DE *B. gladioli* ORQF-04F E O CONTROLE POR *B. seminalis* TC3.4.2R3

Minami (2006) havia demonstrado que linhagens de *Burkholderia* isolados de *Eucalyptus* foram capazes de controlar, em fragmentos foliares, os sintomas de *B. gladioli* ORQF-04F em diferentes espécies de orquídeas, tais como *Oncidium Aloha* Iwanaga, *Phalaenopsis* e *Cattleya*, quando em densidades iguais do patógeno e do agente de biocontrole. Entretanto, em *Miltonia*, os isolados de *Burkholderia* avaliados não foram capazes de inibir os sintomas de *B. gladioli* mesmo em densidades iguais na planta.

Das 9 espécies avaliadas neste trabalho, entre elas incluindo *Cymbidium cricket*, *Cattleya forbesii*, *Brasilelia purpurata* russeliana, *Dendrobium lodigesii*, *Phalaenopsis* híbrida branca, *Miltonia spectabilis*, *Brassia* e duas variedades de *Oncidium*, a *Oncidium* Sharry Baby Sweet Fragance e *Oncidium* Alowa Iwanaga, foi observado que, exceto para *Brasilelia purpurata* russeliana, onde os sintomas de necrose não foram perceptíveis e claros, *B. gladioli* ORQF-04F causou sintomas de necrose mole em todas as demais espécies, em graus variados.

Os sintomas mais severos posteriores a inoculação de *B. gladioli* ORQF-04F foram observados em plantas da variedade *Oncidium* Alowa Iwanaga, no qual após 30 dias da inoculação do patógeno, os sintomas de necrose se estenderam por aproximadamente 70% da área foliar infectada (Figura 07a), o que não foi observado em nenhum dos outros tratamentos.

Em *Brassia* (Figura 07b) e na variedade *Oncidium* Sharry Baby Sweet Fragance (Figura 07c), os sintomas da necrose foram característicos àqueles observados em *Oncidium* Alowa Iwanaga, sugerindo haver uma especificidade na agressividade da bactéria aos diferentes hospedeiros.

Em *Phalaenopsis*, assim como observado no trabalho de Minami (2006), a inoculação de *B. gladioli* ORQF-04F resulta em uma lesão diferente da observada nas variedades de *Oncidium* e em *Brassia*. No local da lesão foi observada uma podridão parda de aspecto seco (Figura 07d), demonstrando que pode haver diferentes formas de manifestação da doença para um mesmo patógeno a depender do hospedeiro.

Foi observado que *B. gladioli* ORQF-04F é menos agressiva para *M. spectabilis* (Figura 07e), *C. cricket* (Figura 08a), *D. lodigesii* (Figura 08b) e *C. forbesii* (Figura 08c), visto que a lesão evoluiu muito lentamente nestas espécies, resultando em uma área de lesão inferior a 5 mm de diâmetro ao redor da área de inoculação.

Foi observado que, nas condições avaliadas, *B. purpurata* é resistente a *B. gladioli* ORQF-04F (Figura 08d). Entretanto, esta resistência deverá ser avaliada em outras condições, tais como plantas com idade e/ou estado fisiológico diferente, umidade relativa, temperatura, incidência de luz e etc.

Figura 07 - Ensaio de biocontrole de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na inibição dos sintomas de *B. gladioli*, após 30 dias em temperatura ambiente.

Figura 08 - Ensaio de biocontrole de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na inibição dos sintomas de *B. gladioli*, após 30 dias em temperatura ambiente.

Em todas as variedades avaliadas, as plantas permaneceram assintomáticas quando inoculados apenas com o tampão PBS e ou com a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, e no caso de plantas que foram suscetíveis a necrose por *B. gladioli* ORQF-04F, mesmo em diferentes graus, a inoculação conjunta do patógeno *B. gladioli* ORQF-04F na mesma densidade com a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, resultou na inibição de 100% dos sintomas, que se manteve pelos 30 dias do ensaio, sugerindo esta ser uma potencial linhagem de biocontrole desta bactéria em todas as espécies suscetíveis.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que *B. gladioli* ORQF-04F apresenta virulência e agressividade variável de acordo com a espécie hospedeira. Keith, Sewake e Zee (2005) citam que as plantas mais jovens são as mais suscetíveis ao desenvolvimento dos sintomas de *B. gladioli*, o que coincide com os resultados observados neste trabalho. Em *Oncidium Alowa Iwanaga*, onde a planta se encontra em estágio de plântula-jovem, sintomas mais agressivos foram observados, enquanto que nas plantas que se encontravam no estágio de jovem-adultas, entre elas, *C. cricket*, *B. purpurata* e *C. forbesii*, os sintomas de necrose causados por *B. gladioli* ORQF-04F foram mínimos ou nulos. Além disso, outros fatores podem interferir no desenvolvimento dos sintomas, como as condições ambientais e de manejo.

5.3 INTERAÇÃO DE *B. gladioli* ORQF-04F E *B. seminalis* TC3.4.2R3 EM *Oncidium* ALOWA IWANAGA

Na hipótese de se tratar ou não de um mecanismo de biocontrole envolvendo resistência sistêmica induzida, onde uma planta após a exposição a agentes bióticos ou abióticos apresenta como resposta ao agente indutor a ativação coordenada de um conjunto de genes relacionados à defesa sistêmica, conferindo resistência em largo espectro a vírus, bactérias e fungos, mesmo enquanto permanecem espacialmente separados do agente indutor em partes não infectadas da planta. Essa resistência é conferida devido ao enrijecimento da parede celular por deposição de glicanas, síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (PIETERSE; VAN LOON, 1999). Para avaliar se o controle da necrose é dependente do contato direto do patógeno com o agente de biocontrole, foi realizado um ensaio onde a linhagem de biocontrole *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi inoculada na folha de plantas de *Oncidium Alowa Iwanaga* um dia antes do patógeno *B. gladioli* ORQF-04F, em uma distância de 1 cm. Foi observado que nestas condições não ocorreu o controle da necrose, sugerindo que não deve ocorrer indução de resistência sistêmica. Também foi observado que para que a inibição dos sintomas de necrose pelo agente de biocontrole ocorra, há a necessidade do contato direto entre *B. seminalis* e *B. gladioli* dentro da planta. Apesar dos sintomas da podridão estarem presente nessas plantas, a área da lesão apresentou bordas de forma irregular (Figura 09a) se comparado a plantas onde a inoculação de *B. seminalis*

TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F foi realizada em conjunto (Figura 09b), indicando que apesar de o sintomas da necrose terem se manifestado, a presença de *B. seminalis* TC3.4.2R3 interfere na colonização do patógeno e/ou na sua virulência.

Figura 09 - Sintomas da necrose causada por (a) *B. gladioli* ORQF-04F, apresentando uma lesão de bordas regulares, (b) lesão de bordas irregulares quando *B. seminalis* TC3.4.2R3 é inoculado um dia antes do patógeno há uma distância de 1 cm. Ausência de sintomas nos demais tratamentos (c,d,e).

Tais resultados sugerem que este controle ocorre devido à interação antagônica dependente de contato e/ou proximidade entre as bactérias envolvidas. Além da competição por nutrientes, adaptação às condições ambientais, outra possível hipótese a ser levantada também pode ser o envolvimento de um sistema que depende da interação de proteínas da membrana externa de uma célula com receptores das células-alvo, que disparam um processo de inibição do crescimento, o qual pode ser mediado pelo Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS) (AOKI et al, 2009). O Sistema de Secreção do tipo VI (T6SS) foi recentemente descrito para bactérias gram-negativas, e parece estar amplamente distribuída em diferentes espécies. Acredita-se que o T6SS seja como uma máquina molecular que injeta proteínas efetoras em uma célula alvo, que pode ser utilizado como um eficiente alvo de competição entre células bacterianas através da injeção de toxinas antibacterianas (COULTHURST, 2013).

Foi avaliado também que, a inoculação prévia por infiltração da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 demonstra claramente que esta é capaz de inibir o aparecimento da necrose induzida por *B. gladioli* ORQF-04F inoculada após 6 dias. Foi observado que dentro do halo de infiltração por *B. seminalis*, sintomas de podridão não foram observados, sendo apenas visíveis de forma mais intensa fora da área de infiltração (Figura 10), onde teoricamente não ocorre a presença de *B. seminalis* TC3.4.2R3.

Figura 10 - Controle dos sintomas da necrose de *B. gladioli* sobre o halo de infiltração de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (indicado pelo traço vermelho). O halo de infiltração de *B. gladioli* é indicado pelo traço azul.

5.4 GENOMA DE *B. seminalis* TC3.4.2R3 E PROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA NECROSE

5.4.1 Sequenciamento do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3

5.4.1.1 *Pulse-Field Gel Electrophoresis (Gel de Eletroforese de Campo Pulsado) do DNA genômico de B. seminalis TC3.4.2R3*

A análise do DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em Gel de Eletroforese em Campo Pulsado demonstrou que para a corrida com o DNA íntegro não foi observado nenhuma banda (Figura 11). É possível que as condições de corrida não tenham sido favoráveis a movimentação dos cromossomos no gel, assim como a separação de cada um deles, sendo assim, não foi possível determinar o número de cromossomos por esta técnica. Para o plug de DNA genômico digerido, foi possível observar, de forma não muito nítida, entre 7 a 9 fragmentos de tamanhos variáveis dos cromossomos de *B. seminalis* TC3.4.2R3, onde se supõe que a digestão com a enzima MssI (PmeI) resulte na geração de três fragmentos maiores de cerca de 1.5 Mb, um fragmento aproximado de 1 Mb, um fragmento de 0.5 Mb a 0.6 Mb, e outros quatros fragmentos variando de 0.2 Mb a 0.5 Mb, totalizando aproximadamente 7.0 Mb. No trabalho de Cheng e Lessie (1994), a digestão do DNA genômico de *Pseudomonas cepacia* (*B. cepacia*) com a enzima PmeI espera-se resultar na geração de 4 fragmentos, de 3.15 Mb, 2.5 Mb, 0.9 Mb (replicon não digerido) e 0.25 Mb, para um genoma de aproximadamente 6.8 Mb. Variações no padrão de restrição são esperadas uma vez que os genomas de bactérias do gênero *Burkholderia* podem variar de um tamanho total de 4 Mb a 8 Mb, e podem possuir de 2 a 5 replicons (WIGLEY; BURTON, 2000), alterando a disposição de sítios de restrição no genoma, o tamanho e quantidade de fragmentos.

A enzima de restrição MssI (PmeI), uma enzima de corte raro recomendada para espécies tipo de *B. cepacia*, com 3 cromossomos e genoma total entre 7 Mb - 8 Mb (COLE; SAINT GIRONS, 1994), mostrou ser adequada para a análise dos cromossomos de *B. seminalis* TC3.4.2R3.

Figura 11 - *Pulse Field Gel Electrophoresis* de plugs do DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3, (a) digerido com a enzima de restrição MssI (PmeI); (b) DNA íntegro. Marcador molecular *Sacharomyces cerevisiae* YPH80.

5.4.1.2 Sequenciamento de nova geração 454 GS FLX Titanium

O genoma da linhagem de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi submetido ao sequenciamento de nova geração através da plataforma 454 Roche GS FLX Titanium. O processamento de dados inicial utilizando o Software Roche FLX v 2.6, utilizando como genoma de referência o genoma completo de *B. cenocepacia* J2315, resultou na obtenção de 640.383 reads com um tamanho médio de 465,923 bases, resultando em um comprimento total de 298.386.882 bases.

5.4.1.2.1 Montagem genômica de *B. seminalis* TC3.4.2R3

A montagem inicial do genoma foi realizada por meio da plataforma gsAssembler (montagem *de novo*) e gsMapper (montagem ancorada a um genoma de referência) do

programa Newbler v. 2.3, resultando em um total de 72 contigs, sendo o menor composto de 539 pb até o maior contig de 907.779 pb.

Posteriormente, com a reanálise das sequências para montagem usando a combinação Velvet e Mira, e a obtenção dos scaffolds com a orientação dos reads nos contigs, e montagem da sequência consenso dos contigs separados por gaps em distâncias de tamanho conhecido, foi obtido um esboço (draft genome) do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3, com aproximadamente 7.675.294 pb, composto de 3 replicons, sendo um maior, de 3.506.952 pb, um segundo de 3.191.980 pb, e por fim, um replicon menor, de aproximadamente 976.363 pb.

5.4.1.2.2 Anotação genômica de *B. seminalis* TC3.4.2R3

A anotação do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na plataforma Prokka v. 1.5.2. resultou na predição de 3.267 sequências codificantes no cromossomo 1, 2.865 sequências codificantes no cromossomo 2, e por fim, 863 sequências codificantes no cromossomo 3, totalizando em 6.995 CDS (sequências codificadoras) no genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3. O número de sequências codificantes nesta análise está dentro dos padrões da média de número de genes em genomas de *Burkholderia* do banco de dados do GenBank, a exemplo *B. ambifaria*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. vietnamiensis* e *B. xenovorans* (DUNBAR; COHN; WALL, 2011). Existem atualmente 177 linhagens do gênero *Burkholderia* registrados no Burkholderia Genome Database (WINSOR et al., 2008), sendo que destas 38 linhagens já possuem seu genoma completo, enquanto que 96 estão incompletos, sendo 57 linhagens em estágio de scaffold e contigs, 14 linhagens em SRA (sequence read archive) ou traços, e 25 linhagens sem status definido. As demais 43 linhagens não apresentam nenhum dado ou estágio de sequenciamento genômico. As quatro únicas linhagens da espécie *B. seminalis* registradas, sendo *B. seminalis* 0901, *B. seminalis* DSM 23518, *B. seminalis* R456 e *B. seminalis* S9, estão presentes no último grupo, onde não há nenhum dado de esboço genômico disponível.

5.4.2 Estudo do contexto gênico *in silico* do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina

O mutante M01 tn5:patatina-ferritina, derivado de uma biblioteca de inserção aleatória do transposon Tn5 (EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome – Epicentre) no genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3, foi selecionada de uma triagem em busca de mutantes defectivos no controle da necrose em fragmentos foliares de *Oncidium Alowa* Iwanaga. O mutante M01 teve a inserção do transposon Tn5 em uma região intergênica ao gene putativo da patatina (locus Bsem_02387) e uma proteína hipotética da família P-aminobenzoato N-oxigenase AurF, com domínio conservado para proteínas globulares de 4-hélices contendo dois ferros, da superfamília das ferritinas (locus Bsem_02386). A análise através da técnica de Southern Blot para separação dos fragmentos do DNA genômico do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01, após digestão com a enzima EcoRI e a hibridização da membrana de nylon com uma sonda do transposon Tn5, demonstra apenas uma única inserção do transposon no genoma do transformante M01, de forma que, o fenótipo observado para este mutante está relacionado ao nocaute de um único gene (MANO, 2011).

A análise dos genes adjacentes (Tabela 04) a inserção do transposon Tn5 em *B. seminalis* TC3.4.2R3 e outras burkholderias do Complexo Cepacia, demonstram uma região de genes do mesmo grupo ortólogo (top hit COG), a partir do locus Bsem_02382. Genes ortólogos são definidos como genes que divergiram após algum evento de especiação (FITCH, 2000), ou seja, “genes iguais” em diferentes organismos, que possuem uma origem homóloga e funções similares, não necessariamente iguais.

Tabela 04 - Anotação de genes adjacentes a inserção do transposon no mutante M01 Tn5:patatina-ferritina. (continua)

Locus tag <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	<i>B. cenocepacia</i> AU1054	<i>B. cenocepacia</i> J2315	<i>Burkholderia</i> sp. 383	<i>B. ambifaria</i> AMMD	Gene putativo	Função putativa
Bsem_02379	-	-	-	-	fimD	Sistema de secreção do Tipo VII (T7SS), Proteína mestre da membrana interna fimbrial.
Bsem_02380	-	-	-	-	fimC	Chaperona de montagem do pilus Gram-negativo
Bsem_02381	-	-	-	-	fimA	Proteína de montagem do pilus P, pilus FimA, [motilidade celular e secreção / Tráfego intracelular e secreção].
Bsem_02382	Bcen_2290	BCAL0694	Bcep18194_A6 247	Bamb_2954	Proteína biotina ligase	Biotina/proteína ligase da família lipoato A/B. Esta família inclui proteína biotina ligase, proteína lipoato ligase A e B. A biotina é covalentemente atacado ao sítio ativo de certas enzimas que transferem carbono dióxido de um bicarbonato para ácidos orgânicos para formar metabólitos celulares.
Bsem_02383	Bcen_2291	BCAL0693	Bcep18194_A6 248	Bamb_2954	Pantotena to quinase	Pantotenato quinase tipo III. Catalisa a fosforilação de pantotenato (pan), o primeiro passo da via universal da biossíntese de CoA.
Bsem_02384	Bcen_2292	BCAL0692	Bcep18194_A6 249	Bamb_2955	Proteína hipotética	Provável peptídeo sinal.
Bsem_02385	Bcen_2293	BCAL0691	Bcep18194_A6 250	Bamb_2956	Proteína bifunciona l RfaE	Domínio I (TIGR02198) é sugerido sua ação na biossíntese de D-glicero-D-manno-heptose 1-fosfato, enquanto que o domínio II (esta família) adiciona ADP para o campo da ADP-D-glicero-D-mannoheptose [Envelope celular, biossíntese e degradação de polissacarídeos e lipopolissacarídeos de superfície].
Bsem_02386	Bcen_2294	BCAL0690	Bcep18194_A6 251	Bamb_2957	Proteína hipotética	Ferritin-like, proteínas carboxiladas com ferro II. Participam de uma grande variedade de funções, incluindo a regulação do ferro, a monooxigenação, e a produção de radicais livres.

Tabela 04 - Anotação de genes adjacentes a inserção do transposon no mutante M01 Tn5:patatina-ferritina. (conclusão)

<i>Locus tag</i> <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	<i>B. cenocepacia</i> AU1054	<i>B. cenocepacia</i> J2315	<i>Burkholderia</i> sp. 383	<i>B. cepacia</i> AMMD	Gene putativo	Função putativa
Bsem_02387	Bcen_2295	BCAL0689	Bcep18194_A6 252	Bamb_2958	Patatina	Esta família consiste predominantemente de glicoproteínas patatinas bacterianas, com alguns representativos em eucariotos e arqueias. As patatinas possuem atividade enzimática de uma acil hidrolase lipídica, catalisando a quebra de ácidos graxos de lipídeos de membrana.
Bsem_02388	Bcen_2296	BCAL0688	Bcep18194_A6 253	Bamb_2959	Proteína hipotética	-
Bsem_02389	Bcen_2297	BCAL0687	Bcep18194_A6 254	Bamb_2960	enoil-CoA hidratase	Crotonase/superfamília hidratase enoil-coenzima A (CoA). Esta superfamília contém uma gama diversa de enzimas que desempenham importante função do metabolismo de ácidos graxos.
Bsem_02390	Bcen_2298	BCAL0686	Bcep18194_A6 255	Bamb_2961	Fumarilac eto acetato (FAA) hidrolase	2-ceto-4-pentenoto hidratase/2-oxohepta-3-ene 1,7 ácido dióico hidratase (via do catecol) [Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo].
Bsem_02391	Bcen_2299	BCAL0685	Bcep18194_A6 256	Bamb_2962	IclR family	Regulador transcricional
Bsem_02392	Bcen_2300	BCAL0684	Bcep18194_A6 257	Bamb_2963	Proteína hipotética	Proteína de função desconhecida (DUF3108). Esta é uma família de lipoproteínas bacterianas putativas. A estrutura PDB:3fzx, o primeiro modelo estrutural para esta grande família incluindo homólogos no microbioma intestinal humano e em dados metagenômicos, dobras para dentro de um barril beta que topologicamente parecem porinas de pequena escala (como a FepA).

Através da comparação de genomas microbianos é possível observar um grande número de conjuntos (clusters) gênicos conservados, o que nem sempre representa um operon. Assim, foi realizada uma busca de predição de clusters gênicos nos genomas das linhagens de *Burkholderia* utilizadas como referência, através do banco de dados da OperonDB (predicting operons in microbial genomes) (<http://operondb.cbcb.umd.edu/cgi-bin/operondb/operons.cgi>). O OperonDB utiliza de um algoritmo que calcula diversas possibilidades, considerando que genes não relacionados podem estar numa mesma ordem simplesmente por serem adjacentes em um ancestral comum; também a possibilidade de serem adjacentes em dois genomas ao acaso; ou ainda devido a transferência horizontal de um par gênico (PERTEA et al., 2009).

A busca de operons preditivos nos genomas de *B. cenocepacia* AU 6254, *B. cenocepacia* J2315, *Burkholderia* sp. 383 e *B. ambifaria* AMMD, demonstra a existência de um possível cluster gênico de cinco genes, no contexto gênico ao qual o transposon Tn5 foi inserido, correspondendo aos locus Bsem_02389 até o locus Bsem_02385 de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Figura 12), com genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos de membrana, biossíntese e degradação de açúcares dos polissacarídeos e lipolissacarídeos de superfície e regulação de ferro.

A predição de regiões codificadoras de proteínas através do EMBOSS (RICE; BLEASBY, 2000) tcode é demonstrada no gráfico (Figura 13), mostrando que a inserção do transposon Tn5 ocorreu em uma região com baixa probabilidade de ser uma sequência codificadora. A análise pelo FGENESB (Bacterial Operon and Gene Prediction), que faz a predição de genes e operons bacterianos através do modelo de cadeia de Markov (SOLOVYEV; SALAMOV, 2011), demonstrou não haver a presença de genes na região intergênica.

Figura 12 - Anotação e contexto gênico da inserção do transposon Tn5 no mutante M01 tn5:patatina-ferritina, e comparação com os genomas de *B. cenocepacia* AU1054, *B. cenocepacia* J2315, *Burkholderia* sp. 383 e *B. ambifaria* AMDD.

Figura 13 - Região do cromossomo de *B. seminalis* TC3.4.2R3 entre os locus Bsem_02385 a Bsem_02389. Gráfico interno mostra a predição de proteínas codificadoras sendo: maior (verde) e menor (vermelho) probabilidade.

A região intergênica em que o transposon Tn5 se encontra, consiste de uma sequência de 466 pb não anotada. No entanto, regiões intergênicas (IGRs) de genomas bacterianos são conhecidas por conter diversos pequenos elementos, como promotores, sequências de reguladores de transcrição ou tradução, ou ainda terminadores, que são importantes elementos para a expressão de genes (WELS et al., 2009). As regiões intergênicas são rotineiramente analisadas também para identificar estruturas de RNA não codificadores, como as tRNA, rRNA e sRNA. Os sRNA (small RNAs), por exemplo, já foram descritos tendo grande importância regulatória para a fisiologia e sobrevivência, participando da esporulação, metabolismo de açúcar, homeostase de ferro, sobrevivência sobre o estresse oxidativo, reparos de danos do DNA, manutenção de componentes da superfície celular e regulação da patogenicidade (SRIDHAR et al., 2010). Além disso, as regiões intergênicas em procariotos podem ser um ambiente natural para uma variedade de elementos funcionais, e seu conhecimento mais aprofundado é essencial para compreensão da fisiologia bacteriana. As regiões intergênicas podem carregar importantes unidades funcionais como transposons (SIGUIER; FILÉE; CHANDLER, 2006), sítios de ligação a integrases (DOUBLET et al., 2008), pequenas ORFs (open reading frames), pseudogenes, inverted repeats (sequências repetitivas, como os RNAi (RNAs de interferência) que são quimicamente complementar, exata ou parcial, a uma molécula de RNAm (RNA mensageiro), e sítios ligantes de fatores de transcrição (SHARPLES; LIYOD, 1990).

Métodos experimentais aplicados na identificação de promotores por ferramentas moleculares podem ser laboriosos, caros e consumir muito tempo. Uma estratégia utilizada amplamente em primeira instância são as técnicas *in silico*, a qual se utiliza de algoritmos para predição de promotores (JACQUES et al., 2006).

No presente estudo, a predição de promotores pelo BPROM (Prediction of Bacterial Promoters) foi utilizada para reconhecimento de fatores $\sigma 70$ de bactérias em possíveis regiões promotoras, com 80% de acurácia e especificidade (SOLOVYEV; SALAMOV, 2011). Foram obtidas duas possíveis regiões promotoras na sequência intergênica, sendo a primeira região promotora -10 localizada em aproximadamente 200pb upstream ao local de inserção do transposon Tn5, com cerca de 4 bases da região -35 sobrepondo-se a sequência do gene da patatina. Uma segunda possível região promotora -10 e -35, predita na região intergênica, estaria localizada 127 pb e 102 pb, respectivamente, a downstream da provável posição de inserção do transposon Tn5. No

entanto, apesar do amplo número de pesquisas na predição de promotores, estas técnicas ainda não estão bem desenvolvidas, não sendo completamente satisfatórias em vista da sua taxa de predições falsa positiva (ASKARY et al., 2008), assim, há de ser cautela para afirmação da real existência dos mesmos.

Deve-se ainda considerar os erros de anotação em genomas oriundos de anotação automatizada. Embora a ausência de introns em genomas bacterianos torne a sua anotação relativamente mais fácil, se seguirmos apenas a regra de que uma ORF começa sempre que encontrado um códon de iniciação, e que termina em um códon de parada, teríamos inúmeras sobreposições e/ou pequenas ORFs. Diante disso, a árdua tarefa dos programas de anotação automatizada seria em decidir, por meio de algoritmos, entre duas ORFs sobrepostas qual delas representa um gene verdadeiramente. Além disso, pode-se observar o mesmo erro em diferentes anotações, uma vez que em sua maioria a anotação de diferentes linhagens utiliza-se dos mesmos algoritmos e genomas de referência (POPTSOVA; GOGARTEN, 2010).

A inserção do transposon Tn5 pode ter afetado a região promotora do gene a downstream da região intergênica, o locus Bsem_02386 da proteína hipotética da superfamília das ferritinas; ou ainda, por um erro de anotação, estar envolvido na estrutura do gene upstream a região intergênica, o locus Bsem_02387 do gene putativo da patatina.

A predição de sublocalização celular das proteínas adjacentes a inserção do transposon Tn5 no mutante M01 patatina-ferritina foram avaliadas através do software PSORTb v. 3.0 (<http://www.psort.org/psortb/index.html>), o qual assume que valores de confiança com score iguais ou maiores que 7.5 indicam a predição final de sublocalização celular e na hipótese de dois sítios com score elevados, é interpretada a hipótese de uma proteína com sítio múltiplos de localização (YU et al., 2010). O produto gerado pelo locus Bsem_02387, anotada previamente como uma patatina constituída de 408 aminoácidos, teve sua predição para uma proteína citoplasmática. Patatinas consistem basicamente de glicoproteínas bacterianas com alguns representantes dentro do domínio Eucarya e Archaea. As patatinas são descritas como proteínas de estoque, mas também possuem atividade enzimática de acil hidrolase lipídica chamadas de fosfolipases. As fosfolipases compreendem uma gama diversa de enzimas secretadas ou ligadas à membrana, que clivam fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Em bactérias patogênicas, a participação das fosfolipases na invasão às

células hospedeiras, virulência e início de respostas inflamatórias tem sido relatada (SITKIEWICZ; STOCKBAUER; MUSSE, 2006).

Embora dados da literatura tenham enfatizado as patatinas como fosfolipases importantes na patogênese de bactérias, já tem sido relatado também o envolvimento destas enzimas em respostas de defesa induzida na planta, contra patógenos microbianos, na detenção da multiplicação de parasitas, ou no acúmulo de sinais envolvidos na indução de conjuntos de genes de defesa (BLÉE, 1998; DHONT et al., 2000; SHARMA et al., 2004). No entanto, todas essas evidências foram levantadas de estudos com patatinas de plantas, sendo que para micro-organismos, sua função tem sido geralmente associada a constituintes de membrana, muitas vezes associados a adesão e fixação de patógenos em humanos, como exemplo da ExoU, uma citotoxina tipo III, um fator de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* com atividade do tipo fosfolipase A, considerada a primeira hidrolase semelhante a patatina descrita em bactérias (SATO et al., 2003). Além disso, o estudo também em plantas demonstrou que patatinas podem apresentar atividade antimicrobiana, onde uma variedade híbrida de batata portava uma resistência durável ao oomyceto *Phytophthora infestans*. Uma proteína desta variedade foi purificada e frações dela foram capazes de inibir a germinação de 70% dos esporos. A sequência N-terminal desta proteína apresentou homologia, o mesmo peso molecular e reação cruzada com anticorpos de patatina (SHARMA et al., 2004).

O gene downstream da região intergênica, anotado como uma proteína hipotética de 292 aminoácidos, compartilhado entre diferentes espécies de *Burkholderia*, apresentou um domínio conservado da superfamília das ferritinas. Sua sublocalização celular também foi predita como uma possível proteína citoplasmática. As ferritinas são proteínas que participam de uma ampla variedade de funções, possui poderosa função de detoxificação de excesso de ferro, dioxigenação e em alguns casos, H_2O_2 , desta forma, protegendo a célula contra o estresse oxidativo (BRIAT et al., 2010).

O possível papel das ferritinas no biocontrole de *B. seminalis* TC3.4.2R3 não está claro, porém as ferritinas participam da produção de sideróforos, que em micro-organismos desempenham um importante papel no sistema de aquisição de ferro e durante a infecção microbiana. A competição por ferro do hospedeiro pelos micro-organismos pode definir quem terá maior sucesso. Em *P. carotovora*, por exemplo, foi observado que estas bactérias usam os sideróforos para obter vantagem durante a colonização dos tecidos de plântulas e flores de macieira, e ainda apresenta resistência a

peróxido de hidrogênio, o que as tornam imune a alguns mecanismos de defesa da planta em resposta a infecção (DELLAGI et al., 2009). Leong (1986) já citava na década dos 80, que em *Pseudomonas*, além da promoção de crescimento, os sideróforos poderiam apresentar um importante papel no controle de fitopatógenos.

Além disso, se considerarmos o contexto em que o transposon Tn5 se inseriu, se tratar de um cluster gênico, este evento pode ter ocasionado um efeito polar aos genes downstream do cluster. O locus Bsem_2385, downstream a proteína hipotética da superfamília das ferritinas, foi identificado como ADP-heptose sintase bifuncional, uma proteína de 161 aminoácidos, com a análise de predição de sublocalização indicando ser uma proteína citoplasmática.

A análise da estrutura desta proteína, a ADP-heptose sintase, mostra que ela possui duas regiões com domínios conservados, a rfaE bifuncional, que também é observada em outras espécies e tem a função de fosforilação de açúcares para biossíntese de ADP-L-glycero-D-manno-heptose, um precursor para síntese de LPS, e uma citidililtransferase, enzima que participa do metabolismo de aminofosfato e glicerofosfolídeos (VALVANO, 1999). Estas enzimas participam da síntese de lipopolissacarídeos (LPS), que são um dos maiores componentes da superfície celular bacteriana, consistindo de um complexo lipídico glicosilado anfipático, localizado na camada externa da membrana externa, formada de lipídeo A e um domínio oligossacarídico central. As LPS desempenham um importante papel na manutenção da integridade estrutural da membrana externa bacteriana, interagindo com proteínas da membrana externa assim como com cátions divalentes, no qual estas interações iônicas promovem uma barreira prevenindo a passagem de substâncias hidrofóbicas, como detergentes, corantes e antibióticos (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; VALVANO, 1999).

Além disso, diversas espécies de bactérias são caracterizadas pela produção de proteínas de superfície regular conhecidas como S-layers, onde a heptose é um dos açúcares componente das unidades de dissacarídeos repetitivos de glicanas em S-layer já bem caracterizadas. Estudos recentes revelam que estas proteínas glicosiladas não são restritas a elas, sendo encontradas também no pili, adesinas sem pili, filamentos flagelados e exoenzimas secretadas por uma variedade de Arqueas e Bactérias. A glicosilação de superfície de proteínas bacterianas pode ter várias funções, incluindo a aderência, a evasão de respostas imunes, e um aumento na resistência a ataques

proteolíticos (VALVANO; MESSNER; KOSMA, 2002). Geralmente, uma única camada de S-layer está presente, constituindo de 5% a 10% do total das proteínas da célula. Devido a sua ocorrência frequente, sugere-se que as S-layers desempenham um importante papel na interação da célula com o seu ambiente. Várias funções têm sido propostas, incluindo manutenção do pool de genes e seleção molecular, e ainda pode auxiliar na fixação de fagos. As S-layers podem ser um fator de virulência, proteger patógenos bacterianos, facilitar a adesão de células bacterianas nas moléculas hospedeiras, ou ainda aumentar sua habilidade em se associar com macrófagos (MESNAGE et al., 1998). A comunicação através de proteínas de membrana, como mostrado brevemente, demonstra essa se tratar de uma interação específica e local, e isso pode auxiliar em partes a compreensão dos mecanismos de controle biológico dos sintomas de *B. gladioli* neste estudo, visto que foi observado que a atividade de biocontrole de *B. seminalis* é dependente de contato, se não, ao menos depende que estejam bem próximas.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE M01 PATATINA-FERRITINA DEFECTIVO NO CONTROLE DA NECROSE EM *Oncidium* ALOWA IWANAGA POR *B. gladioli* ORQF-04F

5.5.1 Curva de crescimento do isolado selvagem e mutante M01 Tn5:patatina-ferritina de *B. seminalis* TC3.4.2R3

A curva de crescimento da linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 patatina-ferritina foi feita com o intuito de avaliar se o evento de nocaute gênico poderia ter interferido no metabolismo deste mutante, e possivelmente podendo refletir no seu crescimento, e consequentemente na sua capacidade de competição com *B. gladioli* na planta, sendo assim indiretamente associado ao controle biológico.

A curva de crescimento foi delineada para a linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e o mutante M01 patatina-ferritina, em caldo TSB 10% sob agitação e temperatura constante (28 °C), por até 30 horas. Para conversão das leituras de densidade ótica em unidades formadoras de colônia por mililitro de cultura (UFC mL⁻¹), foi feita a curva padrão de *B. seminalis* TC3.4.2R3, para obtenção da equação da reta com R²>0,9 (Anexo C).

Os dados de crescimento bacteriano, tendo as suas médias avaliadas pelo teste estatístico t-Student ($P>0,95$), demonstram uma diferença significativa na taxa de crescimento do mutante M01 (região intergênica a uma fosfolipase semelhante a patatina e uma proteína hipotética com domínio conservado semelhante a ferritina), apenas para a leitura de 6 horas de crescimento, sendo que para as demais leituras, de 12, 18, 24 e 30 horas, diferenças estatisticamente significativas não foram observadas (Figura 14).

A partir destes resultados, supõe-se que o mutante M01, com a inserção na região intergênica ao gene putativo da patatina e uma proteína hipotética com domínio conservado semelhante à ferritina, apresentou uma taxa de crescimento estatisticamente similar à linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, pelo menos em condições *in vitro*, com cultivo em meio de cultura.

Figura 14 - Curva de crescimento de *B. seminalis* TC3.4.2R3, e o mutante M01 tn5:patatina-ferritina, ao longo de 30 horas. (*) Diferença estatisticamente significativa pelo teste t-Student ($P>0,95$).

Este resultado pode sugerir que a deficiência no controle da necrose

provavelmente não se deve à uma menor taxa de crescimento do mutante, mas como o resultado do efeito do produto codificado na região gênica, ou um efeito polar aos genes adjacentes ao local da inserção do transposon Tn5. No entanto, vale ressaltar que a dinâmica da taxa de crescimento deste mutante pode apresentar um comportamento diferente quando nos tecidos da planta de *Oncidium Alowa Iwanaga*, onde as condições de oferta de nutrientes, osmolaridade, interação com outros micro-organismos pré-existent, entre outros parâmetros, são completamente diferentes aos meios de cultivo.

5.5.2 Colonização do isolado selvagem e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*

A densidade de colonização de *Oncidium Alowa Iwanaga* pelos isolados da linhagem selvagem de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e o mutante M01 patatina-ferritina foi feita através da inoculação de uma suspensão bacteriana de cada isolado e o reisolamento das células viáveis após 6 e 12 dias. O padrão de colonização da planta pela linhagem selvagem e do mutante M01 patatina-ferritina foi avaliada por meio da divisão da folha em três segmentos de 2 cm, e apenas uma seção do pseudobulbo de 1 cm, ambos a partir de um único ponto de inoculação, a fim de se verificar como ocorre a colonização dos tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*.

De forma geral, nenhuma colônia foi re-isolada dos segmentos 2 e 3 de folha, sendo que estas somente foram observadas no segmento 1, mais próximo ao ponto de inoculação, e no único segmento de bulbo, tanto para isolamento de plantas inoculadas em 6 ou 12 dias (Figura 15 e Figura 16).

Embora em plantas inoculadas por 6 dias seja observado graficamente uma menor densidade de colonização do mutante M01 patatina-ferritina comparado ao selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, tanto em folha no segmento 1 no bulbo (Figura 15), essa diferença não é clara quando feita a análise de variância pelo teste *t-Student* ($P > 0,95$) das médias do número de colônias isoladas de cada tecido nas réplicas biológicas. Assim, a análise estatística demonstra que não há diferença real na densidade de colonização, pois foi observada uma grande variação na colonização entre cada planta individualmente, sem correlação com o isolado inoculado.

Para as plantas inoculadas por 12 dias (Figura 16), não foi observado diferença

entre o selvagem *B. seminalis* e o mutante M01 para a colonização para o segmento 1 de folha. Em bulbo, a densidade de colonização do mutante M01 patatina-ferritina foi significativamente maior que a densidade do selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 pela análise de variância pelo teste t-Student ($P>0,95$) das médias do número de colônias isoladas de cada tecido nas réplicas biológicas.

Figura 15 - Densidade bacteriana do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, nos segmentos F1, F2, F3 de folhas, e o segmento único do bulbo de *Oncidium Alowa Iwanaga*, após 6 dias da inoculação.

Figura 16 - Densidade bacteriana do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, nos segmentos F1, F2 e F3 de folhas, e o segmento único do bulbo de *Oncidium Alowa Iwanaga*, após 12 dias da inoculação.

De forma geral, os dados obtidos do re-isolamento e contagem de colônias tanto do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 patatina-ferritina, em tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*, demonstram que *B. seminalis* não coloniza os tecidos da planta de forma uniforme, podendo haver a formação de micro-colônias em porções do tecido, de forma aleatória. Os dados também demonstram que, ao menos através da contagem de colônias reisoladas, a defectividade no controle da necrose pelo mutante M01 patatina-ferritina aparentemente não se deve a uma menor capacidade de colonização dos tecidos em decorrência do gene nocauteado.

Os dados de isolamento demonstram também que, entre 6 e 12 dias, não ocorre uma variação significativa nas densidades tanto do isolado selvagem como do mutante M01. As variações observadas também foram aleatórias e devem estar relacionadas a cada planta individualmente do que entre os tratamentos. Em parte, deve-se considerar que, como a introdução dos inóculos foi feita a partir de um único orifício na base de inserção da folha no bulbo de *Oncidium Alowa Iwanaga*, o que poderia representar uma pequena quantidade do inoculo, explique a ausência de isolamento nos segmentos 2 e 3 de folhas, e a aleatoriedade na contagem de colônias por secção de tecido entre as réplicas biológicas.

5.5.3 Determinação da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina da patatina-ferritina por qPCR na interação com *B. gladioli* em *Oncidium* Alowa Iwanaga

A fim de avaliar a interação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 para o gene da patatina-ferritina com *B. gladioli* ORQF-04F em tecidos foliares de *Oncidium* Alowa Iwanaga, foi realizado um ensaio de qPCR com o DNA total extraído dos segmentos foliares inoculados, utilizando primers específicos desenhados a partir do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3.

5.5.3.1 Desenvolvimento de primers específicos para *B. seminalis* TC3.4.2R3 por qPCR

Um conjunto de sete primers desenhados utilizando como alvo o genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foram avaliados por PCR convencional. A amplificação de produtos de PCR com tamanho aproximado a banda de 250 pb do marcador molecular 1Kb (Fermentas) foi observado para os pares de primers fad (236 pb), pio (228 pb), tiol (155 pb) antd (150 pb) e burkrecN (235 pb), quando o template era o DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3, e ausente para o DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F, com exceção do par de primers antd (antígeno D15), que também apresentou reação positiva com amplificação de uma banda de aproximadamente 150 pb quando o template da reação era o DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F. Desta forma, o par de primer *antd* foi descartado para os testes posteriores de qPCR, juntamente com os pares de primer *pha* e *lip*, que não amplificaram nas reações de PCR com o DNA de *B. seminalis* TC3.4.2R3 como molde (Figura 17).

Figura 17 - Gel de eletroforese dos produtos de PCR dos primers fad, pio, pha, lip, tiol, antd e burkrecN, com os templates (A) DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3; (B) DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F; DNA total extraído de *Oncidium* Alowa Iwanaga inoculado com *B. seminalis* TC3.4.2R3 (C) de 6 dias e (D) 12 dias. Marcador molecular 1 Kb (Fermentas).

Os resultados positivos para os pares de primers testados com o template de DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3, com amplificação de uma única banda, demonstra que, exceto para o par de primers antd, que amplificou também para o DNA genômico de *B. gladioli*, e o par de primers burkrecN, que apresentou inespecificidade com a amplificação de várias bandas nas condições de reação de PCR testada, todos os demais primers poderiam ser utilizados em primeira instância para os ensaios de qPCR.

Partindo da teoria de que *B. seminalis* TC3.4.2R3 é capaz de colonizar *Oncidium* Alowa Iwanaga, era esperado que as amostras de DNA total extraídas de plantas inoculadas também apresentassem amplificação positiva por PCR. A ausência de bandas não necessariamente representa ausência de bactérias *B. seminalis* TC3.4.2R3 nos tecidos de *Oncidium* (6 e 12 dias), mas sim como uma limitação da técnica, pois é preconizado que o PCR convencional possa subestimar a quantificação resultando em falsos negativos, sendo a técnica de qPCR mais sensível (KRIEGER; HERO; ASHTON, 2006). Da mesma forma, a ausência de bandas visíveis para *B. gladioli* no PCR

convencional não garante que o mesmo não será detectado por qPCR pelos mesmos pares de primers. Neste contexto, o PCR convencional trata-se de uma alternativa de custo menor e mais rápida para triagem inicial dos primers testados, além da possibilidade de se visualizar o produto que foi amplificado, assim, avaliando se o mesmo corresponde ao tamanho do produto alvo esperado.

Dos primers que tiveram resultado positivo para o PCR convencional para o DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e negativo para *B. gladioli* ORQF-04F, foram selecionados os pares de primers *fad* e *pio*, sendo estes testados por qPCR, até adequar as condições que reduzissem a formação de dímeros de primer ou amplificações de produtos inespecíficos. Nas amplificações para o primer *fad* a presença de um pico de fluorescência para o DNA de *B. gladioli* igual ao de *B. seminalis* foi observado, descartando a utilização do mesmo para este fim. Desta forma, foi dado seguimento aos ensaios de quantificação absoluta com o par de primer *pioF* e *pioR* para determinar a densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na interação com *B. gladioli* ORQF-04F em tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*.

Para o monitoramento de *B. gladioli* ORQF-04F foram testados o par de primers *gla-fw* e *gla-rv*, para regiões específicas do gene *gyrB* de *B. gladioli* demonstrados em trabalhos anteriores de Maeda e colaboradores (2006). Além disso, foram testados também a combinação dos primers *glaf1/glar1* e *glaf2/glar1*, que foram desenhados a partir do DNA genômico de *B. gladioli* BSR3, utilizado como referência, para amplificar regiões internas do *gyrB*, produzindo produtos de menor tamanho. Como template para a reação de PCR convencional, foi utilizando tanto o DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F como o de *B. seminalis* TC3.4.2R3, extraídos de culturas puras, a fim de se testar se os mesmos não amplificariam para o alvo inadequado ao objetivo da análise. Para o par de primer *gla-fw/gla-rv* foi observado a amplificação de uma banda de tamanho aproximado ao esperado, com cerca de 478 pb, sendo positiva para o DNA de *B. gladioli* ORQF-04F e negativa para o DNA de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Figura 18). Tanto para o par de primers *glaf1/glar1* como para o par de primers *glaf2/glar1*, bandas de aproximadamente 213 pb e 243 pb, respectivamente, foram obtidas para o DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F, no entanto, em ambas, foram observadas amplificações de bandas inespecíficas para o DNA de *B. seminalis*, sendo descartado o seu uso para os ensaios de qPCR.

Figura 18 - Gel de eletroforese dos produtos de PCR dos primers gla-fw/gla-rv, glaf1/glar1 e glaf2/glar1, com os templates (A) DNA genômico de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e (B) DNA genômico de *B. gladioli* ORQF-04F. Marcador molecular 1 Kb (Fermentas).

5.5.3.2 Monitoramento da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01Tn5:patatina-ferritina em *Oncidium Alowa* Iwanaga por qPCR

O par de primer pioF e pioR foi desenhado para amplificação parcial do gene codificante da proteína de montagem da placa basal de fagos, uma piocina putativa, que foi interrompida pela inserção do Tn5 no mutante M15, que se mostrou defeitivo na produção de compostos antimicrobianos contra diversas bactérias, demonstrado no trabalho de SANTOS (2010). Trata-se de um bacteriófago integrado e encontrado no genoma de diversas espécies de *Burkholderia*, inclusive em *B. gladioli*, embora seja observada divergência nas sequências. Na análise *in silico*, com auxílio do programa Artemis, os primers pioF e pioR de *B. seminalis* não se anelaram aos cromossomos 1 e 2 de *B. gladioli* BSR3 (genoma de referência), nem tampouco geraram produtos de amplificação por meio de PCR convencional e qPCR quando utilizado o DNA genômico total extraído de cultura pura de *B. gladioli* ORQF-04F como template.

Foi observado que o limite de detecção do qPCR com os primers pioF e pioR foi para uma escala de 10^3 células (Figura 19), que corresponde ao padrão de detecção indicado na literatura, onde diz que pelo menos uma ordem 10^3 cópias (células) é detectada em amostras ambientais por qPCR (GAMALERO et al., 2003).

Figura 19 - Curva de amplificação das amostras de DNA genômico extraído de cultura pura de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (53,4 ng/μl), diluídas em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

De acordo com os resultados do isolamento e contagem de colônias em tecidos de *Oncidium* Alowa Iwanaga inoculados com *B. seminalis* TC3.4.2R3 e os mutantes, o monitoramento da densidade de *B. seminalis* isolada e em interação com o patógeno *B. gladioli* em comparação ao mutante M01 da patatina-ferritina, foi realizado a quantificação absoluta por qPCR para o DNA total extraído apenas para o segmento 1 de folha e do único segmento do pseudobulbo de *Oncidium* Alowa Iwanaga.

Nos ensaios preliminares por qPCR, nenhum pico foi observado para o DNA extraído das plantas controle (inoculação apenas do tampão fosfatado PBS) indicando que não ocorre amplificação inespecífica para o DNA da planta hospedeira ou possíveis bactérias endofíticas presentes em seus tecidos, demonstrando que os par de primers pioF e pioR ser uso eficiente para o monitoramento de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em interação com *B. gladioli* ORQF-04F neste sistema.

Em relação à densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 selvagem e o mutante M01 patatina-ferritina, individualmente ou na interação com *B. gladioli*, não foram observadas diferenças estatisticamente diferentes, exceto para *B. seminalis* na interação com *B. gladioli* quando o isolamento foi obtido do pseudobulbo em 6 dias de colonização (Figura 20), onde a taxa de colonização foi maior que quando *B. seminalis* TC3.4.2R3 é inoculada isoladamente, e significativamente maior que o mutante M01 também quando

em interação com o patógeno *B. gladioli*. Em plantas maceradas em 12 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, porém a variação entre as réplicas biológicas dentro de cada tratamento foi relativamente grande, mostrando que há mais um efeito da relação com a planta hospedeira individualmente do que o efeito do tratamento, quando em longo prazo.

Essa grande variação encontrada tanto no isolamento como na detecção por qPCR, pode indicar que a colonização dos tecidos do pseudobulbo de *Oncidium Aloha Iwanaga* por *B. seminalis* TC3.4.2R3 não ocorre de uma forma homogênea, sugerindo que pode ocorrer de forma aleatória, com regiões da planta com alta densidade (micro-colônias) e regiões com poucas células desta bactéria.

Figura 20 - Monitoramento da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, em 6 e 12 dias, em pseudobulbo macerado de *Oncidium Aloha Iwanaga* em interação com *B. gladioli* ORQF-04F. *Teste Tukey ($P > 0,05$).

Em folhas, a densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 selvagem e o mutante M01 patatina-ferritina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em 6 dias. Assim como observado para o bulbo em 6 dias, a densidade de *B. seminalis* em interação com *B. gladioli* é maior do que quando a bactéria foi inoculada isoladamente, indicando

que talvez a presença de *B. gladioli* pode ter um efeito positivo para a colonização inicial de *B. seminalis* TC3.4.2R3. Para plantas colonizadas por 12 dias, foram observadas diferenças significativas apenas para a taxa de colonização do mutante M01 patatina-ferritina quando inoculada isoladamente, que neste caso, teve a sua densidade reduzida em relação aos demais tratamentos (Figura 21).

Figura 21 - Monitoramento da densidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, em 6 e 12 dias, em tecido de folha (secção 01) macerado de *Oncidium Aloha Iwanaga* em interação com *B. gladioli* ORQF-04F. *Teste Tukey ($P > 0,05$).

Os resultados obtidos nesse ensaio demonstram que, em relação à taxa de colonização, não há uma correlação entre os tratamentos, ocorrendo de forma aleatória dependente mais da interação individual com o hospedeiro. Estudos de colonização bacteriana preferencial em tecidos de plantas ornamentais são escassos, de forma que a comparação com dados da literatura é dificultada.

Os resultados de colonização por qPCR demonstram que a colonização de *B. seminalis* TC3.4.2R3 é maior em folhas do que em pseudobulbo de *Oncidium Aloha Iwanaga*, tanto em 6 como 12 dias. Os tecidos da folha podem representar um ambiente mais estável para a colonização desta linhagem especificamente, visto que as variações

nas densidades de bactérias dentro de cada tratamento em folhas, se comparado aos resultados observados para o pseudobulbo, foram menores. Tecidos de orquídeas podem apresentar uma composição de compostos bioativos, como terpenóides, saponinas, alcalóides, flavanóides, entres outros, de forma diferenciada entre as diferentes partes da planta, incluindo raízes, ramos, folhas e pseudobulbo, podendo ter um efeito biocida, como demonstrado em *Dendrobium* (SANDRASAGARANI; SUBRAMANIAM; MURUGAIYAH, 2014).

Por outro lado, essa diferença não indica necessariamente que o bulbo não seja um nicho ao qual *B. seminalis* TC3.4.2R3 seja capaz de se estabelecer, uma vez que para a densidade por contagem de colônias re-isoladas, esta diferença não foi muito clara, e a variação entre as réplicas biológicas no bulbo foram relativamente tão estáveis quanto em folhas. Visto a inoculação inicial de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi realizada pontualmente na base da inserção da folha no bulbo, essa diferença pode ter ocorrido devido a um crescimento radial e a bactéria não teve tempo suficiente entre 6 a 12 dias para colonizar estes tecidos.

5.5.3.3 *Determinação da densidade de B. seminalis TC3.4.2R3, do mutante M01 Tn5:patatina-ferritina e B. gladioli ORQF-04F na interação em co-cultura por qPCR*

Os resultados obtidos do monitoramento da densidade de *B. gladioli* por qPCR utilizando os mesmos primers do monitoramento *in vivo*, em tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*, após 24 horas incubado a 28 °C sob agitação, na interação em co-cultura com *B. seminalis* e com o mutante M01, indica que existe um efeito negativo estatisticamente significativo para o crescimento de *B. gladioli* nessas interações (teste t-Student $P > 0,95$). As densidades de *B. seminalis* e do mutante M01 foram maiores quando na presença de *B. gladioli* do que quando estas eram bactérias foram cultivadas isoladamente, sugerindo que a presença de *B. gladioli* pode ter um efeito estimulante sobre o crescimento de *B. seminalis*, embora para o selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, a análise de variância pelo teste *t-Student* mostrou que essa diferença não foi significativa. No entanto, para o patógeno *B. gladioli* OQF-04F, foi observado que sua densidade sofre uma redução média de aproximadamente 40% na densidade após 24 horas quando em co-culturas na

presença tanto do isolado selvagem *B. seminalis*, como do mutante M01 (Figura 22). Em culturas livres, a densidade estimada do isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, do mutante M01 e do patógeno *B. gladioli* não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Figura 22 - Monitoramento da densidade de *B. gladioli* ORQF-04F, *B. seminalis* TC3.4.2R3 e do mutante M01 tn5:patatina-ferritina, em co-cultura após 24 horas a 28 °C sob agitação.

A atividade antagônica de *B. seminalis* TC3.4.2R3 contra *B. gladioli* ORQF-04F observada por meio do método de sobrecamada foi pequena, com a presença de um halo entre 1 a 3 mm (Figura 23). A análise para o mutante M01 patatina-ferritina não demonstrou diferença significativa no diâmetro do halo de inibição *in vitro* contra *B. gladioli* ORQF-04F comparado ao isolado selvagem (MANO, 2011).

Estes resultados demonstram que a bactéria apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* contra o patógeno, tanto em meio de cultura sólido, como na interação co-cultura em culturas líquidas, sugerindo que a produção de antibióticos pode participar do controle *in vivo* de *B. gladioli* em *Oncidium Alowa* Iwanaga.

Figura 23 - Zonas de inibição da linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 frente a bactéria *B. gladioli* ORQF-04F. As setas indicam o halo de inibição.

5.5.4 Perfil fisiológico de *Oncidium Alowa Iwanaga* em resposta a interação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F

5.5.4.1 Determinação de etileno

Como diversos mecanismos podem estar envolvidos no controle biológico, e podem também ocorrer simultaneamente, as alterações fisiológicas de *Oncidium Alowa Iwanaga* induzidas por *B. gladioli* ORQF-04F e *B. seminalis* TC3.4.2R3 foram avaliadas.

Na primeira leitura, considerada tempo zero (T0), realizada logo após a montagem do experimento, foi observado um aumento na produção do gás etileno em todas as plantas inoculadas com células bacterianas, e também para plantas inoculadas apenas com o tampão PBS, que embora seja observado uma menor a liberação de gás etileno, a análise de variância pelo teste t-Student não demonstrou haver diferença significativa em relação aos outros tratamentos com inóculos bacterianos. Para plantas que não foram submetidas a nenhum fermento mecânico devido a inoculação, a liberação de gás etileno foi nula (Figura 24). Estes resultados indicam que a perfuração

mecânica para inoculação do material causa estresse na planta, induzindo a liberação de gás etileno, que é sutilmente maior quando na presença de células bacterianas. Entre os tipos de inóculos, o isolado selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 e o patógeno *B. gladioli* ORQF-04F, ou a presença simultânea dos dois, a liberação de gás etileno ocorreu em doses parecidas, para a primeira leitura.

No entanto, para todas as dosagens nos demais tempos, de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 dias e 7 dias, todas as leituras dos níveis de etileno foram muito próximo da linha de base, sendo consideradas zero, demonstrando que apenas em primeira instância a perfuração e inoculação de bactérias causa um estresse na planta, mecânico e talvez biológico, mas esta é reduzida ao longo de poucas horas, assim, a planta não estaria estimulando, por meio desta via, a indução de genes de defesa a patógenos que preveniriam a progressão de doenças.

Figura 24 - Dosagem da liberação de etileno em plantas de *Oncidium Alowa Iwanaga* inoculadas com *B. seminalis* TC3.4.2R3, *B. gladioli* ORQF-04F, *B. seminalis* TC3.4.2R3+ *B. gladioli* ORQF-04F, tampão PBS e plantas sem nenhum inóculo. Tempos de coleta de 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 dias e 7 dias.

O etileno é um hormônio gasoso composto de dois carbonos e quatro átomos de hidrogênio (C_2H_4), produzido na maior parte de tecidos de plantas. Este hormônio desempenha diversas funções nos processos ao longo do ciclo de vida das plantas, incluindo a germinação de sementes, crescimento, formação de gema apical, senescência de órgãos, maturação de frutos, abscisão, gravitropismo, e respostas a estresses, tanto abiótico quanto biótico (ABELES et al., 1992). A dosagem de etileno pode ser utilizada como um indicador de estresse na planta.

Estudos também relatam uma correlação entre a produção de etileno com o aumento da produção de jasmonato (PENNINCKX et al., 1998; SHIN et al., 2014), que também promove a indução de respostas de defesa em plantas. Neste contexto, a redução da produção de etileno pode ser explicada pelo fato de que, caso sua produção fosse constantemente aumentada ela poderia representar um estresse a planta, que poderia responder com respostas de defesa, e assim, impedir a colonização de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F. O etileno é citado também como uma chave reguladora para a colonização dos tecidos da planta por bactérias (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Algumas bactérias, principalmente aquelas consideradas promotoras de crescimento em plantas, podem ainda hidrolisar a 1-aminocilopropano-1-carboxilato (ACC), que é o precursor do etileno, através de uma atividade ACC-deaminase, sendo assim, podendo reduzir os níveis de etileno em plantas (SHAHAROONA et al., 2006).

5.5.4.2 Determinação de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma forma de espécie reativa de oxigênio (ROS) gerado como resultado de um estresse. A produção de peróxido pode ser induzida em plantas após exposição a uma grande variedade de estímulos bióticos e abióticos, que incluem: temperaturas extremas, irradiação a UV, excesso de energia de excitação, exposição ao ozônio, fitohormônios como ABA, desidratação, ferimentos, ataque de patógenos e elicitores (NEILL et al., 2001).

O reconhecimento de bactérias avirulentas também pode estimular a geração de H_2O_2 e este sinal induzir genes de defesa e colapso nas células atingidas, provocando

morte celular no local de uma lesão, restringindo a colonização da planta pelo patógeno, a qual caracteriza uma resposta de hipersensibilidade (HR). Como resposta primária, esta HR é acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência sistêmica adquirida a patógenos virulentos (ALVAREZ et al., 1998).

Como delineado experimentalmente, a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio foi feita em plantas de *Oncidium Alowa Iwanaga* condicionadas por 3 e 20 horas e inoculadas com (a) *B. seminalis* TC3.4.2R3, (b) mutante M01 patatina-ferritina, (c) *B. gladioli* ORQF-04F, (d) mix das culturas de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F e (e) mix das culturas do mutante M01 patatina-ferritina com *B. gladioli* ORQF-04F.

Para a dosagem de peróxido das plantas condicionadas por 3 horas nos diferentes tratamentos, foi observado que todas as interações, exceto a de *B. seminalis* TC3.4.2R3 com *B. gladioli* ORQF-04F, resultaram na redução na liberação de peróxido de hidrogênio. Os níveis de liberação de peróxido para plantas inoculadas somente com tampão PBS (plantas controle) indicam que o ferimento provocado pela perfuração com uma ponteira para inoculação das bactérias em *Oncidium Alowa Iwanaga* pode provocar estresse oxidativo, sendo que na presença de inóculos bacterianos, há uma redução nos níveis de peróxido no tecido foliar (Figura 25).

Tendo em vista que *B. gladioli* ORQF-04F e *B. seminalis* TC3.4.2R3 são capazes colonizar endofiticamente *Oncidium Alowa Iwanaga*, é compreensível que estes se utilizem de sistemas de detoxificação para balancear os sistemas de resposta de defesa em plantas, o que pode explicar esta redução. As catalases e/ou peroxidases são as enzimas responsáveis por eliminar o peróxido de hidrogênio tanto produzido endogenamente pela cadeia respiratória, como a gerada no ambiente (ZELLER; KLUG, 2004).

Figura 25 - Determinação da liberação de H₂O₂ em *Oncidium Alowa Iwanaga* na interação com *B. seminalis* TC3.34.2R3, o mutante M01 tn5:patatina-ferritina e *B. gladioli*, em 3 e 20 horas. *Duncan Test Statistical (P>0,95).

Nas leituras de 3 horas para a interação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 selvagem com *B. gladioli* ORQF-04F, os níveis de peróxido foram estatisticamente mais próximos dos níveis liberados pelas plantas inoculadas somente com o tampão PBS, que apresentaram os maiores níveis de liberação de peróxido. A liberação de doses maiores de peróxido comparado às demais interações pode indicar que a interação entre as duas bactérias pode provocar um estresse maior, e possivelmente a indução de uma HR no local da lesão, suprimindo o patógeno, embora provavelmente este não seja o mecanismo central de controle da doença.

Na leitura de 20 horas, o único tratamento que apresentou variação significativa na liberação de peróxido de hidrogênio em relação a todos os tratamentos foi para plantas inoculadas com *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F, as quais apresentaram um menor nível de H₂O₂.

A liberação e acúmulo de peróxido é um evento complexo e altamente regulado que depende de um tempo de exposição ao estímulo e regulado por enzimas envolvidas na geração e degradação de H₂O₂. No entanto, o aumento na produção de peróxido é relativamente rápido, com exemplos de acúmulo de peróxido em até 30 minutos após

exposição ao estímulo (RANIERI et al., 2003), de forma que cessado o estímulo seu acúmulo também é reduzido. Na presente análise, alguns casos de aumento ou até mesmo redução na produção de peróxido foram observados apenas após 20 horas, sugerindo que pode ocorrer devido a um estímulo contínuo causado pela colonização da planta pelas bactérias, que pelos dados densidade demonstra ocorrer, no geral, de forma aleatória.

5.5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica

Além da determinação do H_2O_2 produzido por *Oncidium Alowa Iwanaga* em resposta à inoculação com *B. seminalis* TC3.4.2R3, mutante M01 e *B. gladioli* ORQF-04F, foi feita a dosagem da peroxidação lipídica para os mesmos tratamentos, com leituras em 3 e 20 horas. A peroxidação lipídica é amplamente utilizada como um indicador de estresse na membrana de plantas, baseado na dosagem de malondialdeído (MDA) produzido durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (TAULAVOURI et al., 2001).

Em 3 horas de interação (Gráfico 10), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos em relação às plantas que foram inoculadas apenas com o tampão de diluição, demonstrando que a peroxidação possa ter ocorrido em virtude da do próprio ferimento mecânico para introdução dos inóculos nos tecidos de *Oncidium Alowa Iwanaga*. No entanto, quando comparado o mutante M01 inoculado isoladamente ao inoculo introduzido conjuntamente com o patógeno, foi observada uma maior peroxidação lipídica em *Oncidium Alowa Iwanaga*, ou seja, um maior estresse oxidativo o que se não for recompensado por um sistema antioxidante pode causar danos aos tecidos (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998)

A leitura após 20 horas de exposição da planta aos inóculos (Figura 26), também demonstra que não houve diferenças significativas entre os tratamentos em relação a planta inoculada somente com o tampão de diluição. No entanto, foi observado agora que o isolado selvagem, quando na presença simultânea do patógeno, apresentou uma maior peroxidação se comparado ao tratamento com a inoculação isolada de cada espécie bacteriana.

Figura 26 - Determinação da peroxidação lipídica (MDA) *Oncidium Alowa Iwanaga* na interação com *B. seminalis* TC3.34.2R3, o mutante M01 tn5:patatina-ferritina e *B. gladioli*, em 3 e 20 horas. *Duncan Test Statistical

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, onde o controle de doenças bacterianas em orquídeas é problemático, uma vez que produtos químicos com boa eficiência não se encontram disponíveis para o controle destes patógenos, e também por não haver antibióticos registrados para uso em orquídeas, ainda que estas possam apresentar problemas de fito-toxicidade ou manchas em flores. Dessa forma, a utilização de *B. seminalis* TC3.4.2R3 pode ser uma potencial estratégia para o controle destes patógenos. No entanto, para garantir as mínimas condições para o sucesso do sistema a ser empregado, é de grande importância um estudo mais aprofundado dos possíveis mecanismos envolvidos neste controle.

No presente estudo foi observado apresentado que a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, obtida do interior de raízes de cana-de-açúcar, é um potencial candidato ao controle da necrose em orquídeas. O estudo deste isolado demonstra uma atividade antibacteriana contra *B. gladioli* em condições *in vitro*, tanto utilizando meio de cultura sólido como meio de cultura líquido. Embora exista uma evidência de produção de compostos antimicrobianos por *B. seminalis* TC3.4.2R3, não é garantido que apenas este mecanismo seja responsável pela inibição do crescimento do patógeno e por conseguinte da necrose de orquídeas.

Nas condições *in vivo*, em tecidos foliares de diferentes espécies de orquídeas, foi demonstrado que *B. seminalis* TC3.4.2R3 é um bom candidato ao controle biológico, inibindo 100% dos sintomas da necrose de orquídeas, e este tem efeito prolongado por pelo menos 30 dias. Análises mais específicas demonstraram também que existe uma dependência do contato direto de *B. seminalis* com o patógeno dentro da planta para que este consiga inibir os sintomas de podridão produzidos pelo patógeno.

Análises de perfil hormonal da planta hospedeira indicam que o controle da necrose de orquídea por *B. seminalis* TC3.4.2R3 não está associado à elicitação de uma resposta de defesa sistêmica na planta, podendo este estar no máximo associado a resposta de hipersensibilidade ao ferimento da perfuração para inoculação das cepas.

A análise dos genes nocauteados em mutantes defectivos no controle da necrose (MANO, 2011) e mais especificamente do mutante M01, mostrou que genes de biossíntese da membrana e componentes dos polissacarídeos e lipolissacarídeos, além da regulação de ferro, podem estar envolvidos em diversos processos fisiológicos de *B.*

seminalis TC3.4.2R3 envolvidos no controle biológico da necrose de orquídea, causada por *B. gladioli* ORQF-04F. Assim, mesmo que algumas evidências tenham sido geradas, sugere-se o estudo mais aprofundado, envolvendo técnicas de microscopia, análise global da expressão de genes, perfil de metabólitos liberados durante a interação, de forma a obter um maior entendimento sobre os mecanismos genético-moleculares envolvidos na interação entre estas duas espécies de *Burkholderia*.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que:

- A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 é um excelente candidato para o controle da necrose, inibindo 100% dos sintomas da doença, em diferentes variedades de orquídeas.
- *B. seminalis* TC3.4.2R3 apresenta atividade antagônica *in vitro* contra *B. gladioli* ORQF-04F, tanto em meio de cultura líquido ou sólido.
- O controle da necrose de *Oncidium Alowa Iwanaga* causada por *B. gladioli* ORQF-04F, não envolve a indução de resistência sistêmica por *B. seminalis* TC3.4.2R3.
- O genoma de *B. seminalis* possui aproximadamente 7,3 MB distribuídos em 3 cromossomos, com cerca de 6995 CDS (sequências codificantes) anotadas.
- Para que o controle ocorra de forma eficaz é necessário que *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. gladioli* ORQF-04F estejam em contato direto na planta.
- Uma região entre os genes que codificam uma patatina e uma proteína hipotética com domínio conservado da família das ferritinas está envolvida no controle da necrose de orquídeas.

REFERÊNCIAS*

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992, 414 p.

ADJEI, M. D.; OHTA, Y. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 699-704, 1999.

ALEXIEVA, V.; SERGIE, L.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

ALVAREZ, M. E.; PENNELI, R. I.; MEIJER, P.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, v. 92, p. 773-784, 1998.

ANDREWS, D. L.; BEAMES, B.; SUMMERS, M. D.; PARK, W. D. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in baculovirus vector. **Biochemical Journal**, v. 252, p. 199-206, 1998.

AOKI, S. K.; WEBB, J. S.; BRAATEN, B. A.; LOW, D. A. Contact-dependent growth inhibition reversible metabolic down regulation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 1777-1786, 2009.

ASKARY, A.; MASOUDU-NEJAD, A.; SHARAFI, R.; MIZBANI, A.; PARIZI, S. N.; PURMASJEDI, M. N4: a precise and highly sensitive promoter predictor using neural network fed by nearest neighbors. **Genes & Genetics Systems**, v. 84, n. 6, p. 425-430, 2009.

BEVININO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MC17 in disease suppression and growth promotion maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 225-231, 2000.

BLÉE, E. Phytooxylipins and plant defense reactions. **Progress in Lipid Research**, v. 37, p. 33-72, 1998.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

STOYANOVA, M.; HRISTOVA, P.; PETROV, N.; MONCHEVA, P.; BOGATZEVSKA, N. Method for differentiating *Burkholderia gladioli* pathovars. **Plant Studies**, v. 1, n. 6, p. 15-19, 2011.

BREDJA, J. J.; KREMER, R. J., BROWN, J. R. Indications of associative nitrogen fixation in eastern gamagrass. **Journal Range Manage**, v. 47, p. 192-95, 1994.

BRIAT, J.; RAVET, K.; ARNAUD, N.; DUC, C.; BOUCHEREZ, J.; TOURAINÉ, B.; CELLIER, F.; GAYMARD, F. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annual Reviews in Botany**, v. 105, p. 811-822, 2010.

BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 3, p. 551-592, 2010.

BURKHEAD, K. D.; SHISLER, D. A.; SLININGER, P. J. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2031-2039, 1994.

CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA J. R.; FALKINHAM, J. O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4139-4141, 2000.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Informatics**, v. 10, p. 421, 2009.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas: Pragas e doenças**, 2. ed. Rio de Janeiro: Expressão, 2002, 128 p.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CHENG, H.; LESSIE, T. G. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 13, p. 4034-4042, 1994.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A. M.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VISCA, P. *Burkholderia cepacia* Complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends In Microbiology**, v. 14, p. 277-286, 2006.

CHURCH, A.; SIVASOTHY, P.; PARMER, J.; FOWERAKER, J. Mediastinal abscess after lung transplantation secondary to *Burkholderia gladioli* infection. **Journal Heart Lung Transplantation**, v. 28, n.5, p. 511-514, 2009.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 719-729, 2003.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3427-3436, 2001.

COLE, S. T.; SAINT GIRONS, I. Physical maps of bacteria and their methods for construction. Bacterial Genomics. **FEMS Microbiology**, v.14, p. 139-160, 1994.

COULTHURST, S. J. The type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 640-654, 2013.

DAUGHTREY, M. L.; BENSON, D. M. Principles of plant health management for ornamental plants. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 43, p. 141-169, 2005.

DELLAGI, A.; SEGOND, D.; RIGAULT, M.; FAGARD, M.; SIMON, C.; SAINDRENAN, P.; EXPERT, D. Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1687-1696, 2009.

DESTÉFANO, R. H. R. **Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos**. 2003. 72 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2003.

DHONDT, S.; GEOFFROY, P.; STELMACH, B. A.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. Soluble phospholipase A₂ activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and contributed by patatin-like enzymes. **The Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 431-440, 2000.

DOUBLET, B.; GOLDING, G. R.; MULVERY, M. R.; CLOECKAERT, A. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. **Plos One**, v. 3, n.4, p. 1-10, 2008.

DUFF, J.; DALY, A. Orchid diseases in the northern territory. **Agnote**, v. 13, p 1-5, 2002.

DUFFY, B.; KEEL, C.; DÉFAGO, G. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1836-1842, 2004.

DUNBAR, J.; COHN, J. D.; WALL, M. E. Consistency of gene starts among *Burkholderia* genomes. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1-13, 2011.

DUNCAN, O.; DUNCAN, B. A methodological analysis of segregation indexes. **American Sociological Review**, v. 20, n. 2, p. 210-217, 1955.

DURSU, A.; ZENCIROGLU, A.; KARAGOL, B. S.; HAKAN, N.; OKUMUS, N.; GOL, N.; TANIR, G. *Burkholderia gladioli* sepsis in newborns. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 10, p. 1503-1509, 2012.

EDDY, S. R. Accelerated profile HMM searches. **Plos Computational Biology**, v. 7, n. 10, p. 1-16, 2011.

ERIKSSON, A. R. B.; ANDERSSON, R. A.; PIRHONEN, M.; PALVA, E. T. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 743-752, 1998.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; VINUESA, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; HIRSCH, A. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. **Currents in Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 51-60, 2013.

FIORI, M.; LIGIOS, V.; SCHIAFFINO, A. Identification and characterization of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p. 450-461, 2011.

FITCH, W. M. Homology, a personal view on some of the problems. **Tig**, v. 16, n.5, p. 227-231, 2000.

FURUYA, N.; IYAMA, K.; UEDA, Y.; NOBUAKI, M. Reaction of tobacco and Rice leaf tissue infiltrated with *Burkholderia glumae* or *B. gladioli*. **Journal of Faculty of Agriculture**, v. 42, n. 1-2, p. 43-51, 1997.

GAMALERO, E.; LINGUA, G.; BERTA, G.; LEMANCEAL, P. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. **Agronomie**, v. 23, p. 407-418, 2003.

GEORGAKOPOULOS, D. G.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N. J.; SCHROTH, M. N. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2931-2938, 1994.

GONZALEZ, C. F.; VENTURI, V.; ENGLENDOW, A. S. The phytopathogenic *Burkholderia*. **Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics**, p. 153-176, 2007.

GORDON, J.; McLEOD, J. W. The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 31, n. 2, p. 185-190, 1928.

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

HEUNGENS, K.; PARKE, J. L. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. **Phytopathology**, v. 91, p. 383-391, 2000.

HILL, D. S.; STEIN, J. L.; TORKEWITZ, N. R.; MORSE, A. M.; HOWELL, C. R.; PACHLATKO, J. P.; BECKER, J. O.; LIGON, J. M. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 78-85, 1994.

HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. A Threat to human health?. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 221-227, 1998.

HUANG, Y.; WRONG, P. T. W. Effect of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* and soil type on the control of crown rot in wheat. **Plant and Soil**, v. 203, p. 103-108, 1998.

HWANG, J. CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of Rhizoctonia stem rot of poinsettia. **Biological Control**, v. 25, p. 56-63, 2002.

HYATT, D.; CHEN, G.; LOCASIO, P.; LAND, M. L.; LARIMER, F. W.; HAUSER, L. J. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Informatics**, v. 11, p. 119, 2010.

IBRAFLOR. **Instituto Brasileiro de Floricultura. O Mercado de flores no Brasil.** Disponível em: < <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=235>>. Acesso em: 28 de Abril de 2015.

ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P.R.; ARRESE-IGOR, C.; BECANA, M. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, v. 116, p. 173-181, 1998.

JACQUES, P. E.; RODRIGUES, S.; GAUDREAU, L.; GOULET, J.; BRZEZINSKI, R. Detection of prokaryotic promoters from the genomic distribution of hexanucleotides pairs. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 423, p. 1-14, 2006.

JIAO, Z.; KAWAMURA, Y.; MICHIMA, N.; YANG, R.; LI, N.; LIU, X.; EZAKI, T. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenerans* and an emended description of *B. gladioli*. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 12, p. 915-925, 2003.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In MUNRO, H. N. **Mammalian Protein Metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Contexto & Perspectiva. Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, Janeiro de 2014. 2013: Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hórtica**, p. 1-8, 2014a.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014b.

KEISER, H. M.; KEISER, T.; HOPWOOD, D. A. A combined genetic and physical map of *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n. 17, p. 546-5507, 1992.

KEITH, L. M.; SEWAKE, K. T.; ZEE, F. T. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from Orchids in Hawaii. **Plant Disease**, v. 89, p. 1273-1278, 2005.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KIRZINGER, M. W. B.; NADARASH, G.; STARVRINIDES, J. Insights into cross-kingdom plant pathogenic bacteria. **Genes**, v. 2, p. 980-997, 2011.

KOCH, R. Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*". Investigations into bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of *Bacillus anthracis*. **Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, v. 2, n. 2, p. 277-310, 1876.

KRIEGER, K. M.; HERO, J.; ASHTON, K. J. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using pCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 71, p. 149-154, 2006.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LAGESEN, K.; HALLIN, P.; RODLAND, E. A.; STAERFEDT, H.; ROGNES, T.; USSERY, D. W. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 3100-3108, 2007.

LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 11-16, 2004.

LEE, C. J.; LEE, J. T.; KWON, J. H.; KIM, B. C.; PARK, W. Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola* in Korea. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 287-292, 2005.

LEONG, J. Siderophores. Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 24, p. 187-209, 1986.

LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity for *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 117-128, 1996.

LIN, H.; CHEN, Y.; LI, Y.; TSENG, I.; HSIEH, T.; BUU, L.; CHEN, Y. *Burkholderia multivorans* acts as an antagonist against the growth of *Burkholderia pseudomallei* in soil. **Microbiology and Immunology**, v. 55, p. 616-624, 2011.

LPSN. **List of prokaryotic names with stading in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>>. Acesso em: 23 de março de 2015.

LU, S. E.; HENN, R. A. First report of ear soft rot of corn (*Zea mays*) caused by *Burkholderia gladioli* in the United States. **Plant Diseases**, v. 91, n. 11, p. 1514, 2007.

MAEDA, Y.; SGINOHARA, H.; KIBA, A.; OHNISHI, K.; FURUYA, N.; KAWAMURA, Y.; EZAKI, T.; VANDAMME, P.; TSUSHIMA, S.; HIKICHI, Y. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1031-1038, 2006.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; VENTURA, G. M.; ALFENAS, R. F. Antracnose em *Paphiopedilum insigne* (Orchidaceae) causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 436-436, 2005.

MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P. Comparative genomics of *Burkholderia* species. **Burkholderia, Molecular microbiology and genomics, Horizon Biosciences**. p. 53-80, 2006.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* Complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 144-156, 2005.

MALAVOLTA J. R.; ALMEIDA, I. M. G. **Doenças bacterianas. Boletim Técnico Instituto Biológico**. 2. ed. São Paulo: Instituto Biológico, 2012. 86 p.

MANO, E. T. **Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de *Pectobacterium carotovora***. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2011.

MAO, S.; LEE, S.; HWANGBO, H.; KIM, Y.; PARK, K.; CHA, G.; PARK, R.; KIM, K. Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. **Current Microbiology**, v. 53, p. 358-364, 2006.

MARSHALL, K.; SHAKYA, S.; GREENHILL, A. R.; PADILLA, G.; BAKER, A.; WARNER, J. M. Antibiosis of *burkholderia ubonensis* against *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent for melioidosis. **Burkholderia Antibiosis**, v. 41, n. 4, p. 904-912, 2010.

MESNAGE, S.; TOSI-COUTURE, E.; GOUNON, P.; MOCK, M.; FOUET, A. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 52-58, 1998.

MEYER, S. L. F.; ROBERTS, F. P.; CARTA, L. K.; LUMSDEN, R. D.; MAO, W. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. **Nematropica**, v. 31, p. 75-86, 2001.

MINAMI, S.N. **Diversidade e controle biológico de *Pectobacterium carotovora* em orquídeas utilizando bactérias endofíticas**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2006.

MORAES, L. M.; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 1397-1400, 2002.

NACAMULLI, C.; BEVININO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MC17. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 183-193, 1997.

NANDAKUMAR, R., SHAHJAHAN, A. K. M., YUAN, X. L., DICKSTEIN, E. R., GROTH, D. E., CLARK, C. A., CARTWRIGHT, R. D., RUSH, M. C. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. **Plant Diseases**, v. 93, p. 896-905, 2009.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1237-1247, 2002.

NEVES, A. A. C. **Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao antagonismo a microrganismos fitopatogênicos**. 2011, 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2011.

PAJUNEN, M. I.; PULLIAINEN, A. T.; FINNE, J.; SAVILAHTI, H. Generation of transposon insertion mutant libraries for gram-positive bacteria by electroporation of phage Mu DNA transposition complexes. **Microbiology**, v. 151, p. 1209-1218, 2005.

PAKKER, W. L.; RATHNUM, M. L.; SEINER, V.; TREJO, W. H.; PRINCIPE, P. A.; SYKES, R. B. Cepacin A and B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 431-440, 1984.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* Complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual reviews in Phytopathology**, v. 39, p. 225-258, 2001.

PEETERS, C.; ZLOSNIK, J. E. A.; SPILKER, T.; HIRD, T. J.; LIPUMA, J. J.; VANDAMME. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 483-489, 2013.

PENNINCKX, I. A. M. A.; THOMMA, B. P. H. J.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.; BROEKAERT, W. F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, p. 2103-2113, 1998.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3103-3110, 2006.

PERTEA, M.; AYANBULE, K.; SMEDINGHOFF, M.; SALZBERG, S.L. OperonDB: a comprehensive database of predicted operons in microbial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 479-482, 2008.

PETERSON, T. N.; BRUNAK, S.; von HEJINE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0.: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.

PITIERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science Reviews**, v. 4, n. 2, p. 1360-1385, 1999.

PLANTWISE. **Distribuição mundial de *B. gladiolipv. gladioli***. Disponível em: <<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx?speciesID=7399&dsID=44960&loc=global>>. Acesso em: 07 de Abril de 2015.

POPTSOVA, M. S.; GOGARTEN, J. P. Using comparative genome analysis to identify problems in annotated microbial genomes. **Microbiology**, v. 156, p. 1909-1917, 2010.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y. The rizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant Soil**, p. 1-21, 2008.

RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; PACINI, J.; BALDAN, B.; SODI, A. M.; SOLDATINI, G. F. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2529-2540, 2003.

RICE, P. L.; BLEASBY, A. EMBOS: The European molecular biology open software suite. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 6, p. 276-277, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 2, 2344 p.

SANDRASARAGAN, U. M.; SUBRAMANIAM, S.; MURUGAIYAH, V. New perspective of *Dendrobium crumenatum* orchid for antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 2, p. 719-724, 2014.

SANTOS, P. E.; BUSTILLOS, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated with wide environmental and geographic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

SANTOS, V. C. P. **Atividade antibacteriana de *Burholderia* spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SATO, H.; FRANK, R. W.; HILLARD, C. J.; FEIX, J. B.; PANKHANIYA, R. R.; MORIYAMA, K.; FINCK-BARBANCON; BUCHAKLIAN, A.; LEI, M.; LONG, R. M.; WIENER-KRONISH, J.; SAWA, T. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded Type III cytotoxin, ExoU. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 12, p. 2959-2969, 2003.

SEEMANN, T. Prokka: a rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics Applications Note**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SEVERINE, G. Uma bacteriosi dell'lxia maculate e Del Gladiolus. **Annali di Botanica**, v. 11, p. 413-424, 1913.

SHARAROONA, B.; BIBI, R.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A.; HASSAN, Z. U. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase rhizobacteria attenuates ACC-induced classical triple response in etiolated pea seedling. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 5, p. 1491-1499, 2006.

SHARMA, N.; GRUSZEWSKI, H. A.; PARK, S.; HOLM, D. G.; VIVANCO, J. M. Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 647-655, 2004.

SHARPLES, G. J.; LIYOD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6503-6508, 1990.

SHIN, S.; LV, J.; FAZIO, G.; MAZZOLA, M.; ZHU, Y. Transcriptional regulation of ethylene and jasmonate mediated defense response in apple (*Malus domestica*) root during *Phytophthora ultimum* infection. **Horticulture Research**, v. 53, p. 1-10, 2014.

SIGUIER, P.; FILÉE, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 526-531, 2006.

SITKIEWICZ, I.; STOCKBAUER, K. E.; MUSSER, J. M. Secreted bacterial phospholipases A2 enzymes: better living through phospholipolysis. **Trend in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 63-69, 2006.

SOLOVYEV, V.; SALAMOV, A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. p. 61-78, 2011. In LI, R. **Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies**. Nova York: Nova Science Publishers, 2011, 457 p.

SPIELKER, T.; BALDWIN, A.; BUMFORD, A.; DOWSON, C. G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607-2610, 2009.

SRIDHAR, J.; NARMADA, S. R.; ABARINATHAN, R.; OU, H.; DENG, Z.; SEKAR, K.; RAFI, Z. A.; RAJAKUMAR, K. sRNAscan: a computational tool for the intergenic small RNA detection in bacterial genomes. **Plos One**, v. 5, n. 8, p. 1-14, 2010.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 125, p. 73-76, 2001.

STOYANOVA, M.; GEORGIEVA, L.; MONCHEVA, P.; BOGATZEVSKA, N. *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas marginalis* pathogens of *Leucojum aestivum*. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 5, p. 4069-4073, 2013.

TAKATSU, A.; MELLO, S.; GARCIA, E. J. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 550-551, 1981.

TAULAVOURI, E.; HELLSTRÖM, E.; TAULAVOURI, K.; LAINE, K. Comparison of two methods used analyze lipid peroxidation from *Baccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 365, p. 2375-2380, 2001.

TUNG, S. Y.; KUO, T. T. Requirement for phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus canker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5564-5570, 1999.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3 – New capabilities and interfaces. **Published online**, v. 40, n. 15, p. 1-12, 2012.

VALARINI, P. J. Desenvolvimento de método e indicadores de avaliação do impacto ambiental das práticas de manejo em sistemas de produção intensivos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. v. 36, p. 1-25.

VALENZUELA, C. G. P. Pudrición bacteriana. *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*. **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)**, v. 12, p. 1-15, 2013.

VALVANO, M. A.; MESSNER, P.; KOSMA, P. Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated *glycerol-manno-heptose* precursors of bacterial glycoproteins and cell surface. **Microbiology**, v. 18, p. 1979-1989, 2002.

VALVANO, M. A. Biosynthesis and genetics of ADP-heptose. **Journal of Endotoxin Research**, v. 5, p. 90-95, 1999.

VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J.; BALDWIN, A.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia*

seminalis sp. nov., *Burkholderia metallica* sp. nov. novel species within the *Burkholderia cepacia* Complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1580-1590, 2008.

VERMIS, K.; VANDEKERCKHOVE, C.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. A. R. Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA as a tool for genomovar characterization within the *Burkholderia cepacia* Complex. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 1-5, 2006.

WELS, M.; BONGERS, R. S.; BOEKHORST, J.; MOLENAAR, D.; STURME, M.; DE VOS, W. M.; SIEZEN, R. J.; KLEEREBEZEM, M. Large intergenic cruciform-like supermotifs in the *Lactobaccillus plantarum* genome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3420-3424, 2009.

WIGLEY, P.; BURTON, N. F. Multiple chromosomes in *Burkholderia cepacia* and *B. gladioli* and their distribution in clinical and environmental strains of *B. cepacia*. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p. 914-918, 2000.

WINSOR, G. L.; KHAIRA, B.; VAN ROSSUM, T.; LO, R.; WHITESIDE, M. D.; BRINKMAN, F. S. The *Burkholderia* Genome Database: facilitating flexible queries comparative analyses. **Bioinformatics**, v. 1, n. 23, p. 2803-2804, 2008.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J.; BRINKMAN, F. S. L. PSORTb 3.0.: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010.

ZELLER, W. Status on induced resistance against plant bacterial diseases. **Fitossanidad**, v. 10, p. 99-103, 2006.

ZELLER, T.; KLUG, G. Detoxification of hydrogen peroxide and expression of catalase genes in *Rhodobacter*. **Microbiology**, v. 150, p. 3451-3462, 2004.

Anexo A - Curva padrão de etileno (área do cromatograma de óxido de etileno x concentração em nmol de etileno), obtidos de amostras de óxido de etileno nas concentrações: 35 nmol/mol, 178.6 nmol/ml, 357.1 nmol/mol e 714.3 nmol/ml. Coeficiente de correlação 0,992.

Anexo B - Curva padrão de H_2O_2 para determinação da equação linear, utilizando peróxido de hidrogênio comercial nas concentrações de 0 mM; 0,049 mM; 0,098 mM; 0,196 mM; 0,294 mM; 0,392 mM; 0,49 mM; 0,588 mM; 0,78 mM; e 0,98 mM.

Anexo C - Curva padrão de crescimento de *B. seminalis* TC3.4.2R3 para determinação da equação linear.