EMY TIYO MANO

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Burkholderia* sp. ASSOCIADOS AO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pectobacterium carotovora*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

EMY TIYO MANO

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Burkholderia* sp. ASSOCIADOS AO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Pectobacterium carotovora*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia**.**

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:
Prof. Dr. Welington Luiz Araújo

São Paulo
2011

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.
Identificação de genes de *Burkholderia* sp. Associados ao controle biológico *de Pectobacterium carotovora* / Emy Tiyo Mano. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Welington Luiz de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – 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: Genética molecular e de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Identification of genes of *Burkhoderia* sp. associated with biological control of *Pectobacterium carotovora*.

Descritores: 1. *Burkhoderia* 2. Controle biológico 3. Transposon Tn5 4. Podridão mole 5. Clonagem gênica I. Araújo, 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/SBIB023/2011

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 Dissertação: Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de *Pectobacterium carotovora*.

Orientador(a): Welington Luiz de Araújo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

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 amigos e ao meu amor, por
me acompanharem nessa jornada,
tornando-a mais feliz

OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por sempre estar ao meu lado, me ajudando a levantar em cada queda, e cada vez mais forte. Sem ele nada disso seria possível;

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, pela oportunidade dada, pela confiança depositada em meu trabalho e pela compreensão e carinhos dispensados a mim em momentos difíces;

Á Profa. e colega Dra. Viviane Colombari Pedrazzini dos Santos, pela amizade, pela troca de experiências, e o apoio que me concedeu quando precisei;

Á hoje pesquisadora da EMBRAPA, pelo seu profissionalismo e dedicação, Léia Cecília de Lima Fávaro, grata pelo auxílio em várias etapas deste trabalho, pelas valiosas sugestões, discussões enriquecedoras, pelas risadas nos intervalos de experimentos e pela amizade;

Á Aline Aparecida Camargo das Neves, pela parceria no projeto Burkholderia, pelas horas e horas quebrando a cabeça juntas, pelas conquistas compartilhadas, pelo apoio mútuo em várias etapas deste projeto;

À Manu da ESALQ, pela contribuição nas etapas finais desse trabalho, e pela amizade e os braços abertos com que sempre nos recebeu;

Ao Laboratório de Genômica Estrutural, no Núcleo Integrado de Biotecnologia, pela colaboração e disponibilização de equipamentos do Laboratório de Genômica Estrutural;

À todos os colegas, ao pessoal da secretária da pós e aos professores do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, embora o pouco tempo que tivemos contato em disciplinas, burocracias e seminários, pela troca de experiências e conhecimentos que contribuíram para o meu crescimento científico;

À minha grande amiga Juliana Satie ishilawa, por ser essa pessoa maravilhosa que é, pela sinceridade, pelo ombro amigo nos momentos de frustação, pelas conversas, pelos conselhos, pelas risadas, pela confiança que deposita em mim. Por todo apoio e compreensão que sempre me concedeu desde os tempos da graduação;

Á minha família que é responsável pela minha existência, pelos meus primeiros passos, que me ensinaram a caminhar sozinha;

Ao Gabriel Mello, pelo carinho, pela dedicação, por tudo que me ensinou, pelos sorrisos arrancados depois de um dia difícil;

À todos os amigos e colegas que estiveram presentes, mesmo que distantes, mesmo que em raros encontros, obrigada por tornarem meus dias mais felizes durante essa jornada;

Ao triozinho que me dá muita alegria no laboratório, Almir, Felipe e Tela, pela dedicação, amizade, momentos de risadas e a admiração;

Às novas integrantes do projeto Burkholderia, Ana Carla e Silvinha, pela paciência em aprender, pela colaboração, pela amizade, pelos ótimos momentos que me proporcionaram na reta final deste trabalho;

Aos amigos e agregados de sofrimento e diversão, do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana, do Núcleo Integrado em Biotecnologia, minha segunda casa, aos que aqui estão, aos que se foram, aos que estão chegando. De onde tenho muitas histórias, muitas lembranças, muitos momentos de alegria, amigos e parceiros: Zezito, Fê, Linoca; Fer Caravieri, Marília, Gabi, Fernandinha, Silvinha, Ana Carla, Monick, Fer Storte, Roberta, Tela, Carol, Jana, Lú, Manu, Léia.

À todos os colegas do Núcleo Integrado de Biotecnologia, pela colaboração e a amizade: Marie, Carolzinha, Rodrigo, Ju Viana, Ju Biasi, Laura, Willian, Jackeline, Deibs, Daienne, Ana Claúdia.

À todos os colegas do Laboratório de Bioquímica de Plantas, do Departamento de Genética da Esalq, pela amizade e carinho com que me receberam em minhas idas a Piracicaba;

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro (N° Processo 08/52406-2 e 08/52407-9);

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

"A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu e pensar o que ninguém pensou."

Jonathan Swift

RESUMO

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, 2011.

A bacteria *Pectobacterium carotovora* causa danos a diferentes hospedeiros por meio da produção de enzimas pectinolíticas que degradam o pectato de cálcio da lamela media próximo a parede celular, causando extravasamento do conteúdo celular e consequentemente a podridão mole. Em orquídeas, as lesões ocorrem inicialmente nas folhas e avançam sobre os tecidos até atingir o pseudocaule, causando a morte da planta. Sua virulência é dependente das interações com o seu hospedeiro, com outros microrganismos, e com o ambiente. Resultados recentes demonstraram que bactérias endofíticas do gênero *Burkholderia* são capazes de controlar a podridão mole em orquídeas, e tem sido observado em *Oncidium* que a aplicação da bactéria pode reduzir em até 100% os sintomas da podridão mole. No entanto, os aspectos moleculares envolvidos neste controle ainda não foram estudados. Neste trabalho, 602 em um total de 1788 transformantes foram caracterizados quanto a sua habilidade em inibir os sintomas da podridão mole causada pela *P. carotovora.* , onde foram observados 16 mutantes com alteração no padrão de inibição e/ou a perda da capacidade total em controlar a doença quando comparado à linhagem selvagem. Entre estes mutantes foram encontrados sete diferentes genes inativados pelo transposon, sendo estes: região intermediária de uma proteína semelhante à patatina; glicosiltransferase; proteína hipotética com sequências traço do 23S rRNA; glutamato sintase; proteína transportadora da família facilitadora principal; poli-beta-hidroxialcanoato depolimerase e ácido graxo desaturase. Estes genes podem estar envolvidos em processos de síntese de aleloquímicos, competição por nutrientes, adaptação a condições ambientais, e na interação com o hospedeiro e/ou entre microrganismos. No entanto, o envolvimento destes genes na perda da capacidade em controlar a podridão mole deve ser melhor estudado.

Palavras-chave: *Burkholderia*. Controle biológico. Transposon Tn5. Podridão mole. Clonagem gênica.

ABSTRACT

MANO, E. T. **Identification of genes of *Burkhoderia* sp. associated with biological control of *Pectobacterium carotovora.*** 2011. 99 p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The bacterium *Pectobacterium carotovora* cause damage to different hosts and by production of pectic enzymes that degrade calcium pectate of the middle lamella near of the cell wall, causing overflow of cell content and consequently the soft rot. In *Orchids*, the lesions occur initially in the leaves by tissues macerating , and reach the pseudo-stem causing the plant death. The virulence depend on the interactions the pathogen and the host plant as well as with other microorganisms, and the environment. Recent results has show that endophytic bacteria belonging to *Burkholderia* genus were able to control the soft rot in *Orchids*, and has been observed in *Oncidium* that the application of these bacteria reduce up to 100% the soft rot symptoms. However, the molecular aspects involved in the control have not been studied. In this work, 602 of a total 1788 transformants were characterized for their ability to inhibit soft rot caused by *P. carotovora*. We identified 16 mutants showing shifts in inhibition pattern or lost of the ablitity to inhibit soft rot symptoms. Among these mutants, we identified 7 genes related to disease inhibition: phospholipase like patatin protein region intermediate; glycosiltransferase protein; hypothetical protein with 23S rRNA sequences traces; glutamate synthase; major facilitator transporter protein; poli-beta-hidroxyalkanoate depolymerase; and fatty-acid desaturase. These genes may be involved in process of allelochemicals synthesis, competition for nutrients, adapting to environmental conditions, and interaction between the host and microorganisms. However, the involvement of these genes in loss of ability to control the soft rot disease is being further studied in details.

Key words: *Burkholderia*. Biological control. Transposon Tn5. Soft rot. Cloning gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp (Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA) utilizado para mutagênese aleatória 38

Figura 2. Croqui experimental dos ensaios de controle da podridão em câmara úmida. Ensaio fenotípico dos mutantes (5 µL da cultura diluída 1^{-10} mutante Tn5 + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} *Pca*); Controle negativo (5 µL da cultura diluída 1-^{10} *Pca*); Controle positivo (5 µL da cultura diluída 1-^{10} da *Burkholderia*.sp. TC3.4.2R3 (selvagem) + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da *Pca* 39

Figura 3. Fragmentos foliares de *Oncidium* Aloha Iwanaga inoculados com culturas liquidas de *P. carotovora* 11ORDF-04F (a) 16ORDF-03J (b) e o controle negativo tampão de diluição PBS (c) 45

Figura 4. (a) Plantas adultas de *Oncidium* Aloha Iwanaga mantidas em casa de vegetação. Confirmação dos sintomas da podridão mole em tecidos foliares de plantas adultas de *Oncidium* Aloha Iwanaga causada pela (b) *P. carotovora* 11ORDF-04F e (c) *P. carotovora* 16ORDF-04F..... 46

Figura 5. Isolados de *Burkholderia* sp. capazes de inibir a podridão mole. Os quatro primeiros fragmentos foram inoculados com o isolado de *Burkholderia* + *P. carotovora* (*Pca*) e o 5° fragmento apenas com *Pca* 47

Figura 6. Zona de inibição da linhagem *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 frente a bactéria *P. carotovora* 11ORDF-04F. As setas indicam o halo de inibição 48

Figura 7. Zona de inibição dos 16 mutantes Tn5 defectivos no controle da podridão mole, frente a *bactéria P. carotovora* 11ORDF-04F 49

Figura 8. Amplificação do gene *recA* parcial do isolado de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 por PCR. Gradiente utilizando o par de primers BUR-1 e BUR-2. (A) 65.0°C, (B) 64.0°C, (C) 62.3°C, (D) 59.5°C, (E) 55.7°C, (F) 53.0°C, (G) 51.1°C, com amplificação de um fragmento de 869pb. Marcador de peso molecular (M) Gene Ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas Life Sciences, Brasil) 50

Figura 9. Árvore filogenética das espécies de *Burkholderia* baseado no alinhamento de sequências parciais do gene *recA*. O isolado TC3.4.2R3 é suportado em um ramo mais próximo a espécie *Burkholderia cepacia*. Agrupamento calculado pelo método Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com bases nas matrizes de distância genética calculadas pelo Método Kimura-e-Parameter 52

Figura 10. Ensaios de controle da podridão mole por mutantes *Burkholderia* Tn5. Mutantes TC3.4.2R3 Tn5 defectivos no controle da podridão (*Pca*+*Burk*Tn5); *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 selvagem + *Pca* (*Pca*+*Burk*115R-B8); *P. carotovora* (*Pca*) 53

Figura 11. Ensaios de controle da podridão mole pelos 16 mutantes defectivos que tiveram seu gene noucauteado seqüenciado. Três fragmentos (superior e lateriais) contedo 5 µL da cultura diluída 1^{-10} mutante Tn5 + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} *Pca*; Controle negativo (fragmento central) contendo 5 µL da cultura diluída $1-^{10}$ *Pca*; Controle positivo (fragmento inferior) contendo 5 µL da cultura diluída $1-^{10}$ da *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 (selvagem) + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da *Pca* 54

Figura 12. PCR para detecção da inserção do transposon no genoma de mutantes Tn5 utilizando o par de primers Tn5Fw e Tn5Rw, e amplificação de um fragmento de 399pb. A amplificação não ocorreu para a *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 selvagem. Marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA ladder (Fermentas Life Sciences, Brasil) 55

Figura 13. PCR para detecção da inserção do transposon no genoma de mutantes Tn5 utilizando o par de primers Tn5F e Tn5R, e amplificação de um fragmento de 399pb. A amplificação não ocorreu para a *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 selvagem. Marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA ladder (Fermentas Life Sciences, Brasil) 55

Figura 14. DNA plasmidial contendo o transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2> extraído de células de *E. coli* DH5α-*pir* e clivados com a enzima de restrição *EcoRI* para linearização do DNA circularizado 57

Figura 15. Contexto genômico da inserção do transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2> no DNA do mutante de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M01, flanqueando uma proteína hipotética da superfamília das ferritinas (a jusante) e uma proteína semelhante a patatina (a montante) 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Código de identificação, local de isolamento e hospederio das linhagens de *Burkholderia* sp. avaliadas quanto a capacidade de inibir os sintomas de podridão mole causada por *P. carotovora* 32

Tabela 2- Produção de agentes antimicrobianos *in vitro* contra *P. carorotova*, pelos isolado selvagem *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 e mutantes defectivos no controle da podridão mole em fragmentos foliares de *Oncidium* Aloha Iwanaga 49

Tabela 3- Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga 58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

QS	Quorum sensing
HSL	Homoserina Lactona
SAR	Systemic Adquired Resistance
HR	Hipersentive Reaction
IRS	Induced Resistance Systemic
PAL	Fenilalanina Amônia Liase
CHS	Chalcona-sintase
IS	Interference Signal
BCC	Complexo Cepacia
CF	Cystic Fribrosis
Pca	*Pectobacterium carotovora*
LGM	Laboratório de Genética de Microrganismos
TSA	Trypic Soy Agar
TSB	Trypic Soy Broth
LB	Luria Bertani
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PCR	Polymerase Chain Reaction
ORF	Open Reading Frames
NCBI	Nacional Center of Biotechnology Information
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
PLA	Phospholipase A
SER	Serina
HIS	Histidina
ASP	Aspartato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**

2 REVISÃO DA LITERATURA **17**

2.1 Cultivo de flores e plantas ornamentais no Brasil **17**

2.2 Cultivo de orquídeas **17**

2.3 *Pectobacterium carotovora* agente causal da podridão mole **18**

2.4 Controle biológico **20**

2.5 Utilização de *Burkholderia* no controle de patógenos **23**

2.5.1 Aspectos gerais **23**

2.5.2 Uso de Burkholderia no controle biológico de fitopatógenos **25**

2.6 Ferramentas moleculares para determinação da função de genes **27**

3 OBJETIVOS **31**

3.1 Objetivos gerais **31**

3.2 Objetivos específicos **31**

4 MATERIAIS E MÉTODOS **32**

4.1 Linhagens bacterianas de *P. carotovora* e *Burkholderia* sp. **32**

4.2 Inoculação de *P. carotovora* e confirmação da patogênese **34**

4.3 Seleção de *Burkholderia* para geração dos mutantes Tn5 através da interação *Burkholderia* sp. e *P. carotovora* em *Oncidium* Aloha Iwanaga **34**

4.4 Teste de sensibilidade a canamicina *nptII* (neomicina fosfotransferase II) **34**

4.5 Análise da atividade antimicrobiana in vitro de *Burkholderia* sp. contra *P. carotovora* pelo Método de Sobrecamada (*Spot-on-the-law*) **35**

4.6 Identificação molecular do isolado selvagem de *Burkholderia* sp. por meio da análise parcial do gene *recA* **35**

4.7 Mutagênese de *Burkholderia* sp. utilizando transposon Tn5 ..... **37**

4.8 Seleção de mutantes quanto a perda da capacidade de controlar a podridão mole causada por *P. carotovora* em *Oncidium* Aloha Iwanaga **38**

4.9 Caracterização, clonagem e seqüenciamento das regiões que flanqueiam o transposon em mutantes defectivos no controle da podridão mole **39**

4.9.1 Extração do DNA bacteriano **39**

4.9.2 Confirmação da inserção do transposon Tn5 por PCR **40**

4.9.3 Tratamento do DNA genômico para clonagem das regiões flanqueadoras do transposon PCR **41**

4.9.4 Geração de células eletrocompetentes de Escherichia coli DH5α-pir 42
4.9.5 Transformação de células de Escherichia coli DH5α-pir com fragmentos de DNA contendo o transposon Tn5 42
4.9.6 Extração do DNA plasmidial de clones Tn5 de E. coli DH5α-pir 43
4.9.7 Sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon 43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Confirmação da patogênese de *P. carotovora* 45
5.2 Seleção de *Burkholderia* para geração dos mutantes Tn5 através da interação *Burkholderia* sp. e *P. carotovora* em *Oncidium* Aloha Iwanaga 46
5.3 Análise da atividade antimicrobiana de *Burkholderia* sp. contra *P. carotovora in vitro*.48
5.4 Identificação molecular do isolado selvagem de *Burkholderia* sp. por meio da análise da sequência parcial do gene *recA* 50
5.5 Obtenção de mutantes Tn5 de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 52
5.6 Seleção de mutantes Tn5 defectivos no controle da podridão mole de *Oncidium* Aloha Iwanaga causada por *P. carotovora* 53
5.7 Confirmação da inserção do transposon Tn5 por análise de PCR 54
5.8 Clonagem, seqüenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon Tn5 . 55
5.8.1 Mutante com inserção da região intermediária da Patatina 57
5.8.2 Mutantes com inserção na região codificadora de Proteínas Hipotéticas com traços da sequência do 23S rDNA 66
5.8.3 Mutantes com inserção na região codificadora da Glicosil-transferase do Grupo I 69
5.8.4 Mutantes com inserção na região codificadora da Glutamato Sintase (ferredoxina)... 71
5.8.5 Mutantes com inserção na região codificadora dos Transportadores da Superfamília Facilitadora Principal (MFS) 73
5.8.6 Mutante com inserção na região codificadora da Poli-beta-hidroxialcanoato Depolimerase 75
5.8.7 Mutantes com inserção na região codificadora da Ácido-graxo Desaturase 76
6 CONCLUSÃO 79
REFERÊNCIAS 80

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas constituem um dos mais apreciados grupos de plantas ornamentais exploradas comercialmente no Brasil, sendo que, dentre os setores agrícolas em fase de expansão, seu cultivo vem se destacando. No entanto, essa intensificação na produção visando atender a demanda no mercado, resultou em um aumento no ataque de várias doenças e pragas. A implantação de monoculturas, manejo inadequado, incluindo a reciclagem de água de irrigação, eliminação de inimigos naturais por aplicação de produtos químicos não seletivos, mudanças de temperatura e umidade, resultam em alterações físicas, químicas e biológicas, que podem tornar a cultura vulnerável ao ataque de patógenos.

A podridão mole causada pela bactéria *Pectobaterium carotovora* é citada como uma das principais doenças encontradas em orquídeas. Estas bactérias infectam a planta hospedeira geralmente sobre alta umidade, onde produzem enzimas que degradam os pectados de cálcio da lamela média junto à parede celular, resultando em danos celulares com derramamento do conteúdo celular e necrose do tecido. Esta bactéria é um patógeno oportunista, e a sua virulência é dependente das interações com seu hospedeiro e microrganismos que ocupam o mesmo nicho, além da interação com o ambiente, como nutrientes e quantidade de água livre disponíveis, temperatura e tensão de oxigênio.

Atualmente, somente o controle químico, com custo elevado, tem apresentado resultados positivos na prevenção da podridão mole, mas é importante ressaltar o agravamento a longo prazo do uso intensivo de agroquímicos, tanto no aspecto da saúde humana como ao meio ambiente. No contexto de alternativas mais naturais para a contenção de patógenos, o controle biológico tem sido uma alternativa, principalmente quando empregado em conjunto com outros métodos, pois apresenta um menor custo e agressividade ao ecossistema comparado ao tratamento químico.

Experimentos em campo mostram que bactérias do gênero *Burkholderia* são capazes de colonizar uma variedade de plantas, aumentando significativamente o seu crescimento, além de reduzir a presença de patógenos. O controle biológico utilizando burkholderias poderia substituir parcialmente a utilização de pesticidas químicos comuns, visto que já foi relatada uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por *Burkholderia* sp., tais como cepacinas, pirrolnitrinas, cepaciamidas, cepacidinas, alteridinas, quinolonas, fenazinas, sideróforos e lipopeptídeos. Entretanto, o envolvimento destes metabólitos, assim como os mecanismos de controle não são bem conhecidos para esta

bactéria.

O controle de *P. carotovora* em *Oncidium flexuosum* foi demonstrado em estudo utilizando isolados endofíticos, onde apenas isolados de *Burkholderia* obtidos de eucalipto e cana-de-açúcar foram capazes de inibir o aparecimento dos sintomas da podridão mole em fragmentos foliares. Testes *in planta*, com a inoculação conjunta de *P. carotovora* e *Burkholderia* sp. resultaram no controle de 100% dos sintomas. Apesar do cenário favorável, existe uma baixa adoção do controle biológico em campo, em parte, por incerteza de sua eficácia, sendo necessário avaliar, por meio de estudos apropriados, os fatores que determinam o sucesso do agente de biocontrole. A supressão de doenças é resultado de uma interação complexa entre o antagonista, o patógeno, a planta hospedeira e a comunidade associada, além de fatores ambientais, sendo, portanto de grande interesse a sua compreensão.

Deste modo, este trabalho tem o intuito de identificar, por meio da obtenção e análise de uma biblioteca de mutantes gerados por mutagênese aleatória com o transposon Tn5, quais os possíveis mecanismos envolvidos no controle da podridão mole de *P. carotovora* por uma linhagem endofítica de *Burkholderia* sp. Os resultados obtidos poderão permitir uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na complexa interação da tríade patógeno-hospedeiro-agente de controle biológico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cultivo de flores e plantas ornamentais no Brasil

O registro histórico mais antigo de produção de flores no Brasil foi relatado no Orquidário Binot, em Petrópolis, no Rio de Janeiro, fundado em 1870 por Pedro Maria Binot, filho do francês Jean Baptiste Binot, encarregado de projetar e executar os jardins do Palácio Imperial. A posteriori, destaque foi dado aos alemães Dierberger que deram início a produção de outras variedades de flores no Brasil, como as dálias. Em 1893, a família Dierberger, proprietária de um empório de frutas em São Paulo, iniciaram a produção de flores como uma atividade paralela à fruticultura. Em 1929, dois ex-funcionários da fazenda Dierberger, os irmãos Boetcher, deram início a produção de rosas no Brasil em uma chácara localizada no atual bairro do Jabaquara. Logo, em 1933, os irmãos Boetcher compraram uma fazenda em Cotia, no interior de São Paulo, e hoje abriga a conhecida Roselândia. Muitos outros tantos eventos, como a criação da primeira cooperativa no futuro Município de Holambra (SP) em 1972, hoje o maior Município produtor de flores do Brasil, fizeram com que São Paulo se consolidasse como o maior Estado produtor e comercializador nacional de flores e plantas ornamentais (SEBRAE AGRONEGÓCIOS, 2005).

As regiões Sul e Sudeste concentram grande parte dos produtores nacionais de plantas ornamentais, destaque ao Estado de São Paulo, que detêm 80% da comercialização de plantas ornamentais no país (KAMPF, 1997). Em termos globais, estima-se que a produção de flores gere mais de 120 mil empregos, dos quais 58 mil (48,3%) estão localizados na produção; 4 mil (3,3%), na distribuição; 51 mil (42,5%), no comércio varejista; e 7 mil (5,9%), em outras funções, principalmente nos segmentos de apoio (SEBRAE AGRONEGÓCIOS, 2005).

2.2 Cultivo de orquídeas

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, uma das maiores famílias de Angiospermas, com 700 gêneros e 3500 espécies diferentes (MORAES; CALVACANTE; FARIA, 2002). Sob um contexto econômico, constituem um dos mais apreciados grupos de plantas ornamentais exploradas comercialmente no Brasil (MAFIA et al., 2005), e dentre os setores agrícolas em fase de expansão, seu cultivo vem se destacando. Entre os gêneros de orquídeas cultivadas, destacam-se *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Cymbidium*,

Oncidium, *Vanda*, *Lycaste*, *Miltonia* e *Paphiopedilum*.

O aumento na produção de orquídeas visando atender a expansão da demanda no mercado, resultou em um aumento no ataque de várias doenças e pragas. A implantação de monoculturas, manejo inadequado, incluindo a reciclagem de água de irrigação, eliminação de inimigos naturais por aplicação de produtos químicos não seletivos, mudanças de temperatura e umidade, resultam em alterações físicas, químicas e biológicas, que podem tornar a cultura vulnerável ao ataque de patógenos (DAUGHTREY; BENSON, 2005; VALARINI, 2006; RAAIJMAKERS et al., 2008). A importação de mudas não certificadas pode introduzir novas pestes agrícolas no país, como ocorrido com a ferrugem causada pelo fungo *Puccinia horiana*, originário da China e Japão (CAVE; THOMAS, 2003). Em orquídeas, inúmeras doenças e pragas têm sido registradas, sendo estas causadas por artrópodes, moluscos, fungos, bactérias, e pelo menos 27 diferentes vírus (CAMPOS, 2002; DUFF; DALY, 2002).

Chia-Hui et al. (2003) citam a podridão mole causada pela bactéria *P. carotovora* como uma das principais doenças encontradas em orquídeas. Atualmente, somente o controle químico, com custo elevado, tem apresentado resultados positivos na prevenção da doença (MINAMI, 2006), mas é importante ressaltar o agravamento a longo prazo do uso intensivo de agroquímicos, tanto no aspecto da saúde humana como ao meio ambiente.

2.3 *Pectobacterium carotovora* agente causal da podridão mole

As pectobactérias compreendem bactérias Gram-negativas, geralmente fitopatógenos produtores de enzimas pectinolíticas (HYYTIÄINEN, 2005), da qual fazem parte: *Pectobacterium carotovora*, *P. atroseptica*, *P. betavascularum*, *P. wasabiae*, *P. odorifera*, *P. chrysanthemi* e *P. cypripedii*. Em termos de taxonomia e nomeclatura, *Erwinia* e *Pectobacterium* são nomes com validade para publicação referente a este grupo de bactérias (HAUBEN et al., 1998; AVROVA et al., 2002).

As pectobactérias infectam a planta hospedeira geralmente sobre alta umidade, onde a presença de água livre permite que a célula bacteriana mova-se mais facilmente sobre os tecidos, e/ou pode também reduzir a quantidade de oxigênio disponível, criando um ambiente micro-aeróbico ou anaeróbico favorável à sua instalação (BOLWELL; WOGTASZEK, 1997). Após a infecção, estas bactérias produzem enzimas que degradam pectatos de cálcio da lamela média junto à parede celular, resultando em danos celulares com derramamento do conteúdo celular e necrose do tecido. Sua entrada na planta pode ocorrer por meio de

ferimentos ou aberturas naturais, permanecendo nos espaços intercelulares ou na parede fina dos tecidos parenquimáticos (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Patógeno oportunista, sua virulência é dependente das interações com seu hospedeiro e microrganismos ocupando o mesmo nicho, além da interação com o ambiente, como nutrientes e quantidade de água livre disponíveis, temperatura e tensão de oxigênio (TOTH et al., 2003).

As pectobactérias são capazes de matar os tecidos das plantas rapidamente. As três espécies de maior impacto econômico são: *P. carotovora*, *P. atroseptica* e *P. chysanthemi*, as quais compartilham a capacidade de produzir um arsenal de enzimas extracelulares que degradam a parede celular. Estas enzimas são secretadas por sistemas específicos, sendo as pectinolíticas (pectato e pectinas liases e poligalacturonases) e celulases secretadas pelo sistema do tipo II, e as proteases pelo sistema I (MCEVOY; MURATA; CHATTERJEE, 1990; HYYTIÄINEN, 2005). As proteases (Prt) não atuam diretamente na degradação da parede celular, mas contribuem para a virulência do patógeno, pois podem agir sobre proteínas, reprimindo a resposta de defesa da planta durante seu crescimento (MARITS et al., 1999).

A ação de enzimas líticas é o item central para o desenvolvimento da podridão mole, mas a motilidade, lipopolissacarídeos, sideróforos, genes *hrp*, proteínas Nep-like, fatores contra os efeitos nocivos do oxigênio ou peptídeos antimicrobianos (RANKATARI et al., 2001; HOLEVA et al., 2004), e uma ação coordenada da bactéria patogênica (ANDERSSON et al., 2000), podem afetar os estágios de início, estabilização e progressão da infecção.

A motilidade tem aparecido como um fator determinante em *Erwinia*, e linhagens mutantes Mot^- foram menos virulentas, embora produzissem os mesmos níveis de enzimas extracelulares (PÉROMBELON; WOLF, 2002; PIRHONEN et al., 1991). Os lipopolissacarídeos, componentes da membrana externa, podem contribuir para a resistência a compostos antimicrobianos derivados da planta (DOW; NEWMAN; VON ROEPENACK, 2000). Os sideróforos podem conferir vantagem na captação e homeostase de ferro, e em *Erwinia* são postulados como tendo uma função protetora contra o estresse oxidativo, especialmente contra níveis tóxicos de ferro (EXPERT, 1999).

Genes *hrp* em bactérias Gram-negativas estão envolvidos na Resposta de Hipersensibilidade (HR) e codificam um produto envolvido no sistema de secreção do tipo III (de BOER, 2003). Propõe-se que sua função seja translocar proteinases determinantes de virulência e não-virulência (Avr) para dentro da planta, capazes de disfarçar ou retardar sua resposta de defesa, permitindo às bactérias se multiplicarem rapidamente nos estágios iniciais da infecção até atingir uma densidade suficientemente alta para iniciar um ataque concentrado

de enzimas (BAUER et al., 1994). As Nep1-like (NLPs) pertencem a uma nova família de proteínas em diversos fungos e bactérias, tendo função análoga a HprN, não secretada pelo sistema tipo III (PEMBERTON; SALMOND, 2004).

Mecanismo similar a ação dos genes *hrp*, a comunicação via *Quorum sensing* (QS) envolve moléculas sinais difusíveis também chamadas de autoindutores ou ferormônios. A concentração extracelular de moléculas QS está relacionada com a densidade populacional de quem a produziu, e permite a população como um todo iniciar uma ação coordenada quando uma densidade populacional crítica é atingida, garantindo sucesso em infestações patogênicas, uma vez que o disparo de fatores de virulência prematuramente pode alertar os sistemas de defesa do hospedeiro (FAST, 2003). Diversos processos fisiológicos são regulados por *Quorum Sensing*, incluindo a bioluminescência, biossíntese de antibióticos, infestações, diferenciação do biofilme, conjugação e a produção de determinantes de virulência em animais, peixes e patógenos de plantas. Em *Erwinia carotovora*, moléculas QS têm sido descritas como participando da regulação de fatores de virulência, proteases, celulases, pectinases e produção de antibiótico (5R)-Carbapen-2-em-3-ácido carboxílico (BOSGELMEZ-TINAZ, 2003).

2.4 Controle Biológico

A necessidade de aumento na produção tornou agricultores cada vez mais dependentes de agroquímicos, pois seu uso tem desempenhado relativo sucesso, auxiliando na produção e estabilidade econômica (COMPANT et al., 2005). Mas seu uso crescente pode causar efeitos negativos severos, como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas; resíduos no solo e em alimentos; aumento da resistência em populações de patógenos e pragas; efeitos sobre organismos não-alvo; além do potencial carginogênico de alguns agentes (ZAKI; MISAGHI; HEYDARI, 1998; DUFFY; SHOUTEN; RAAIJMAKERS, et al., 2003).

O controle biológico é uma alternativa, principalmente quando empregado em conjunto com outros métodos, pois apresenta um menor custo e agressividade ao ecossistema comparado ao tratamento químico (AZEVEDO; MACCHERONI; ARAÚJO, 2000). Além disso, existem inúmeras doenças para as quais o controle químico é ineficiente ou inexistente, sendo o controle biológico uma forma suplementar ao uso de agroquímicos (GERHARDSON, 2002).

Apesar do cenário favorável, existe uma baixa adoção do controle biológico no

campo, em parte, por incerteza de sua eficácia, sendo necessário avaliar os fatores que determinam o sucesso do agente de biocontrole com estudos mais aprofundados. A supressão de doenças é resultado de uma interação complexa entre o antagonista, o patógeno, a planta hospedeira e a comunidade associada, além de fatores ambientais (OJIAMBO; SCHERM, 2006).

Diversas rizobactérias de vida livre e bactérias endofíticas utilizam os mesmos mecanismos para promover o crescimento de plantas e controlar fitopatógenos (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Agentes potenciais para o controle biológico apresentam uma colonização eficiente das raízes combinada com a habilidade em proliferar durante um período considerável de tempo. A superfície das raízes e a rizosfera concentram fontes de carbono provenientes dos exsudados das raízes (a exemplo, os ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares específicos, mucilagem), uma zona de alocação de carboidratos e metabólitos da planta, resultando em um nicho com disponibilidade de nutrientes adequados a atração de uma grande diversidade de microrganismos, atuando na seleção de colonizadores (FILONOW et al., 1996; BRENCIC; WINANS, 2005; MORGAN; BENDING; WHITE, 2005).

Agentes aleloquímicos fazem parte dos exsudados, e incluem os sideróforos, antibióticos, biocidas voláteis, enzimas líticas e enzimas de detoxificação. Os sideróforos atuam na captação de ferro, essencial para o crescimento. Em geral, os sideróforos bacterianos apresentam vantagem em comparação aos de fungos patogênicos em condições onde o ferro é limitado. Isso ocorre devido ao fato de alguns sideróforos, como as pseudobactinas de pseumonados, apresentarem uma afinidade a Ferro (III), formando ligações mais estáveis e equilibradas se comparada aos sideróforos de fungos (BUYER; SIKORA, 1990).

Os antibióticos comportam uma classe de aleloquímicos do metabolismo secundário com produção modulada pelo status metabólico da célula, dependente da disponibilidade de nutrientes e estímulos ambientais, influenciando na capacidade de supressão de patógenos e auxiliando na sua permanência junto ao hospedeiro (STURZ; CHRISTIE, 2003). Além disso, microrganismos portadores de uma maquinaria de detoxificação destes compostos, como as bombas de efluxo de drogas, que parecem contribuir significamente para a resistência bacteriana adquirida, podem apresentar vantagem na colonização (BAMKEKE; BALZI; TULKENS, 2000). Outra forma de detoxificação pode ser obtida através de proteínas codificadas por bactérias que se ligam de forma reversível a antibióticos, tornando-os inativos ou incapazes de realizar sua atividade antimicrobiana (BASNAYAKE; BIRCH, 1995).

Uma grande variedade de microrganismos pode apresentar atividade hiperparasítica,

produzindo hidrolases (quitinases, proteases, glucanases e laminarinases), atacando patógenos, impedindo a germinação de esporos fúngicos, digerindo e lisando micélios, e destruindo a integridade da parede celular de fungos. Papel fundamental pode ser atribuído às enzimas capazes de detoxificar e degradar fatores de virulência. A enzima albicidina produzida por *Pantoea dispersa* é capaz de atenuar a patogenicidade de *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar (ZHANG; BIRCH, 1997), e diferentes microrganismos, incluindo *B. cepacia* e *Ralstonia solanacearum*, hidrolisam o ácido fusárico, uma fitotoxina produzida por espécies de *Fusarium* (COMPANT et al., 2005).

Certas bactérias são capazes de disparar um fenômeno de resistência na planta. Zeller (2006) divide tal fenômeno em duas categorias. A primeira, a resistência sistêmica adquirida – SAR (Sistemic Acquired Resistance), se desenvolve 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. O segundo, uma resistência desenvolvida sistemicamente é a resistência sistêmica induzida - ISR (Induced Sistemic Resistance), mediada por uma via sensitiva ácido jasmônico/etileno e não envolve a expressão de proteínas-PR. Ambas são efetivas contra diferentes tipos de patógenos, mas a ISR difere por não causar sintomas visíveis na planta. Rizobactérias de vida livre e bactérias endofíticas têm sido envolvidas na ISR, e diversos traços bacterianos são propostos para seu disparo: atividade do flagelo, produção de sideróforos, lipopolissacarídeos, densidade populacional, e mais recentemente, compostos orgânicos voláteis (BAKKER et al., 2003). A ISR envolve o fortalecimento da planta com maior resistência da parede celular, com depósito de calose, e alteração nas respostas metabólicas, com acúmulo de compostos fenólicos e outros defensivos químicos, como peroxidases, fenilalanina amônia liase (PAL), fitoalexinas, polifenol oxidase e chalcona-sintase (CHS), após colonização por bactérias endofíticas (BENHAMOU et al., 1996; CAMPOS et al., 2003).

Embora a ISR tenha uma característica de baixa especificidade, alguma especificidade é aparente. A ISR é mais efetiva contra fungos, apresenta uma efetividade menor contra bactérias, e menos efetiva contra viroses sistêmicas, além disso, alguns agentes químicos que induzem a ISR podem ser mais efetivos contra uma doença que a outras, pois os compostos produzidos não são igualmente eficientes contra os patógenos (KÚC, 2000).

Uma nova estratégia de controle de *E. caratovora* foi relatada por Dong, Zhang e Zhang (2004), onde a bactéria *Bacillus thuringiensis* foi capaz de inibir sua virulência por

meio da produção de um sinal de interferência (IS), a AHL-lactonase, uma enzima capaz de degradar AHL (Acil-homoserina lactona), mas que não interfere no crescimento do patógeno. Em *E. carotovora*, a molécula Quorum Sensing (QS) AHL é essencial na regulação da produção de antibióticos e expressão de genes de virulência. A ocorrência da produção de enzimas capazes de degradar AHL tem sido relatada em *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Variovorax paradoxus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e diferentes espécies de *Bacillus.* A investigação dos mecanismos moleculares da regulação gênica destas enzimas tem sido alvo de interesse para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas, no controle de infestações patogênicas.

Assim como o monitoramento da população é crucial para o disparo coordenado de genes de virulência, moléculas QS podem também estar associadas a fatores de biocontrole, coordenando a expressão de genes ligados a produção de metabólitos antimicrobianos extracelulares e enzimas. Haas, Keel e Reimmann (2002) citam que a produção de certos compostos como antibióticos e enzimas líticas podem estar sob controle da GacS/GacA, uma molécula sinal responsável por ativar uma série de vias de transdução de sinais ainda desconhecidas, postulada como importante fator no controle pós-traducional, embora seu envolvimento no biocontrole não é claro.

2.5 Utilização de *Burkholderia n*o controle de patógenos

2.5.1 Aspectos Gerais

O gênero *Burkholderia* compreende bactérias Gram-negativas, aeróbicas, não formadoras de esporos, taxonomicamente pertencente à classe β-proteobacteria. O gênero compreende 65 espécies válidas de acordo com a Lista de Nomes Bacterianos Aprovados (DSMZ, 2010). Possuem grande versatilidade nutricional, capazes de metabolizar mais de 200 diferentes fontes orgânicas de carbono, refletindo em sua capacidade em habitar os mais variados nichos. Podem ser isolados de solos, da rizosfera de inúmeras culturas agrícolas, de ambientes hospitalares, da água (incluindo água do mar), além de várias espécies animais e humanos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Recentemente, bactérias do gênero vêm sendo utilizadas no manejo agrícola (HOLMES; GOVAN; GOLDSTEIN, 1998), exploradas para o biocontrole (MEYER et al., 2001), biodegradação / biorremediação (ADJEI; OHTA, 1999) e promoção do crescimento vegetal (SANTOS; BUSTILLOS; CABALLERO-

MELLADO, 2001; PERIN et al., 2006).

Grande atenção tem sido dada a um grupo de *Burkholderia* em particular, o complexo cepacia. Criado em 1992 por Yabuuki et al. para acomodar um grupo II de homologia de rRNA do gênero *Pseudomonas*, excluindo *P. pickettii* e *P. solanacearum* (gênero *Ralstonia*), seu nome foi concedido em reconhecimento ao trabalho pioneiro de W. Burkholder, quem primeiro descreveu a espécie *P. cepacia* (sin.: *Burkholderia cepacia*). Bactérias deste complexo representam um grupo com pelo menos 9 espécies (ou genomovares) estreitamente relacionadas, coletivamente referidas como Bcc (COENYE et al., 2001b). Inicialmente, o complexo Bcc era dividido em 5 espécies: *Burkholderia cepacia, B. multivorans, B. cenocepacia, B. stabilis* e *B. vietnamiensis* (VERMIS et al., 2002). Posteriormente, testes baseados somente na análise do gene *recA* distinguiram 4 novas espécies para o grupo, *B. dolosa, B. ambifaria, B. anthina* e *B. pyrrocinia* (COENYE et al., 2001a). Estas nove espécies, *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* (III), *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis* (V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII), *B. anthina* (VIII) e *B. pyrrocinia* (IX), compartilham um nível moderado de hibridização DNA-DNA (30-50%), mas uma alta similaridade para genes 16S rRNA (98-99%) e *recA* (94-95%), mas sua classificação não está completamente resolvida e a identificação de espécies ainda é discutível (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005).

Recentemente, foram propostas novas espécies para o complexo por meio da análise filogenética do gene *recA* e de sequências concatenadas de 7 locus (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e *trpB*), sendo estas, *Burkholderia latens, B. diffusa, B. metallica, B. arboris, B. seminalis, B. ubonensis, B. contaminans* e *B. lata* (VANLAERE et al., 2008; VANLAERE et al., 2009).

Existem fortes evidências que membros do complexo Bcc vivem comensalmente em plantas, em íntima associação com as raízes, sendo uma das bactérias mais predominantes na raiz e rizosfera de plantas (BREDJA; KREMER; BROWN, 1994; NACAMULLI et al., 1997; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Seu genoma consiste de replicons múltiplos, com 2 a 4 cromossomos, tamanho total variando de 4 a 9 Mb, e um ou mais plasmídeos, que variam dentro das linhagens de cada genomovar. Possui um grande número de sequências de inserção (IS) que flanqueiam genes podendo facilitar sua movimentação para outros organismos ou entre os organismos no qual ele se insere, sendo responsáveis por causarem um grande numero de mutações e recombinações, promovendo extensa variabilidade genética e fisiológica (LESSIE et al., 1996; PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001).

2.5.2 Uso de Burkholderia no controle biológico 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 (COENYE; VANDAMME, 2003; CHIARINI et al., 2006). 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 foi relatada: cepacinas, pirrolnitrinas, cepaciamidas, cepacidinas, alteridinas, quinolonas, fenazinas, sideróforos e lipopeptídeos, em sua maioria, compostos com atividade antifúngica (PAKKER et al., 1984; HILL et al., 1994; HUANG; WRONG, 1998; MAO et al., 2006), no entanto, o envolvimento destes metabólitos, assim como os mecanismos de controle não são bem conhecidos para burkholderias. Pakker et al. (1984) citaram dois novos antibióticos acetilênicos isolado de *P. cepacia* SC11,783. Os dois compostos foram identificados como cepacina A, que apresentou boa atividade antagônica contra estafilocos e, cepacina B, que apresentou excelente atividade contra estafilococos e outras bactérias gram-negativas.

A detecção da produção de pirrolnitrina por uma linhagem de *P. cepacia* B37w esteve associada a inibição dos sintomas da seca da raiz por *Fusarium sambucinum* (BURKHEAD; SHISLER; SLININGER, 1994). Outra linhagem 5.5B, capaz de suprir a podridão das hastes em *Poinsettia* causada por *Rhizoctonia solani*, foi atribuída à produção de pirrolnitrinas, e linhagens mutantes RR13-1 e UV 19-4, que produziam quantidades 5000 a 20000 vezes menor do metabólito foram menos capazes de inibir a doença. A produção do antibiótico em culturas líquidas foi afetada pelo pH, temperatura e composição do meio, supondo que o mesmo aconteça *in vivo* (HWANG; BENSON, 2002).

Bevinino et al. (2000) observaram que a linhagem de *B. cepacia* MC17, já descrita como excelente agente promotor de crescimento de plantas de milho, foi capaz de controlar a infestação pelo fungo *F. moniliforme* nos estágios iniciais de crescimento da planta, fase em que é observada uma maior densidade da bactéria (NACAMULLI et al., 1997).

Uma bactéria Gram-negativa linhagem 2.2.N identificada como *Burkholderia*, foi capaz de inibir o crescimento de diversas bactérias, leveduras e fungos. Uma zona de inibição

ao redor de frações de cultura de 2.2.N foi observada. A zona de inibição, porém de menor extensão, foi obtida com frações de cultura livre de células obtida por filtração, e culturas pasteurizadas, revelando que a atividade antimicrobiana não depende da presença de células vivas (CAIN et al., 2000)

Heungens e Parke (2000) avaliaram o isolado *B. cepacia* no controle da podridão em ervilha causada pelos oomicetos *Pythium aphanidermatum* e *Aphanomyces euteiches*, em diferentes estágios do ciclo de vida do oomiceto, pós-infecção. Linhagens selvagens AMMDR1 reduziram significativamente a colonização de sementes por *P. aphanidermatum,* e também, a produção de oogonia de *A. euteiches* nas raízes, mas somente quando a bactéria foi inoculada juntamente e em densidades muito altas. Já mutantes 1324, defectivos na antibiose, não exibiram controle significativo em todas as condições avaliadas, sugerindo que este seja o mecanismo primário de controle biológico, mas dependente da densidade do agente de controle, do estágio de desenvolvimento do patógeno, e também da interação com a planta hospedeira.

Minami (2006) avaliou a capacidade de controle da podridão mole *in vivo* causada pela *P. carotovora,* na espécie de orquídea *Oncidium flexuosum*, utilizando 28 bactérias endofíticas isoladas desta mesma planta e 5 isolados de *Burkholderia* obtidos de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Somente burkholderias inibiram o aparecimento dos sintomas da podridão mole em fragmentos foliares, sendo o isolado $SpII_2$, de *Eucalyptus* sp. o mais eficiente. Testes *in planta*, com a inoculação conjunta de *P. carotovora* e *Burkholderia* $SpII_2$ resultou no controle de 100% dos sintomas. Este trabalho difere, pois ao contrário dos inúmeros estudos abordando a aplicação de burkholderias no controle de doenças causadas por fungos e oomicetos, relatos sobre o uso no controle de bactérias patogênicas são escassos.

Um exemplo da aplicação de *Burkholderia* como fórmula comercial de controle biológico foi desenvolvido pela empresa Stine Microbial Products, em 1996. Três anos após, a FIFRA (responsável por definir e regulamentar pesticidas) enviou um mandato que levantava questões sobre os riscos de sua utilização. Embora o fungicida tivesse cumprido todos os requisitos do processo de registro de agentes de controle biológico para uso comercial, inclusive os de interesse a saúde humana, comunidades médicas têm apontado isolados do complexo Bcc como patógenos oportunistas em pacientes com fibrose cística (CF). Questionamentos sobre a distinção taxonômica de linhagens biopesticidas de linhagens com potencial clínico ou nosocomial foram levantadas. A CF é uma doença crônica do trato respiratório que pode levar a lesões graves nos pulmões, ocasionando a chamada “síndrome

cepacia”, uma progressiva falha respiratória com pneumonia necrotrófica que afeta alguns pacientes. A SAP (Science Adivisory Panel), responsável pela concessão do mandato, elaborou um estudo mostrando que os níveis de *B. cepacia* aumentariam em 5% (em comparação a população natural estimada no campo) após aplicação de altas doses do fungicida Denyl. Se o ambiente é visto como um abrigo para linhagens com potencial para desenvolvimento clínico-patológico ou como fonte de genes de virulência, a exposição a estas fontes pode ser considerada significativa. Em 2000, a companhia decidiu cancelar voluntariamente o registro e limitar a distribuição dos estoques remanescentes (COENYE; VANDAMME, 2003).

Todas as espécies do Complexo cepacia já foram isoladas de culturas de saliva de pacientes com fibrose cística, em sua maioria, identificadas como *B. cenocepacia* e *B. multivorans*. Levantamentos da diversidade do complexo Bcc em solos de culturas agrícolas revelaram que as espécies mais abundantes são *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. ambifaria* e *B. pyrrocinia*, e outros genomovares raramente encontrados (RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005). No entanto, a associação destes isolados e sua implicação no desenvolvimento da fibrose cística ainda é incerta (WOZNIAK, 2006), não existindo uma distinção clara entre isolados clínicos e ambientais a partir de critérios fenotípicos e genotípicos.

2.6 Ferramentas moleculares para a determinação da função de genes

Sequências genômicas de várias linhagens de *Burkholderia* encontram-se já disponíveis, mas um fato notável válido para qualquer organismo, é que a função da maioria dos genes não pode ser determinada somente com a análise primária da seqüência. Dentre as estratégias para se estabelecer a função de um determinado gene estão os exprimentos de perda-de-função. Esta abordagem consiste em impedir que um determinado gene resulte no seu produto, com o propósito de analisar as conseqüências ou o fenótipo decorrente desta inibição em um organismo inteiro ou em células cultivadas. Estratégias atualmente utilizadas para se estudar a função de genes assim como mapear a inter-relação entre os diferentes componentes das vias regulatórias intracelulares são por meio do silenciamento e do nocaute gênico por meio de elementos transponíveis (BARBOSA; LIN, 2004).

O silenciamento é obtido com a utilização de RNAs de interferência (siRNAs), que consistem de pequenas moléculas de RNA de dupla-fita que se associam ao RNA mensageiro transcrito, formando um complexo que possui uma endorribonuclease que o degrada,

impossibilitando a sua tradução. Estes iRNAs permitem a análise da mudança fenotípica decorrente da impossibilidade de traduação do mRNA transcrito, o que significa a supressão da atividade gênica a nível de expressão, que tem minimizado os problemas envolvendo a caracterização genética em células de mamíferos, pois além dos genomas expressivamente maiores, necessitariam da inativação de ambos alelos do gene por mutagênese, representando uma poderosa ferramenta que correlaciona genes a sua função (BARBOSA; LIN, 2004; MELLO; CONTE, 2004).

A transposição é outro mecanismo que tem sido explorado como uma poderosa ferramenta em análises genéticas. Na natureza, acredita-se que os transposons, também conhecidos como genes saltadores, tenham importância na evolução do genoma, em uma variedade de doenças genéticas, na integração de DNA retroviral, na inativação de genes, assim como na facilitação da transferência genética horizontal (GORYSHIN; REZNIKOFF, 1998; REZNIKOFF et al., 1999; GORYSHIN et al., 2000).

Transposons têm sido aplicados no mapeamento de genes, estratégias de seqüenciamento, mutagênese insercional, métodos de análise genética funcional, análise funcional de proteínas, estudos de complexos DNA-proteína (LAMBERG et al., 2001). O transposon Tn5 tem se tornado uma valiosa ferramenta devido a sua capacidade de transpor com baixa especificidade em uma grande variedade de bactérias Gram-negativas (REZNIKOFF, 1993). A geração de bibliotecas de mutantes e a caracterização das propriedades fenotípicas de cada clone permitem o estudo de um grande número de mutantes simultaneamente, facilitando a análise de diversos processos biológicos, pois mutações definidas são extremamente trabalhosas (PAJUNEN et al., 2005; SUZUKI et al. 2006).

Uma vez inserido em uma região, os transposons são elementos úteis como fonte de pontos de anelamento para determinação da seqüência de nucleotídeos de regiões adjacentes não caracterizadas. Primers que se anelam próximo ao final do transposon permitem a clonagem de seqüências próximas, e uma coleção de transposons aleatórios resultaria em contigs que poderiam ser sobrepostas para resultar em um único fragmento completo, podendo acelerar a caracterização de genes interrompidos, sendo uma forma rápida de seqüenciamento do genoma total, além da sua extensão para análises de seqüências de bibliotecas de cDNA (HAYES, 2003).

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 (STASKAWICZ, 2001), em *P. carotovora* (ERIKSSON et al., 1998) e *Xanthomonas campestris* (DOW et al., 2000). Em citros, foi demonstrado que mutantes de *X.*

campestris pv. *citri*, com interrupção do gene fosfoglicose isomerase, exibiram deficiência nos sintomas da doença do cancro (TUNG; KUO, 1999). A mutagênese insercional aleatória pode ser útil também para o estudo de genes envolvidos na biossíntese de moléculas de interesse biotecnológico ou de importância na adaptação de microrganismos a condições diversas. Georgakopoulos et al. (1994) clonaram um gene de *P. aureofaciens* envolvido na biossíntese do antibiótico fenazina, importante na competição com outros microrganismos durante a colonização da rizosfera e rizoplano.

O bloqueio da produção de pirrolnitrina em uma linhagem de *P. fluorescens* Bl915, após nocaute gênico por transposon, identificou um fragmento de 32kb, um cluster contendo quatro genes. Mutações pontuais em cada gene resultam na deficiência na produção do antibiótico, e a transferência do cluster para uma linhagem de *E. coli* tornou-a capaz de produzir este metabólito, sugerindo que estes quatro genes sejam suficientes para a via biossintética de produção da pirrolnitrina (HAMMER et al., 1997).

Um antibiótico desconhecido muito ativo contra uma variedade de fungos, produzido por um isolado de *B. cepacia* do solo, foi purificado e a análise preliminar de sua estrutura bioquímica, além da clonagem e caracterização inicial da região do genoma que o codifica, utilizando como ferramenta o Tn5, sugere que este antibiótico (referido como AFC-BC11) trata-se de um novo lipopeptídeo associado à membrana celular e não sintetizado nos ribossomos (KANG et al., 1998).

Mercado-Blanco e Bakker (2007) citam que na maioria dos casos, a atividade *in situ* de endófitos supostamente envolvidos no controle biológico é muito difícil de ser demonstrada. Dessa forma, estratégias envolvendo o mapeamento de genes associados a uma determinada atividade, por meio da análise de mutantes, poderiam elucidar muitos mecanismos, inclusive os de biocontrole.

A atividade antimicrobiana do 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) foi constatada após a redução no controle de patógenos da rizosfera por linhagens mutantes de *P. fluorescens* CHA0 *Phl*$^-$, não podendo ser atribuída à inabilidade em manter a população, pois não houve diferenças significativas na taxa de colonização. Os autores alertam ao fato de que, mutantes geralmente apresentam traços residuais de proteção à planta, evidenciando que a supressão de doenças é multifatorial, tendo como função chave a ação de metabólitos secundários. Já a construção de um transconjugante mutante que teve a produção do Phl restaurado, produziu Phl sintético e controlou o patógeno, porém em menor extensão. No entanto, não se sabe se esta atividade reduzida foi resultado da instabilidade do plasmídio (KEEL et al., 1999).

A manipulação genética de pseumonados permite maior discernimento em relação à

produção de moléculas e sua função no controle biológico. Embora a produção de compostos com atividade antimicrobiana tenha sido relatada para burkholderias, os mecanismos de controle são bem menos caracterizados, em parte, devido à dificuldade na aplicação de ferramentas genéticas. A maior limitação para estudos moleculares sobre a habilidade de controle biológico em *B. cepacia*, assim como para outros pseumonados, ocorre devido ao fato de ferramentas para sua análise e manipulação genética serem muito menos desenvolvidas, em parte devido ao alto nível de resistência destas bactérias a maioria dos antibióticos, uma baixa frequência de eletroporação e transferência de plasmídio conjugativo. Além disso, as burkholderias possuem um genoma relativamente grande, compostos de múltiplos replicons, e contêm um grande número de sequências de inserção, resultando numa extensa variabilidade e heterogeniedade genômica e fisiológica (KANG et al., 1998).

Em vista dos relatos quanto à associação de linhagens de *B. cepacia* como patógeno oportunista, a identificação de genes envolvidos no controle biológico possibilitaria a construção de linhagens transconjugantes mais seguras para liberação no campo, que não apresentassem riscos tanto a sanidade da planta como a saúde humana. A seleção de microrganismos benignos colonizadores da rizosfera, mais fáceis de serem manipuladas em laboratório, de crescimento rápido, carregando fatores benéficos adicionais à planta, assim como linhagens mais resistentes aos processos de produção industrial e aplicação no campo, poderiam ser empregados.

Huang et al. (2004) produziram um recombinante a partir de *P. fluorescens* Q8r1-96 introduzindo um operon contendo os sete genes para a síntese de ácido fenazina-1-carboxílico, composto antifúngico. A linhagem Q8r1-96 controla naturalmente *Pythium* através da produção de um metabólito lipopeptidico, que também apresenta ação antifúngica, antibacteriana, antihelmintica e antiviral (VELUSAMY et al., 2006), além de ter uma eficiente colonização das raízes e manutenção da população. Não houve diferença no controle da podridão da raiz por *Pythium* pelo recombinante, porém, o controle da podridão causada por *Rhizoctonia solani* foi alcançado com uma dose bem menor que a requerida pelo selvagem. Este trabalho apresenta a possibilidade de desenvolvimento de linhagens transgênicas através da combinação de traços de biocontrole utilizando ferramentas de engenharia genética, com a transferência de genes para linhagens com características desejáveis. Porém, é necessária cautela quanto à sua aplicação no campo, o que exige estudos cuidadosos, considerando os possíveis impactos as populações naturais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é a identificação de genes de uma linhagem de *Burkholderia* sp. associados ao controle *in planta* de *Pectobacterium carotovora.*

3.2 Objetivos específicos

Para se alcançar os objetivos gerais, nesta etapa do projeto foram buscados os seguintes objetivos específicos:

- Seleção de isolados de *Burkholderia* sp. com melhor desempenho no controle da podridão mole *in vivo,* causada pela bactéria *P. carotovora* em orquídeas;
- Obtenção de uma biblioteca transformantes de *Burkholderia* sp. por meio da inserção aleatória do transposon Tn5
- Seleção e caracterização de mutantes de *Burkholderia* sp. defectivos para o controle da podridão mole causada por *P. carotovora*;
- Identificação dos genes de *Burkholderia* sp. envolvidos no controle *in planta* de *P. carotovora.*

4 MATERIAIS MÉTODOS

4.1 Linhagens de *P. carotovora* e *Burkholderia* sp.

Dois isolados de *P. carotovora* (ORDF11-04F e ORDF16-03J), causadores de podridão mole em *Oncidium* Aloha Iwanaga, previamente obtidos em projeto anterior (MINAMI, 2006), foram avaliados quanto à capacidade de causar podridão mole em *Oncidium* Aloha Iwanaga, *in vitro*, por meio de fragmentos foliares, e *in vivo*, por inoculação em folhas de plantas adultas.

As linhagens de *Burkholderia* utilizadas para seleção de isolados capazes de controlar a podridão mole de *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga foram obtidas 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 Coordenador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo). Estes isolados foram previamente caracterizados por Mendes et al. (2008) e Luvizotto et al. (2010). Foram avaliados 34 isolados de *Burkholderia* (Tabela 1) obtidos de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), sendo isolados endofíticos de raiz e isolados da rizosfera. Os isolados de *Burkholderia* sp. foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir os sintomas da podridão mole causada por *P. carotovora* em fragmentos foliares mantidos em câmara úmida, e *in vivo*, nas folhas de plantas adultas de *Oncidium* Alowa Iwanaga. Todas as bactérias foram cultivadas em meio TSA (tryptic soya Agar, Oxoid) 5% a 28 °C por aproximadamente 24 horas.

Tabela 1- Código de identificação, local de isolamento e hospedeiro, das linhagens de *Burkholderia* sp. avaliadas quanto a capacidade de inibir os sintomas de podridão mole causada por *P. carotovora*.
(continua)

Número de linhagens	Código Coleção LGM-ESALQ	Local de isolamento	Hospedeiro
01	TH4.4.3F1	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
02	TC4.3.1F2	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
03	CV4.4.2F2	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
04	CV3.3.3F2	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
05	TC2.2.2F5	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
06	CV2.2.2F2	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar

Tabela 1- Código de identificação, local de isolamento e hospedeiro, das linhagens de *Burkholderia* sp. avaliadas quanto a capacidade de inibir os sintomas de podridão mole causada por *P. carotovora*.
(conclusão)

Número de linhagens	Código Coleção LGM-ESALQ	Local de isolamento	Hospedeiro
07	CV3.1.2F4	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
08	TC3.3.3F1	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
09	CV2.3.2F1	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
10	TH3.3.2F5	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
11	TH2.3.2F5	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
12	CV3.1.1F1	RAIZ	Cana-de-açúcar
13	ESR73	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
14	TC2.2.2F4	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
15	TC3.4.1F4	RAIZ	Cana-de-açúcar
16	CV2.1.2R2	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
17	CV2.1.3F5	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
18	CV3.2.2F5	RAIZ	Cana-de-açúcar
19	TH3.1.1R4	RAIZ	Cana-de-açúcar
20	ESR63	RAIZ	Cana-de-açúcar
21	CV2.4.3R2	RAIZ	Cana-de-açúcar
22	TC3.4.2R3	RAIZ	Cana-de-açúcar
23	TC3.4.2R2	RAIZ	Cana-de-açúcar
24	TC3.3.1R6	RAIZ	Cana-de-açúcar
25	TH3.4.1R4	RAIZ	Cana-de-açúcar
26	TC3.4.1R1	RAIZ	Cana-de-açúcar
27	TH2.2.3R3	RAIZ	Cana-de-açúcar
28	TH2.3.3R4	RAIZ	Cana-de-açúcar
29	TH2.3.3R3	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar
30	TC3.4.1F2	RAIZ	Cana-de-açúcar
31	TC3.4.2R1	RAIZ	Cana-de-açúcar
32	TH2.1.3R2	RAIZ	Cana-de-açúcar
33	TH2.4.1R1	RAIZ	Cana-de-açúcar
34	TC3.3.1F1	RIZOSFERA	Cana-de-açúcar

4.2 Inoculação de *P. carotovora* e confirmação da patogênese

Para confirmação da patogênese de *P. carotovora* e seleção do melhor isolado, foram avaliados os isolados ORDF11-04F e ORDF16-03J em plantas de *Oncidium* Aloha Iwanaga. Estes isolados foram cultivados em meio TSA 5% a 28 °C por 24 horas, diluídos em PBS (phosphate buffer saline) e introduzidos por meio de um orifício com auxílio de uma pipeta em fragmentos foliares colocados em câmara úmida (placas de petri contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 2 mL água destilada) e incubadas a 28 °C por até 3 dias para a confirmação do sintoma de podridão mole (MINAMI, 2006). Para a avaliação *in vivo* na planta hospedeira, alíquotas de cultura líquida de *P. carotovora* diluídas em tampão PBS foram inoculadas diretamente em pelo menos uma folha de plantas de *Oncidium* Aloha Iwanaga adultas, e estas foram mantidas em temperatura ambiente, em casa de vegetação com sombreamento 50%, e regime de rega 2-3 vezes por semana ou conforme a necessidade.

4.3 Seleção de *Burkholderia* para geração dos mutantes Tn5 através da interação *Burkholderia* sp. e *P. carotovora* em *Oncidium* Aloha Iwanaga

Os 34 isolados de *Burkholderia* e 2 isolados de *P. carotovora* foram crescidos em 5 mL de meio TSA 5% líquido a 28 °C por 24 horas. Após o crescimento, 5 µL de cada cultura bacteriana diluída (10^5 UFC mL^{-1}) foi inoculada nos fragmentos foliares (2 x 2 cm) previamente perfurados com uma ponteira de plástico estéril e incubado em câmara úmida a 28 °C por até 3 dias. Como controle, foram utilizados fragmentos foliares inoculados somente com: *a*) tampão de diluição PBS; *b*) apenas o patógeno (PCA – *P. carotovora*) ou *c*) apenas *Burkholderia* sp.

4.4 Teste de sensibilidade a canamicina *nptII* (neomicina fosfotransferase II)

As linhagens de *Burkholderia* sp. que apresentaram maior capacidade de controle da podridão mole causada por *P. carotovora* foram avaliadas quanto à resistência a diferentes concentrações do antibiótico canamicina. Para isso, os isolados foram crescidos em meio TSB 5% por 24 horas a 28 °C e alíquotas de 100µL de cada linhagem foram semeadas em meio TSB 5% sólido suplementado com diferentes concentrações do antibiótico canamicina (50,

100 e 200 μg.mL^{-1}) e placa controle sem adição do antibiótico. O crescimento das linhagens foi monitorado por 24 a 72 horas para verificar a resistência dos isolados a canamicina e determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. A escolha de um isolado sensível ao antibiótico canamicina é crucial para a execução das próximas etapas do trabalho, visto que a integração do transposon Tn5 para geração de uma biblioteca de transformantes com inserção aleatória, utilizando o Kit Ez-TN5 <R6Kγori/KAN-2> (EPICENTRE®, Technologies, Madison, WI) ocorre juntamente com o gene de resistência a este antibiótico, sendo esta a condição de seleção dos transformantes.

4.5 Análise da atividade antimicrobiana *in vitro* de *Burkholderia* sp. contra *P. carotovora* pelo Método de Sobrecamada (*Spot-on-the-law*)

O ensaio de antagonismo bacteriano foi conduzido utilizando o método de sobrecamada. O isolado de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 e os mutantes defectivos no controle *in vivo* da *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga foram cultivados em meio líquido TSB 10% por 24 horas a 28 °C. Após o crescimento, alíquotas de 10 µl foram gotejadas em placas de petri contendo meio TSB 5% sólido (5mm de espessura), em triplicata, e incubado por 24 horas, a 28 °C. No mesmo tempo, uma colônia isolada de *P. carotovora* foi semeada em meio TSB 5% líquido, incubada por 24 horas, a 28 °C sob agitação a 150 rpm. Após o crescimento, as células de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 e os mutantes selecionados foram inativadas por exposição ao vapor de clorofórmio por 40 minutos, e em seguida, uma sobrecama de 5 mL de meio de cultura semi-sólido fundente (0,8%), contendo 100 µL de cultura da bactéria *P. carotovora*, foi adicionada sobre as colônias inativadas. A cultura de sobrecamada foi mantida a 4° C na geladeira por aproximadamente 3 horas para reduzir a velocidade de crescimento da cultura do patógeno na sobrecamada, permitindo primeiramente a difusão dos metabólitos celulares da subcamada para a sobrecamada. A posteriori, a cultura em sobrecamada foi novamente incubada por 48 horas a 28 °C, e após a incubação, a efetividade da atividade antibacteriana foi confirmada pela formação de um halo claro de inibição em torno das colônias selvagem e mutantes de *Burkholderia* sp.

4.6 Identificação molecular do isolado selvagem de *Burkholderia* sp. por meio da análise parcial do gene *recA*

Para uma tentativa de identificação de espécie, o DNA do isolado selvagem TC3.4.2R3 de *Burkholderia* sp. que apresentou melhor desempenho no controle da podridão mole e sensibilidade a canamicina [200 $\mu g.mL^{-1}$], foi extraído pelo método fenol-clorofórmio, e posteriormente amplificado por PCR utilizando o par de primers Bur-1 (5' - GATCGAAGAAGCAGTTCGGCAA – 3) e Bur-2 (5' - TTGTCCTTGCCCTGAGCCGAT - 3'), para o gênero *Burkholderia* (MARTINS, 2007), que amplificam parcialmente o gene recombinase A (*recA*), gerando fragmentos de 869pb. As reações com volume final de 50µL contendo 0.2mM de cada dNTPs, 0.2µM de cada primer, 3.7mM MgCl2, 0.4U de Taq Polimerase, foram submetidas a ciclos de amplificação com temperatura inicial de desnaturação de 96 °C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, 1 minuto de anelamento a uma temperatura ideal pré-determinada por PCR-gradiente, e amplificação a 72 °C durante 45 segundos, seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR da amostra TC3.4.2R3 foram purificados utilizando o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. As sequências *foward* e *reverse* obtidas de cada primer foram alinhadas para a obtenção de uma única sequência consenso com o auxílio da ferramenta ClustalW através do software CodonCode Aligner 3.5 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, EUA). Para comparação da sequência obtida com as disponíveis no banco de dados do GenBank, via BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), foram obtidas sequências das espécies/genomovares do Complexo cepacia (*Burkholderia cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. pyrrocinia*, *B. vietnamensis*, *B. ambifaria*, *B. anthina* e *B. dolosa*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. metallica*, *B. arboris*, *B. ubonensis*, *B. contaminans e B. lata*), e outras espécies do gênero *Burkholderia* (*Burkholderia glumae*, *B. plantarii*, *B. sacchari*, *B. glathei* e *B. graminis*), para formação do grupo externo.

A árvore filogenética foi construída com base na região parcial do gene da *recA* obtida no seqüenciamento. Para o alinhamento, edição e construção das árvores, foi utilizado o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). O agrupamento para construção da árvore filogenética baseada em sequências do gene *recA* 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 Kimura-2-Parameter, um parâmetro que assume que, a mutação entre purinas e pirimidinas (transversões) ocorrem em diferentes taxas das mutações entre purinas ou entre pirimidinas (transições).

4.7 Mutagênese de *Burkholderia* sp. utilizando transposon Tn5

O isolado de *Burkholderia* sp. selecionado para construção da biblioteca de transformantes por mutagênese aleatória utilizando o transposon Tn5 foi transformado com o transposoma EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp (Figura 1), que consiste num complexo estável formado pela enzima transposase e o transposon Ez Tn5 R6Kγori/KAN-2> que contém uma origem de replicação condicional R6Kγori e o gene de resistência a canamicina (Tn903) funcional em *E. coli* e flanqueado por sequências de inserção invertidas de 19pb (Epicentre, Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA).

O método utilizado para obtenção de mutantes Tn5 de *Burkholderia* sp. foi a eletroporação utilizando protocolo padrão (GRANT et al., 1990). Células eletrocompetentes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 foram obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 mL de meio líquido LB (10g Bacto Tryptone; 5g Bacto Yeast Extract; 10g NaCl; pH 7,0), posteriormente incubado sob agitação (200 rpm) a 28 °C por 18h. Após o crescimento, 5 mL desta cultura foi crescida em 250 mL de meio SOB (2% Bacto Tryptone; 0,05% Bacto Yeast Extract; 10mM NaCl), a 28 °C sob agitação (200rpm) até atingir uma densidade ótica entre 0,65 a 0,75 (DO_{600}) medida em espectrofotômetro (Ultraspec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). Após atingir a OD desejada, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em água deionizada esterilizada, e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em glicerol 10% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressupendido em glicerol 10% com uma diluição de 500x para atingir uma DO de 0,100 (DO_{600}), e distribuído em alíquotas de 100 µL e estocados em freezer a -80 °C.

A inserção do transposon foi realizada de acordo com o protocolo do EZ-Tn5 <R6Kγgori/KAN-2>Tnp Kit (Epicentre® Technologies, Madison, WI). Uma alíquota de 100µl das células competentes foi descongelada e transferida para uma cubeta de eletroporação (2mm), juntamente com 1µL do transposoma (3,3ng) e introduzido por eletroporação (Gene Pulser, Biorad). Um pulso elétrico de 2,5kV cm-1 (com uma resistência de 200Ω e uma capacitância de 25 µF) foi aplicado. Posteriormente, foi adicionado meio SOC (2% tryptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM $MgCl_2$; 10mM $MgSO_4$; 20mM glucose; 6mL H_2O) na cubeta de eletroporação para um volume final de 1 mL, sendo pipetado gentilmente. O conteúdo da cubeta foi transferido para um microtubo e

incubado a 28 °C, sob agitação (200 rpm) durante 1 hora. Após esse período, alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana eletrotransformada (não diluída e diluídas na proporção de 1:10 e 1:100 foram semeadas em meio LB ou TSA 5% suplementado com canamicina [200µg.mL^{-1}] e incubadas a 28 °C por 48 a 72 horas. Colônias resistentes a canamicina indicaram que ocorreu a integração do transposoma no genoma, e foram utilizadas para construção de uma biblioteca, estocadas em meio líquido TSB 100% (Trypic Soya Broth, Oxoid) suplementado com canamicina [200µg.mL^{-1}], em microplacas de 96 poços, e incubadas sob agitação (140 rpm) a 28 °C por 48 horas. Após crescimento, foi adicionado glicerol (concentração final de 15 a 20%) a fim de manter a viabilidade das células em baixas temperaturas (-20 °C).

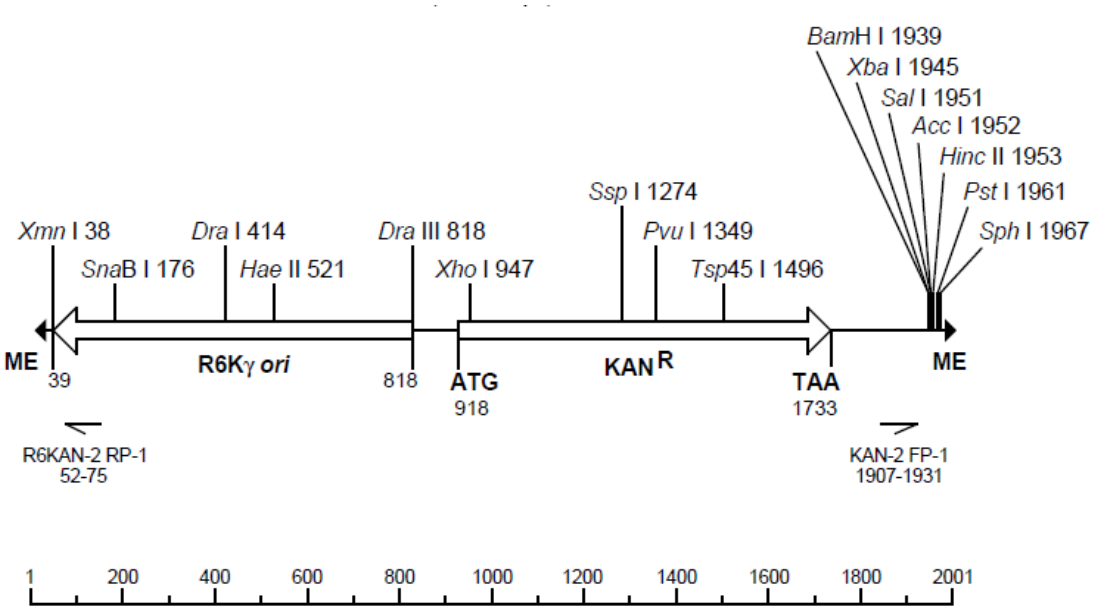

Figura 1. Transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp (Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA) utilizado para mutagênese aleatória.

4.8 Seleção de mutantes quanto a perda da capacidade de controlar a podridão mole causada por *P. carotovora* em *Oncidium* Aloha Iwanaga

Todos os ensaios foram conduzidos em câmara úmida. Em cada ensaio, um mix de 5 µL da cultura diluída 1^{-10} do mutante Tn5 mais 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da bactéria patogênica *P. carotovora*, crescidos a 28 °C por 24 horas, foram inoculados em fragmentos foliares (2 x 2 cm) de *Oncidium* Aloha Iwanaga, sendo que em cada placa, 3 fragmentos foram inoculados com o mix de um único mutante, e cada ensaio repetido no mínimo 3 vezes.

Como controle negativo, um fragmento contendo apenas 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da bactéria patogênica, e outro fragmento, como controle positivo (controle biológico), contendo 1 mix de 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 (selvagem) mais 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da bactéria patogênica *P. carotovora* (Figura 2). A fim de realizar o controle do tampão de diluição utilizado no experimento, uma placa controle contendo fragmentos foliares apenas com o tampão PBS também foi utilizada. O ponto de perfuração e a inoculação dos mix de bactérias foram realizados com auxílio de uma ponteira estéril. As placas foram incubadas a 28 °C por até 3 dias. Posteriormente, os isolados de *Burkholderia* que perderam a capacidade de controle da podridão mole causada por *P. carotovora* foram selecionados para caracterização dos genes interrompidos pelo Tn5.

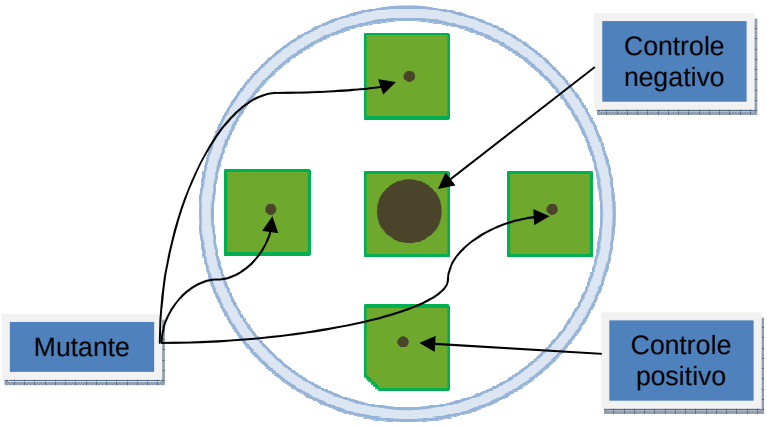

Figura 2. Croqui experimental dos ensaios de controle da podridão em câmara úmida. Ensaio fenotípico dos mutantes (5 µL da cultura diluída 1^{-10} mutante Tn5 + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} *Pca*); Controle negativo (5 µL da cultura diluída 1-^{10} *Pca*); Controle positivo (5 µL da cultura diluída 1-^{10} da *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 (selvagem) + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da *Pca.*

4.9 Caracterização, clonagem e seqüenciamento das regiões que flanqueiam o transposon em mutantes defectivos no controle da podridão mole

4.9.1 Extração do DNA bacteriano

O DNA genômico da linhagem selvagem de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 e dos mutantes Tn5 previamente selecionados após triagem quanto à perda da capacidade de controle da podridão mole foi extraído. Para isso, foram crescidos em 5 mL de meio TSB 5%

a 28 °C por 24 horas. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 g e o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de TE (10 mM de Tris-HCl, pH = 8), 30 µL de SDS 10% e 0,5g de sílica (0,1 mm de diâmetro) e incubado em banho-seco por 10 minutos a 65 °C. Em seguida a suspensão foi agitada no Disruptor Gene (Ciencor) por 1 minuto a 500bpm Posteriormente, adicionou-se 500 µL de fenol saturado e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA purificado pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITISCH; MANIATIS, 1989).

O sobrenadante foi transferido para novos tubos, e 0,1 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol foram adicionados para precipitação do DNA, e em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em 30 µL de água deionizada estéril. A concentração do DNA foi medida no Nanodrop Spectrophotometer ND-100 e sua integridade verificada em gel de agarose 1,0% a 100 volts.cm^{-1} utilizando como padrão de comparação o marcador Lambda (λ) (Fermentas Life Sciences, Brasil).

4.9.2 Confirmação da inserção do transposon Tn5 por PCR

O DNA extraído do isolado selvagem de *Burkholderia* e dos mutantes foi submetido a PCR para detecção do transposon Tn5. Para tal, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos que amplificam regiões parciais do transposon Tn5.

Baseado no trabalho de Wang et al. (2008), foi utilizado o par de oligonucleotídeos Tn5Fw (5'-ATTCAACGGGAAACGTCTTG-3') e Tn5Rw (5'-ACTGAATCCGGTGAGAATGG-3'), que geram um produto de 569pb dentro da sequência do transposon Tn5, na região do gene de resistência a canamicina. A reação de PCR (25µl) continha 100ng de DNA, 1 x PCR buffer, 0,5mM dNTPs, 0,2µM de cada primer e 1,0U Taq polimerase. As reações foram aquecidas a 95°C por 5min seguido por 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30s, 55.7 °C por 30s, 72 °C por 1min e extensão final a 72 °C por 7min.

Um segundo par de oligos Tn5F (5' – GGACGCGATGGATATGTTCT – 3') e Tn5R (5' - GATGGTCGGAAGAGGCATAA – 3') foi desenvolvido com auxílio do Software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/). O primer Tn5F se anela parcialmente na origem de replicação R6Kγgori e o primer TN5R ao gene de resistência ao antibiótico canamicina. A reação de PCR (25µL) foi realizada contendo 100ng de DNA molde, 1x PCR buffer, 0,25µM

de $MgCl_2$, 0,5mM dNTPs, 0,1µM de cada primer, e 1U de Taq polimerase. A reação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30s, 57 °C por 30s, 72 °C por 1 min, e uma extensão final a 72 °C por 7min.

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 1% a 5 $V.cm^{-1}$, corado com brometo de etídio (1,0 $mg.mL^{-1}$) para observação de um fragmento esperado de 569 e 399pb, respectivamente, utilizando o marcador 1Kb e 100pb (Fermentas Life Sciences, Brasil).

4.9.3 Tratamento do DNA genômico para clonagem das regiões flanqueadoras do transposon

O DNA genômico dos mutantes de *Burkholderia* sp. defectivos no controle da podridão, extraído pelo método fenol-clorofórmio, foi purificado pelo método de precipitação em isopropanol (0,6 volume). O precipitado obtido após centrifugação foi ressuspendido em H_2O ultrapura (Milli-Q). A concentração do DNA purificado foi medido Nanodrop Spectrophotometer ND-100 e sua integridade foi verificada em gel de agarose 1,0% a 100 $volts.cm^{-1}$ utilizando como padrão de comparação o marcador Lambda (λ) Fermentas Life Sciences, Brasil).

Para clonagem das regiões flanqueadoras do transposon em *Escherichia coli* DH5α-*pir*, 600ng do DNA de cada mutante foram tratados separadamente com enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas Life Sciences, Brasil) a 37 °C overnight. Posteriormente o produto clivado foi precipitado com 0,1 volume de acetato de amônio (7,8 M) e 2,5 volume de etanol absoluto, e em seguida incubado a -20 °C overnight. Após o período de incubação, o DNA clivado com *EcoRI* e precipitado em acetato de amônio/etanol, foi centrifugado a 14.000 g por 40 minutos a 4 °C, e em seguida o sobrenadante descartado. Foram adicionados 700 µL de etanol 70% ao DNA precipitado e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos (14.000 g a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e toda fase líquida evaporada a 37 °C, a fim de se manter no tubo apenas o DNA. O DNA foi então ressuspendido em 7,0 µL de água deionizada estéril, e incubado em banho seco a 65 °C por 30 minutos.

Os fragmentos obtidos da digestão foram circularizados com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e incubados a 4 °C overnight. Para transformação de *E. coli* DH5α-*pir* eletrocompetente, 2 µL do produto de ligação foram utilizados para transformação.

4.9.4 Geração de células eletrocompetentes de Escherichia coli DH5α-pir

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α-*pir* foram obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 mL de meio líquido SOC (10g Bacto Tryptone; 5g Bacto Yeast Extract; 0,05g NaCl; pH 7,0), posteriormente incubado sob agitação (200 rpm) a 28 °C por 18h. Após o crescimento, a cultura foi transferida para um frasco contendo 250 mL de meio SOB (2% Bacto Tryptone; 0,05% Bacto Yeast Extract; 10mM NaCl), a 28 °C sob agitação (200rpm) até atingir uma densidade ótica entre 0,4 a 0,6 (DO_{600}) medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). Após atingir a DO desejada, a cultura foi centrifugada a 5.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em água deionizada esterilizada e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em glicerol 10% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressupendido em glicerol 10% com uma diluição de 500x para atingir uma DO de 0,100 (DO_{600}). Alíquotas de 100 µL foram estocadas a -80 °C.

4.9.5 Transformação de células de E. coli DH5α-pir com fragmentos de DNA contendo o transposon Tn5

O transposon EZ-Tn5 <R6Kγgori/KAN-2>Tnp (Epicentre® Technologies, Madison, WI) não necessita de vetores de clonagem, pois sua sequência apresenta uma marca de resistência ao antibiótico canamicina (Tn903), permitindo a seleção de colônias transformadas, e também uma origem de replicação R6Kγgori, o que impede que o transposon seja integrado no genoma hospedeiro (*E. coli* DH5α-*pir*), e permite que o mesmo seja replicado de forma autônoma no citoplasma da célula. A transformação foi conduzida conforme o Kolter et al. (1978). O produto da ligação (2 µL) foi introduzido por eletroporação (Gene Pulser BioRad, 2,5 Kv, 25 µF, 400 Ω, cubetas de 0,2 cm) em 100 µL de células de *E. coli* DH5α-*pir* eletrocompetentes. Após a eletroporação as células eletroporadas foram imediatamente transferidas para microtubos com meio LB a um volume final de 1 mL, e incubadas a 37 °C durante 60 minutos, sob agitação. Cem microlitros (sem diluição e concentrado de 800 µL após centrifugação) da suspensão foram semeados em meio LB sólido contendo 200 µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas a 37 °C por até 24 horas, e as colônias crescidas (que apresentam resistência a canamicina devido a inserção do produto de

ligação) foram armazenadas em meio LB suplementado com canamicina 200 µ/mL, contendo 20% de glicerol e estocadas a -80 °C.

4.9.6 Extração do DNA plasmidial de clones Tn5 de E. coli DH5α-pir

O DNA plasmidial dos clones Tn5 *E. coli* DH5α-*pir* foi extraído utilizando o Kit PureLink^{TM} Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Dois clones representantes de cada isolado mutante foram crescidos em 100 mL de meio LB suplementado com canamicina 200 µ/mL, crescidos sob agitação a 170 rpm, durante 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada em macrocentrífuga e todo o meio de cultura descartado, e a miniprep conduzida conforme o protocolo do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi ressuspendido em 150 µL de água deionizada autoclavada. A concentração do DNA plasmidial foi estimada através do Nanodrop Spectrophotometer ND-100, e a integridade do DNA plasmidial, seu tamanho, e a ocorrência ou não de contaminação por DNA genômico, foram verificadas em gel de agarose 1,0% a 100 volts.cm^{-1}. Para isso, cerca de 500ng do DNA extraído foram tratados com a enzima de restrição *EcoRI*, incubados entre 1 a 3 horas a 37 °C, para linearizar o plasmidio. Para eletroforese foi utilizado como padrão de comparação o marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil).

4.9.7 Sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon

Para a identificação das sequências de DNA dos genes interrompidos pelo transposon EZ-Tn5 <R6Kγgori/KAN-2>KAN-2-Tnp, o DNA circularizado contendo o transposon, extraído de células de *E. coli* DH5α-*pir* foi submetido ao seqüenciamento utilizando o Kit Big dye Chemistry (sequenciador ABI Prism 3700), sendo a reação realizada a jusante e a montante utilizando os primers que anelam nas extremidades do transposon KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e R6KAN-2 RP-1 (5'-CTACCCTGTGGAACACCTACATCT-3'). Foram selecionados dois clones representantes de cada isolado e os mesmos foram seqüenciados em duplicata a jusante e a montante totalizando oito sequências. As sequências obtidas para cada primer foram alinhadas para a obtenção de uma única sequência consenso com o auxílio do software CodonCode Aligner 3.5 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, EUA). As seqüências foram analisadas com a ferramenta Vecscreen, disponível no site do NCBI

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html) com intuito de identificar trechos do transposon EZ-Tn5 <R6Kγgori/KAN-2>KAN-2-Tnp, para que este seja retirado da sequência de DNA flanqueadora antes da análise contra o banco de dados de genes e proteínas. As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST, o Megablast (análise de nucleotídeos) e Blastx (análise de proteínas) contra a base de dados do GenBank. Quando necessário, as sequências foram analisadas quanto a presença de ORFs (open reading frames) com auxílio da ferramenta ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.htmL).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Confirmação da patogênese de *P. carotovora*

Os dois isolados de *P. carotovora* (ORDF11-04F e ORDF16-03J), isolados previamente de *Oncidium* Aloha Iwanaga, foram avaliados quanto à capacidade de causar podridão mole na planta hospedeira. Nos ensaios realizados em fragmentos foliares de *Oncidium* Aloha Iwanaga, por meio da inoculação de 5µL da cultura do patógeno em orifício previamente obtido com ponteira esterilizada, foi observada uma área de podridão característica causada por estas bactérias pectinolíticas, onde no controle negativo, apenas com o tampão PBS de diluição, nenhuma lesão foi observada (Figura 3).

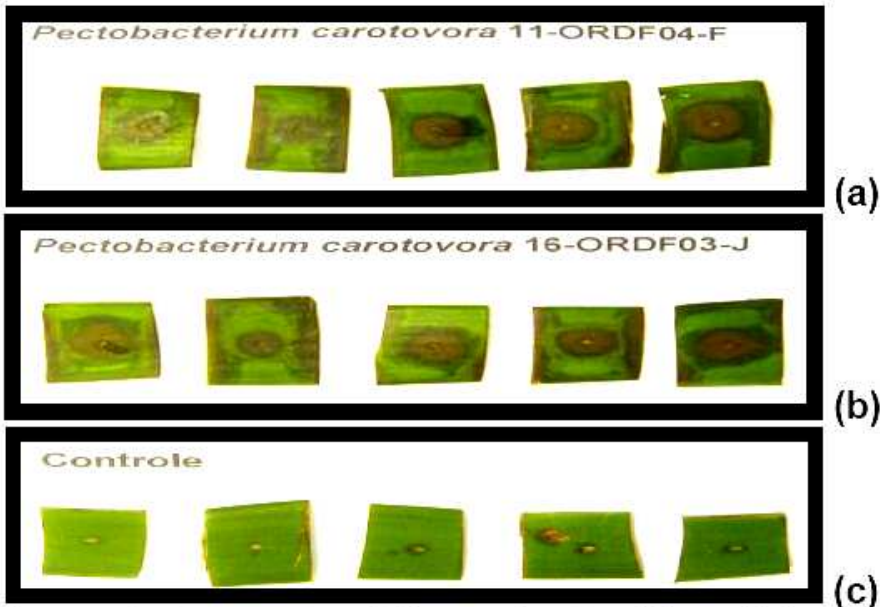

Figura 3. Fragmentos foliares de *Oncidium* Aloha Iwanaga inoculados com culturas liquidas de *P. carotovora* 11ORDF-04F (a) 16ORDF-03J (b) e o controle negativo tampão de diluição PBS (c).

Os isolados de *P. carotovora* (ORDF11-04F e ORDF16-03J) também foram avaliados quanto à capacidade de causar sintomas de podridão mole em plantas de *Oncidium* Aloha Iwanaga. Da mesma forma, alíquotas de cultura líquida do patógeno diluídas em tampão PBS foram inoculadas diretamente em folha de plantas de *Oncidium* Aloha Iwanaga adultas, e mantidas em temperatura ambiente, em casa de vegetação com sombreamento 50% (Figura 4a), e regime de rega 2-3 vezes por semana ou conforme a necessidade. Após cerca de 2-3 dias, foi possível observar uma área de lesão em torno do ponto de inoculação para as duas

linhagens de *P. carotovora*, porém, para o isolado 11ORDF-04F, a área de lesão observada foi levemente maior (4b e 4c). O resultado obtido não indica necessariamente que a linhagem 11ORDF-04F seja mais patogênica que a 16ORDF-03J, pois inúmeras variáveis influenciam na progressão da doença, como perfil metabólico individual de cada planta, umidade, condições de inoculação da bactéria, sendo os resultados usados apenas para seleção de *P. carotovora* para os ensaios de controle biológico.

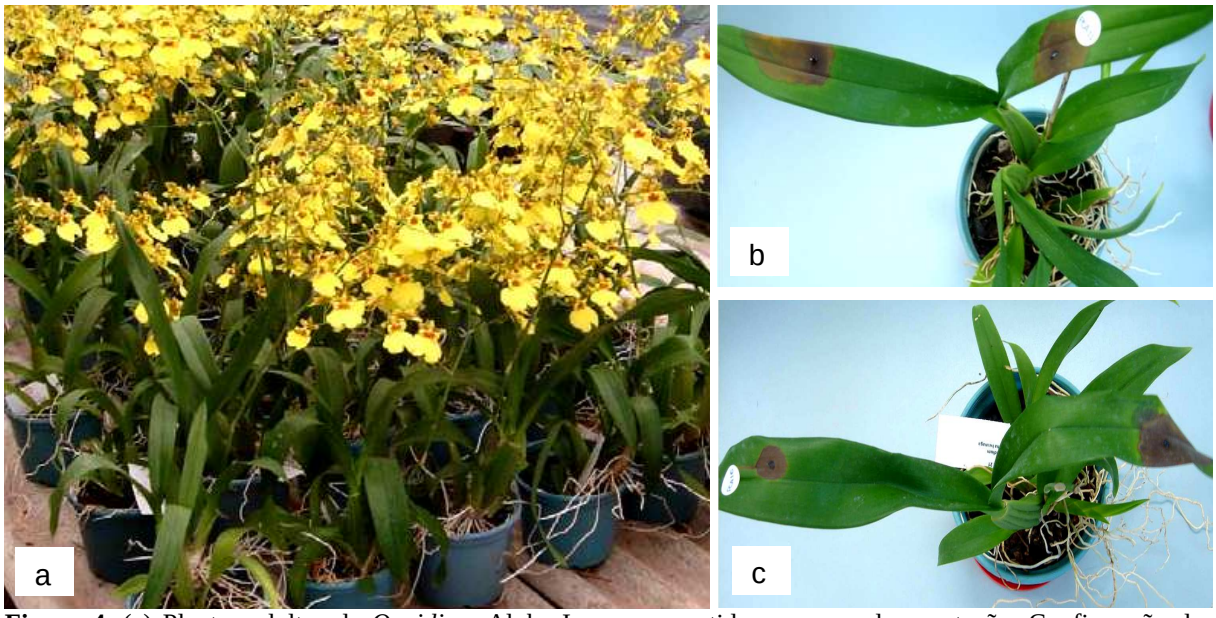

Figura 4. (a) Plantas adultas de *Oncidium* Aloha Iwanaga mantidas em casa de vegetação. Confirmação dos sintomas da podridão mole em tecidos foliares de plantas adultas de *Oncidium* Aloha Iwanaga causada pela (b) *P. carotovora* 11ORDF-04F e (c) *P. carotovora* 16ORDF-03J.

5.2 Seleção de *Burkholderia* para geração dos mutantes Tn5 através da interação *Burkholderia* sp. e *P. carotovora* em *Oncidium* Aloha Iwanaga

Os 34 isolados de *Burkholderia* obtidos da rizosfera e raiz de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), foram avaliados quanto a capacidade de controlar os sintomas da podridão mole causados por *P. carotovora* 11ORDF-04F. Após triagem inicial, o ensaio de biocontrole foi repetido novamente com 25 isolados que apresentaram melhor desempenho no primeiro ensaio, com controle satisfatório da podridão mole.

Em virtude do EZ-Tn5 <R6Kγgori/KAN-2>KAN-2-Tnp Kit, adquirido para a geração dos mutantes Tn5, apresentar como critério de seleção dos clones a resistência ao antibiótico canamicina, foi realizada análise de sensibilidade em três diferentes concentrações da canamicina no meio de cultura. A análise inicial foi realizada com uma concentração de [50

µg.mL^{-1}] para os trinta e quatro isolados. Destes, 6 isolados (17,7%) foram resistentes (apresentaram crescimento igual ao controle sem canamicina), 15 (44,1%) foram parcialmente resistentes (apresentaram crescimento, porém menor que o controle sem canamicina), e 13 (38,2%) foram sensíveis ao antibiótico.

Alinhando os resultados dos ensaios de controle da podridão mole e resistência ao antibiótico canamicina, foi observada a sobreposição de 9 isolados (Figura 5), que controlaram a doença quando inoculados juntamente com *P. carotovora* e que foram sensíveis à canamicina, sendo 7 endofíticos de raiz e 2 isolados obtidos da rizosfera de cana-de-açúcar.

Uma nova avaliação foi realizada a fim de reduzir o número de isolados selecionados. Para isso, foi feita a repetição do teste de controle biológico com os 9 isolados (em triplicata) e análise de sensibilidade a canamicina [50 µg.mL^{-1}], resultando na seleção de 6 isolados. Estes foram então submetidos a um novo teste de sensibilidade a canamicina [100 µg.mL^{-1}], onde foram selecionados os isolados TH3.1.1R4 e TC3.4.2R3, ambos endofíticos de raiz, mas que demonstraram que após 48 horas poderiam crescer colônias resistentes. Dessa forma, estes isolados foram avaliados também quanto à sensibilidade uma maior concentração de canamicina [200 µg.mL^{-1}], não sendo observado nestas condições crescimento bacteriano após 6 dias de incubação a 28 °C. Desta forma, o isolado TC3.4.2R3 foi selecionado para construção da biblioteca de mutantes Tn5.

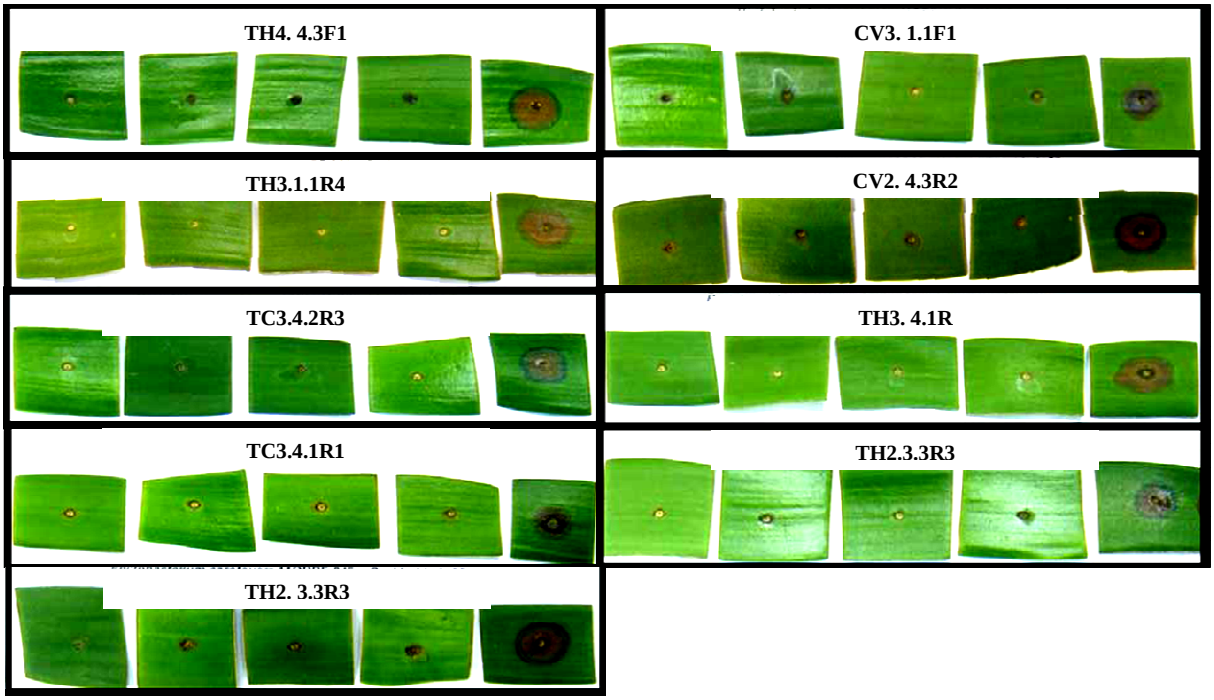

Figura 5. Isolados de *Burkholderia* sp. capazes de inibir a podridão mole. Os quatro primeiros fragmentos foram inoculados com o isolado de *Burkholderia* + *P. carotovora* (*Pca*) e o 5° fragmento apenas com *Pca*.

5.3 Análise da atividade antimicrobiana *in vitro* de *Burkholderia* sp. contra *P. carotovora in vitro*

A atividade antimicrobiana *in vitro* de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 foi positiva para *P. carotovora* 11ORDF-04F, com a observação de um halo de inibição de aproximadamente 4,4 mm (Figura 6) a partir das margens da colônia produtora. Este resultado demonstra que a bactéria selecionada para os ensaios seguintes de mutagênese apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* contra o patógeno, e que a produção de antibióticos pode participar do controle *in vivo* de *P. carotovora*.

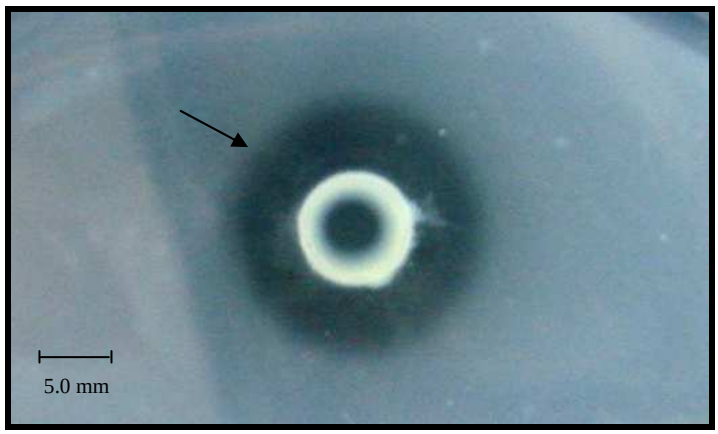

Figura 6. Zona de inibição da linhagem *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 frente a bactéria *P. carotovora* 11ORDF-04F. As setas indicam o halo de inibição.

Da mesma forma, a atividade antimicrobiana de cada mutante defectivo no controle a podridão mole também foi avaliada, a fim de verificar se a produção de antimicrobianos *in vitro* pode estar envolvida na perda de capacidade de controle da *P. carotovora.* Os dados foram tratados pelo Teste *tStudent* (duas amostras independentes), com nível de decisão 0.05 ($\alpha = 0.05$), onde não foram observadas diferenças significativas (Tabela 2) entre o diâmetro dos halos (Figura 7) produzidos por cada mutante em relação a *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 selvagem.

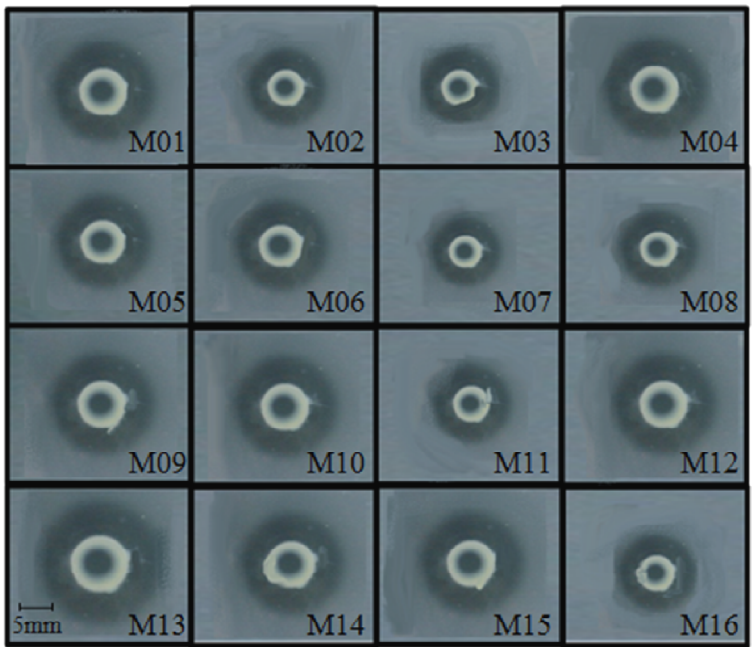

Figura 7. Zona de inibição dos 16 mutantes Tn5 defectivos no controle da podridão mole, frente a bactéria *P. carotovora* 11ORDF-04F.

Tabela 2 - Produção de agentes antimicrobianos *in vitro* contra *P. carorotova*, pelos isolado selvagem *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 e mutantes defectivos no controle da podridão mole em fragmentos foliares de *Oncidium* Aloha Iwanaga.

(continua)

Isolado	Diâmetro do halo (mm)	Signficância Teste *t* (P<0,05)
***Burkholderia* sp. TC3.4.2R3**	$4{,}40^{\pm 0{,}986}$	Ns*
Mutante 01	$4{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 02	$3{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 03	$3{,}66^{\pm 1{,}527}$	Ns
Mutante 04	$4{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 05	$4{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 06	$4{,}00^{\pm 0{,}00}$	Ns
Mutante 07	$3{,}00^{\pm 1{,}732}$	Ns
Mutante 08	$3{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 09	$4{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 10	$4{,}00^{\pm 1{,}00}$	Ns
Mutante 11	$3{,}33^{\pm 1{,}00}$	Ns
Mutante 12	$4{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns

Tabela 2 - Produção de agentes antimicrobianos *in vitro* contra *P. carorotova*, pelos isolado selvagem *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 e mutantes defectivos no controle da podridão mole em fragmentos foliares de *Oncidium* Aloha Iwanaga.

(conclusão)

Isolado	Diâmetro do halo (mm)	Signficância Teste *t* (P<0,05)
Mutante 13	$5{,}00^{\pm 1{,}00}$	Ns
Mutante 14	$4{,}33^{\pm 1{,}527}$	Ns
Mutante 15	$4{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns
Mutante 16	$3{,}33^{\pm 0{,}577}$	Ns

* NS = Não significativo. Se P<0.05, rejeita-se H0 (hipótese nula – sem efeito), logo a diferença é significativa; se P>0.05, não há evidências suficientes para se rejeitar H1 (hipótese alternativa), logo, a diferença não é significativa.

5.4 Identificação molecular do isolado selvagem de *Burkholderia* sp. por meio da análise da sequência parcial do gene *recA*

Após a extração do DNA genômico da linhagem de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 foi realizado um PCR-gradiente para determinação da temperatura de anelamento ideal para os primers Bur-1 e Bur-2, nas seguintes temperaturas 51.1 °C, 53 °C, 55.7 °C, 59.5 °C, 62.3 °C, 64 °C e 65 °C. Foi observado um produto amplificado de aproximadamente 869pb, tamanho esperado para a sequência parcial do gene *recA* nas temperaturas 65 °C, 59.5 °C, 55.7 °C, 53 °C, 51.1 °C (Figura 8), sendo que para a temperatura 55.7 °C apresentou melhor intensidade. Após ensaios de otimização, foi determinada uma temperatura de anelamento de 56.2 °C para as reações de PCR posteriores.

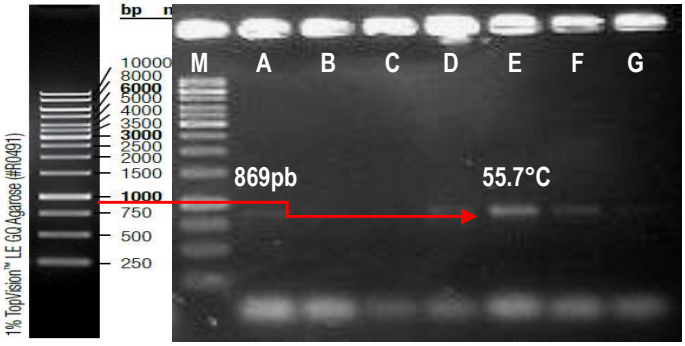

Figura 8. Amplificação do gene *recA* parcial do isolado *Burkholderia* TC3.4.2R3 por PCR Gradiente, utilizando o par de primers BUR-1 e BUR-2. (A) 65 °C, (B) 64 °C, (C) 62.3 °C, (D) 59.5 °C, (E) 55.7 °C, (F) 53 °C, (G) 51.1 °C, com amplificação de um fragmento de 869pb. Marcador de peso molecular (M) Gene Ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas Life Sciences, Brasil).

O produto de amplificação do gene *recA* do isolado de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 foi seqüenciado e comparado com sequências de espécies de *Burkholderia* do Complexo cepacia (*Burkholderia cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. pyrrocinia*, *B. vietnamensis*, *B. ambifaria*, *B. anthina* e *B. dolosa*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. metallica*, *B. arboris*, *B. ubonensis*, *B. contaminans e B. lata*) e sequências das espécies *Burkholderia graminis*, *B. glathei*, *B. plantarii*, *B. sacchari* e *B. glumae*, para integração de um grupo externo, e construção da árvore filogenética. As sequências contendo um total de 704pb foram alinhadas no programa MEGA4.0, com o método de Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Kimura-2-Parameter. Foi observada a formação de dois ramos distintos, o das espécies pertencentes ao Complexo cepacia juntamento com o isolado TC3.4.2R3, e outro ramo, composto pelas espécies do grupo externo (Figura 9).

Os genomovares do Complexo cepacia são estreitamente relacionados, de forma que apenas alguns poucos testes bioquímicos e testes múltiplos são capazes de fornecer uma identificação acurada. Testes moleculares baseados na sequência parcial do gene *recA* tem apresentado uma variação da sequência de nucleotídeos para discriminação dos 5 primeiros genomovares descritos para o Complexo, incluindo aí as espécies *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* (III), *B. stabilis* (IV) e *B. vietnamensis* (V) (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; VANDAMME, 2002). No presente trabalho, foi observado que o isolado endofítico TC3.4.2R3, proveniente de raiz de cana-de-açúcar e com potencial aplicação biotecnológica no controle biológico de bactérias fitopatógenas, é pertecente ao Complexo cepacia, podendo se tratar da espécie *B. cepacia*, onde apresentou uma dissimilaridade menor que 3% e elevada consistência do ramo (Figura 9).

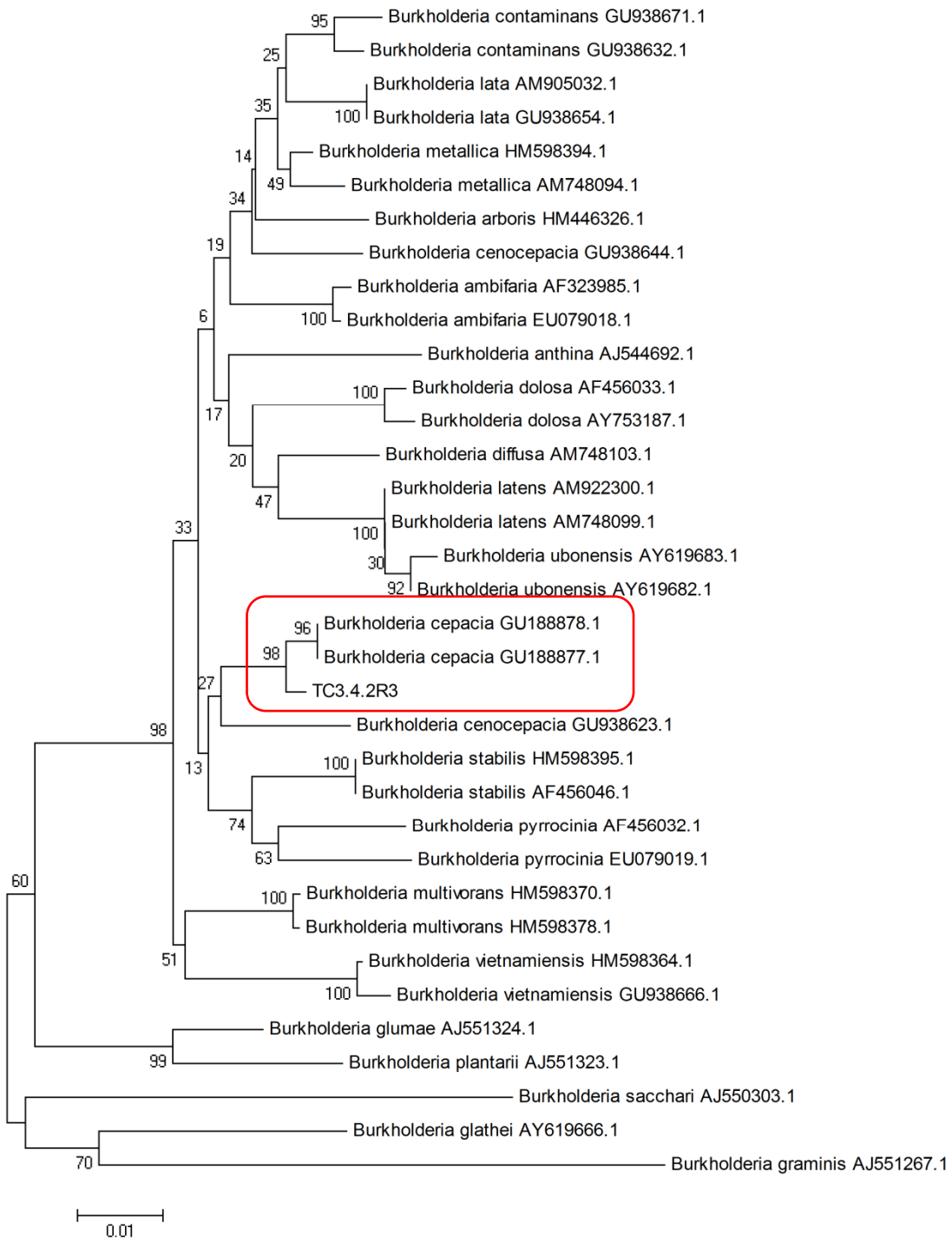

Figura 9. Árvore filogenética das espécies de *Burkholderia* baseado no alinhamento de sequências parciais do gene *recA*. O isolado TC3.4.2R3 é suportado em uma ramo mais próximo a espécie *Burkholderia cepacia*. Agrupamento calculado pelo método Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com bases nas matrizes de distância genética calculadas pelo Método Kimura-2-Parameter.

5.5 Obtenção de mutantes Tn5 de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3

O isolado endofítico TC3.4.2R3 de *Burkholderia* sp., obtido de raiz de cana-de-

açúcar, selecionado para geração da coleção de mutantes Tn5, foi crescido em meio SOB a 28 °C por 18 horas e 1mL do pré-inóculo foi semeado em 250mL de meio SOB até alcançar densidade óptica de 0.672 (OD_{600}), que foi obtido após 5 horas e 30 minutos, incubado sob agitação (130 rpm) a 28 °C. Após a transformação por eletroporação, a suspensão bacteriana foi semeada sobre meio LB e TSA 5% suplementado com canamicina (200 $\mu g.mL^{-1}$). De acordo com este protocolo, foram obtidos 1788 clones, resistentes ao antibiótico canamicina, sendo estocados em microplaca contendo meio TSB 100% líquido e 20% de glicerol, armazenados no freezer a -20 °C.

5.6 Seleção de mutantes Tn5 defectivos no controle da podridão mole de *Oncidium* Aloha Iwanaga causada por *P. carotovora*

Foram avaliados 602 clones da biblioteca de mutantes Tn5 derivados do isolado TC3.4.2R3 de *Burkholderia* sp. Os clones que apresentaram uma variação no controle da podridão comparado ao isolado selvagem foram repetidos pelo menos três vezes a fim de se verificar a estabilidade do mutante e influência das variáveis, como umidade da placa, condição da planta do qual o fragmento foi obtido.

Figura 10. Ensaios de controle da podridão mole por mutantes *Burkholderia* Tn5. Mutantes TC3.4.2R3 Tn5 defectivos no controle da podridão (*Pca*+*Burk*Tn5); *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 selvagem + *P. carotovora* (*Pca*+*Burk*115R-B8); *P. carotovora* (*Pca*).

De acordo com a Figura 10, foi observado que mutantes defectivos não foram capazes de inibir o aparecimento da lesão nos fragmentos foliares de orquídeas. Dessa forma, a partir da análise de 602 clones, foram obtidos 16 possíveis candidatos que apresentaram incapacidade total ou parcial do controle da podridão mole (Figura 11).

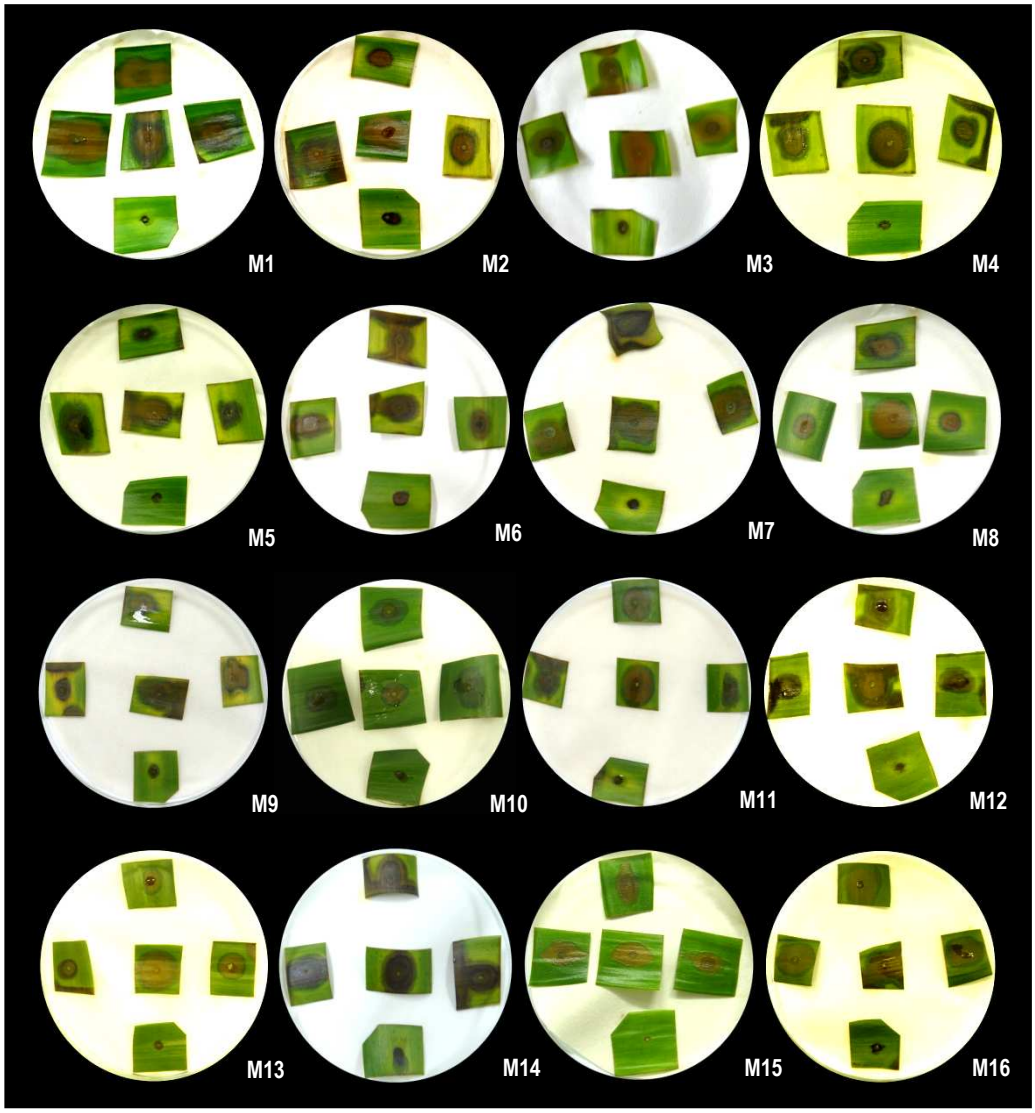

Figura 11. Ensaios de controle da podridão mole pelos 16 mutantes defectivos que tiveram seu gene noucauteado seqüenciado. Três fragmentos (superior e lateriais) contedo 5 µL da cultura diluída 1^{-10} mutante Tn5 + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} *Pca*; Controle negativo (fragmento central) contendo 5 µL da cultura diluída 1-^{10} *Pca*; Controle positivo (fragmento inferior) contendo 5 µL da cultura diluída 1-^{10} da *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 (selvagem) + 5 µL da cultura diluída 1^{-10} da *Pca*.

5.7 Confirmação da inserção do transposon Tn5 por Análise de PCR

A confirmação da inserção do transposon Tn5 foi realizada por meio da amplificação de dois fragmentos, um de 569pb utilizando o par de primers Tn5Fw e Tn5Rw, e outro de

399pb, utilizando os par de primers Tn5F e Tn5R, a partir dos 16 mutantes candidatos. A análise em gel de eletroforese revelou um fragmento de 569 (Figura 12) e 399pb (Figura 13) para o DNA de todos os mutantes Tn5 selecionados até o momento, e a ausência deste fragmento no isolado selvagem. Este resultado confirma que os clones avaliados apresentam o transposon Tn5 inserido em seu genoma, fato este que permitirá identificar o local de integração e a caracterização da região flanqueadora da inserção.

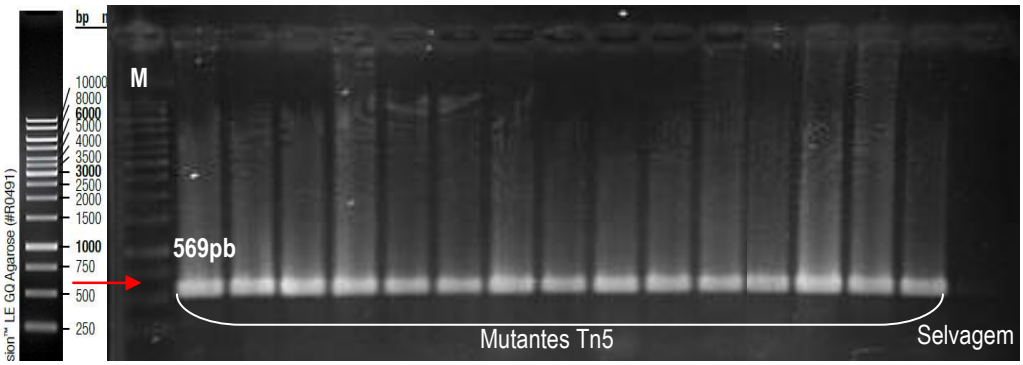

Figura 12. PCR para detecção da inserção do transposon no genoma de mutantes Tn5 utilizando o par de primers Tn5Fw e Tn5Rw, e amplificação de um fragmento de 569pb. A amplificação não ocorreu para a *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 selvagem. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas Life Sciences, Brasil).

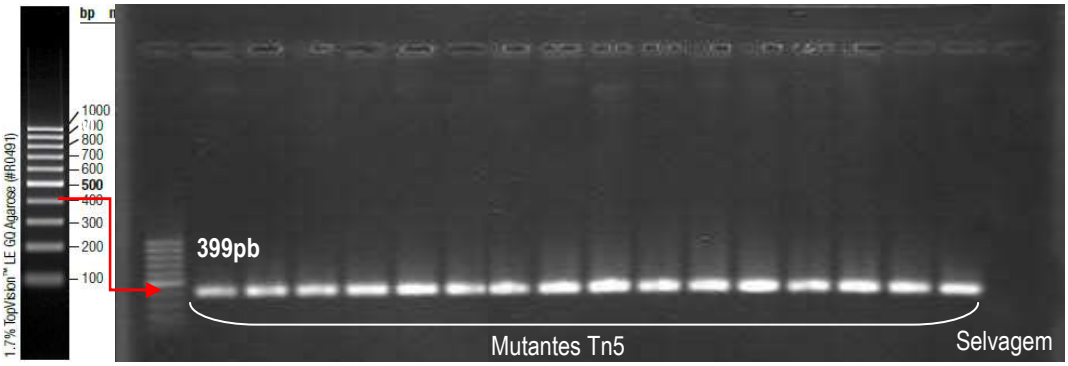

Figura 13. PCR para detecção da inserção do transposon no genoma de mutantes Tn5 utilizando o par de primers Tn5F e Tn5R, e amplificação de um fragmento de 399pb. A amplificação não ocorreu para a *Burkholderia* sp TC3.4.2R3 selvagem. Marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA ladder (Fermentas Life Sciences, Brasil).

5.8 Clonagem, seqüenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon Tn5

Atualmente, estão disponíveis em banco de dados, incluindo o sistema Integrated Microbial Genomes - IMG (http://img.jgi.doe.gov), o Pathema (http://pathema.jcvi.org), o

Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) Microbial Genomes e *Burkholderia* Genome Database (http://www.burkholderia.com/viewAllGenomes.do), os genomas completos de dez linhagens de *Burkholderia*, estando outros projetos em andamento. Nestes bancos de dados, estão incluídas duas linhagens de *B. ambifaria* (MC40-6 e AMMD); cepas de biocontrole associada a plantas; uma linhagem de *B. vietnamensis* G4, um isolados ambiental que degrada compostos aromáticos; *B. contaminans* cepa 383, isolado do solo; *B. multivorans* ATCC 17616; *B. lata* 383 e quatro linhagens de *B. cenocepacia*, sendo duas de solo, a MC0-3 e AU1054, e duas de pacientes com fibrose cística, a J2315 e HI2424.

Com a finalidade de identificar as sequências flaqueadoras do transposon Tn5 nos 16 transformantes da linhagem *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3, que perderam a capacidade de controlar a podridão mole causada por *P. carotovora* em fragmentos foliares de *Oncidium* Alowa Iwanaga, as regiões gênomicas adjacentes ao transposon, que se integrou no genoma, foram clonadas em *E. coli* DH5α-*pir*. Os plasmídios contendo os insertos de interesse foram extraídos, quantificados e linearizados com a enzima de restrição *EcoRI*, permitindo observar fragmentos que variaram entre 3.500pb a 10.000pb, aproximadamente (Figura 14). Para alguns clones, foram observadas mais de uma banda para uma amostra de plasmídio, que pode ter ocorrido por baixa eficiência ou inespecificidade durante a clivagem no pré-tratamento do DNA genômico para transformação em *E. coli* DH5α-*pir* eletrocompetente, ou clivagem parcial durante a digestão para linearização do plasmídio.

Para o seqüenciamento, dois clones de cada isolado transformante foram selecionados, sendo o seqüenciamento realizado a jusante e a montante com a utilização dos primers KAN-2 FP-1 e R6KAN-2 RP-1, e cada reação feita em duplicata, resultando em 8 sequências para cada transformante.

A análise das sequências flanqueadoras do transposon dos 16 mutantes da linhagem TC3.4.2R3 *de Burkholderia* sp. está sumarizada na Tabela 3. As sequências para todos os mutantes continham mais de 500pb de boa qualidade para cada primer, totalizando uma região de pelo menos 1000pb caracterizada adjacente a inserção do transposon Tn5. Para quase todas as sequências foi observada uma elevada similaridade com as sequências de nucleotídeos e proteínas depositadas no GenBank, possibilitando a comparação dos resultados obtidos com as sequências de diferentes linhagens de *Burkholderia* sp.

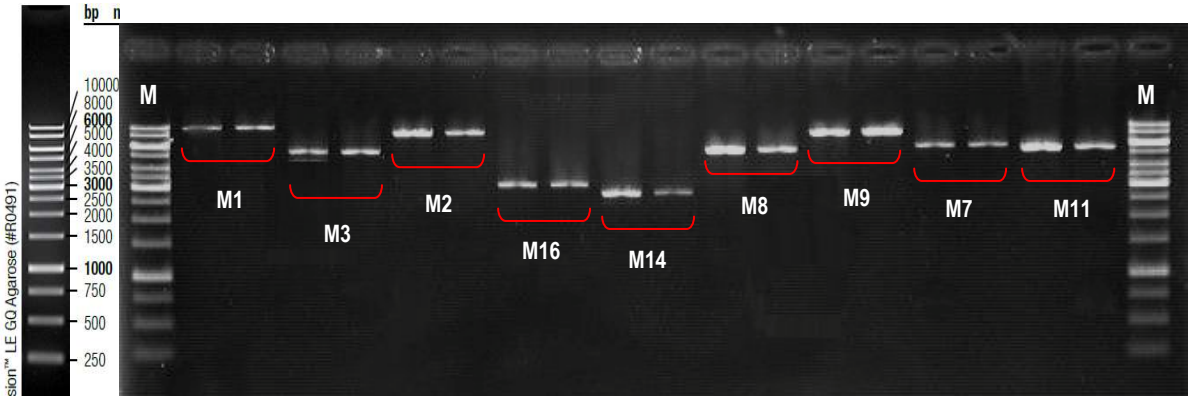

Figura 14. DNA plasmidial contendo o transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2> extraído de células de *E. coli* DH5α-*pir* e clivados com a enzima de restrição *EcoRI* para linearização do DNA circularizado.

5.8.1 Mutante com inserção na região intermediária da Patatina

A análise da sequência de DNA identificado no mutante *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M01 apresentou alta similaridade a uma região intermediária entre uma proteína semelhante a patatina (a montante) e uma proteína hipotética (a jusante), em diferentes espécies de *Burkholderia* e de outras bactérias do Grupo Proteobacteria (Figura 15). Os dois genes flanqueadores do Tn5 apresentam sentindo único de transcrição, podendo estar envolvidos na mesma via metabólica ou função, até mesmo podendo se tratar de um *operon*, e a sequência intergênica participar de sua regulação.

Sequências intergênicas podem participar da regulação gênica se sobrepondo a elementos promotores de genes. Kusano e Sugawara (1993) demonstraram por meio de experimentos de impressão digital e mutagênese sítio dirigida, a existência de um possível gene regulatório *rbcR*, de 930pb (e provável proteína de 309 aminácidos), em *Thiobacillus ferrooxidans* Fe1 localizado a montante do gene *rbcL1* de cópia única. O *rbcL1-rbcS1* forma juntamente com o *rbcL2-rbcS2* o operon *rbc*, descrito anteriormente por Kusano et al. (1991). O *rbcR* localiza-se divergentemente ao *rbcL1* com 144pb em posição intergênica, e possivelmente, a proteína *rbcR* se liga nesta região, participando da regulação do operon *rbcL1-rbcS1*.

Tabela 3 - Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga.

(continua)

Mutantes TC3.4.2R3	Região Flanqueadora do Tn5 Identidade Megablast / Blastx	Presença de domínios conservados
M01	*Burkholderia cenocepacia* J2315 / *Burkholderia cenocepacia* MC0-3 Cromossomo 1 95% *foward* e 94% *reverse* / 99% *foward* e 99% *reverse* Gene/CDS: Região intermediária ao gene "Fosfolipase semelhante a Patatina" e uma "Proteína hipotética conservada"	Fosfolipase semelhante a patatina cd07209: Patatina hipotética similar a proteína Z1214 de *Escherichia coli*: Esta família de fosfolipases consiste de glicoproteínas patatinas bacterianas e alguns representantes em eucariotos e archea. As proteínas patatinas somatizam mais de 40% do total de proteínas solúveis em batata. Trata-se de uma proteína de estoque, mas também possui atividade enzimática de uma hidrolase acil-lipídica, catalisando a quebra de ácidos graxos de membranas lipídicas. Proteína hipotética conservada cl00264: Superfamília Ferritin-like: proteínas que participam de um grande número de funções, incluindo a regulação do ferro, mono-oxigenação, e produção de radicais reativos. Alguns membros dessa superfamília incluem as bacterioferritinas, ferritinas, hidroxilases monoxigenases alcano e aromáticos (AAMH), ribonucleotídeos redutases R2 (RNRR2), acyl-ACP desaturases, proteínas de proteção ao DNA, entre outras.
M02	*Burkholderia multivorans* ATCC17616 Cromossomo 2 99% *foward* e 99% *reverse* / 97% *foward* e 95% *reverse* Gene/CDS: "Proteína hipotética BMULJ 05093" com traços da sequência do "rRNA-23S"	Nenhum domínio conservado
M03	*Burkholderia multivorans* ATCC17616 Cromossomo 2 99% *foward* e 100% *reverse* / 95% *foward* e 97% *reverse*	Nenhum domínio conservado

Tabela 3- Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga.

(continuação)

Mutante	Região Flanqueradora do Tn5	Presença de domínios conservados
	Gene/CDS: "Proteína hipotética BMULJ_05092" com traços da sequência do "rRNA-23S"	
M04	*Methylobacterium* sp. 4-46 Gene/CDS: "Glicosiltransferase grupo 1" No found *foward* e no found *reverse* / 45% *foward* e 33% *reverse*	cl10013: Superfamilia das Glicosiltransferases do tipo GTB: Catalisam a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativas para moléculas aceptoras específicas, formando ligações glicosídicas. As moléculas aceptoras podem ser lipídeos, proteínas, compostos heterocíclicos, e outros resíduos de carboidratos. Apresentam estruturas de glicoconjugados extremamente diversas, refletindo uma grande variedade de funções biológicas.
M05	*Burkholderia cenocepacia* AU 1054 Cromossomo 1 No found *foward* e no found *reverse* / 41% *foward* e 26% *reverse*	cd00189: TPR: Domínio repetitivo Tetratricopeptideo: Encontrado em uma variedade de organismos, incluindo bactérias, cianobactérias, leveduras, fungos, plantas e seres humanos, em várias localizações subcelulares; envolvidos em uma variedade de funções, incluindo a interação proteína-proteína; chaperonas; ciclo celular, transcrição e complexos de proteínas de transporte.
	Gene/CDS: "Glicosiltransferase grupo 1"	cl10013: Superfamilia das Glicosiltransferases do tipo GTB: As glicosiltransferases catalisam a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativas para moléculas aceptoras específicas, formando ligações glicosídicas. As moléculas aceptoras podem ser lipídeos, proteínas, compostos heterocíclicos, e outros resíduos de carboidratos. Apresentam estruturas de glicoconjugados extremamente diversas, refletindo uma grande variedade de funções biológicas
M06	*Burkholderia cenocepacia* MC0-3 Cromossomo 1 96% *foward* e 98% *reverse* / 95% *foward* e 99% *reverse* Gene/CDS: "Glutamato sintase (ferredoxin)"	pfam04898: Glu_syn_central: Glutamato sintase domínio central. O domínio central da sintase do glutamato liga o domínio amidotransferase amino terminal com o domínio ligante FMN. cd00713: GltS: Glutamina amidotransferases classe II (Gn-AT), da glutamato sintase (GltS) tipo. GltS é um homodímero que sintetiza L-glutamato a partir de 2-oxoglutarato e L-glutamina, um passo importante na assimilação de amônia em bactérias, cianobactérias e plantas.

Tabela 3- Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga.

(continuação)

Mutante	Região Flanqueadora do Tn5	Presença de domínios conservados
		cd00982: gltB_C: gltb_C. Este domínio encontra-se no C-terminal da subunidade grande (GLTB) da glutamato sintase (GltS). GltS codifica uma flavoproteína complexo ferro-enxofre que catalisa a síntese de L-glutamato a partir de L-glutamina e 2-oxoglutarato.
M07	*Burkholderia cenocepacia* MC0-3 Cromossomo 1 90% *foward* e 92% *reverse* / 98% *foward* e 96% *reverse* Gene/CDS: Traços da sequência da Transportadores da Superfamília Facilitadora Principal _MFS" / "Dehidrogenases de cadeia-curta_SDR"	TIGR00895: 2A0115: Transporte de benzoato cd06174: MFS: A Superfamília Facilitadora Principal (MFS) é um grupo grande e diverso de transportadores secundários que inclui proteinas uniporte, simporte e antiporter. As proteínas MFS facilitam o transporte de uma variedade de substratos através da membrana citoplasmática interna, incluindo íons fosfatos de açúcar, drogas, neurotransmissores, nucleosídeos, aminoácidos e peptídeos. Em bactérias têm função principalmente para a absorção de nutrientes e, como bombas de efluxo de drogas para conferir resistência a antibióticos.
M08	*Burkholderia multivorans* ATCC17616 Cromossomo 2 99% *foward* e 100% *reverse* / 95% *foward* e 93% *reverse* Gene/CDS: "Proteína hipotética BMULJ_05092" com traços da sequência do "rRNA-23S"	Nenhum domínio conservado

Tabela 3- Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga.

(continuação)

Mutante	Região Flanqueradora do Tn5	Presença de domínios conservados
M09	*Burkholderia multivorans* ATCC17616 Cromossomo 2 99% *foward* e 98% *reverse* / 97% *foward* e 95% *reverse* Gene/CDS: "Proteína hipotética BMULJ 05092" com traços da sequência do "rRNA-23S"	Nenhum domínio conservado
M10	*Burkholderia cenocepacia* AU 1054 Cromossomo 1 No found *foward* e no found *reverse* / 38% *foward* e 32% *reverse* Gene/CDS: "Glicosiltransferase grupo 1"	cd00189: TPR: Domínio repetitivo Tetratricopeptideo: Encontrado em uma variedade de organismos, incluindo bactérias, cianobactérias, leveduras, fungos, plantas e seres humanos, em várias localizações subcelulares; envolvidos em uma variedade de funções, incluindo a interação proteína-proteína; chaperonas; ciclo celular, transcrição e complexos de proteínas de transporte. cl10013: Superfamilia das Glicosiltransferases do tipo GTB: As glicosiltransferases catalisam a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativas para moléculas aceptoras específicas, formando ligações glicosídicas. As moléculas aceptoras podem ser lipídeos, proteínas, compostos heterocíclicos, e ou- tros resíduos de carboidratos. Apresentam estruturas de glicoconjugados extremamente diversas, refletindo uma grande variedade de funções biológicas.
M11	*Burkholderia cenocepacia* MC0-3 Cromossomo 1 92% *foward* e 95% *reverse* / 98% *foward* e 97% *reverse* Gene/CDS: Traços da sequência da "Transportadores da Superfamília Facilitadora Principal MFS" /	TIGR00895: 2A0115: Transporte de benzoato cd06174: MFS: A Superfamília Facilitadora Principal (MFS) é um grupo grande e diverso de transportadores secundários que inclui proteinas uniporte, simporte e antiporter. As proteínas MFS facilitam o transporte de uma variedade de substratos através da membrana citoplasmática interna, incluindo íons fosfatos de açúcar, drogas, neurotransmissores, nucleosídeos, aminoácidos e peptídeos. Em bactérias têm função principalmente para a absorção de nutrientes e, como bombas de efluxo de drogas para conferir resistência a antibióticos

Tabela 3- Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga.

(continuação)

Mutante	Região Flanqueradora do Tn5	Presença de domínios conservados
	Dehidrogenases de cadeia-curta_SDR”	
M12	*Burkholderia mallei* ATCC10399 Cromossomo 1 95% *foward* e 97% *reverse* / 96% *foward* e 99% *reverse* Gene/CDS: ““Transportadores da Superfamília Facilitadora Principal _MFS / “Proteínas ligantes de cadeia simples”	TIGR00895: 2A0115: Transporte de benzoato cd06174: MFS: A Superfamília Facilitadora Principal (MFS) é um grupo grande e diverso de transportadores secundários que inclui proteinas uniporte, simporte e antiporter. As proteínas MFS facilitam o transporte de uma variedade de substratos através da membrana citoplasmática interna, incluindo íons fosfatos de açúcar, drogas, neurotransmissores, nucleosídeos, aminoácidos e peptídeos. Em bactérias têm função principalmente para a absorção de nutrientes e, como bombas de efluxo de drogas para conferir resistência a antibióticos.
M13	*Burkholderia multivorans* ATCC17616 Cromossomo 2 99% *foward* e 99% *reverse* / 92% *foward* e 100% *reverse* Gene/CDS: “Proteína hipotética BMULJ_05092” com traços da sequência do “rRNA-23S”	Nenhum domínio conservado
M14	*Burkholderia cenocepacia* J2315 Cromossomo 1 96% *foward* e 98% *reverse* / 97% *foward* e 98% *reverse* ‘Gene/CDS: “Glutamato sintase (ferredoxina)”	pfam04898: Glu_syn_central: Glutamato sintase domínio central. O domínio central da sintase do glutamato liga o domínio amidotransferase amino terminal com o domínio ligante FMN. cd00713: GltS: Glutamina amidotransferases classe II (Gn-AT), da glutamato sintase (GltS) tipo. GltS é um homodímero que sintetiza L-glutamato a partir de 2-oxoglutarato e L-glutamina, um passo importante na assimilação de amônia em bactérias, cianobactérias e plantas.

Tabela 3- Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 de cana-de-açúcar, que apresentaram defectividade no controle da podridão mole em *P. carotovora* em *Oncidium* Alowa Iwanaga.

(conclusão)

Mutante	Região Flanqueradora do Tn5	Presença de domínios conservados
M15	*Burkholderia cenocepacia* HI2424 Cromossomo 1 96% *foward* e 95% *reverse* / 98% *foward* e 98% *reverse* Gene/CDS: "Ácido-graxo desaturase"	cd03505: delta9-MODAS-like: As ácido-graxos desaturases delta-9-acil lipídicas são encontrados em uma ampla gama de bactérias. Essas enzimas desempenham um papel essencial no metabolismo dos ácidos graxos e da regulação da fluidez da membrana celular. Em diversos vertebrados, insetos, plantas superiores e fungos são encontrados as delta-9 e delta-11 acil CoA.
M16	*Bukholderia cenocepacia* PC184 Cromossomo 1 94% *foward* e 96% *reverse* / 95% *foward* e 98% *reverse* Gene/CDS: "Poli-beta-hidroxialcanoato depolimerase"	COG4553: DepA: Poli-beta-hidroxialcanoato depolimerase [metabolismo lipídico]. cl12031: Superfamília Esterase_lipase: Esterases e lipases (inclui lipases fúngicas, colinesterases, etc). Estas enzimas agem sobre ésteres carboxílicos. O aparelho catalisador envolve três resíduos (tríade catalítica): a serina, um glutamato ou aspartato e resíduos de histidina. Estes resíduos catalíticos são responsáveis pelo ataque nucleofílico no átomo de carbono carbonílico da ligação Ester.

A região intergênica nocauteada pelo transposon Tn5 pode ainda conter uma sequência gênica nunca descrita. A análise pelo ORF Finder demonstrou a presença de algumas ORFs para as sequências flanqueadoras do Tn5 no mutante 01. As ORFs (Open Reading Frame) são sequências de DNA que contém codon de iniciação e codon de parada que são lidos no mesmo sentindo, podendo ser supostos genes codificadores de proteínas. Warren et al. (2010) cita que os principais problemas em relação a anotação de genes codificadores de proteínas em procariotos, encontrados em genomas únicos, incluem: a presença de numerosos genes genuínos sem alguma função atribuída (os chamados "genes hipotéticos"); a presença de genes que são desanotados ou com anotações que são demasiadamente gerais para serem úteis; e a possível existência de genes reais que não são detectados.

As patatinas compõem uma família de glicoproteínas que somam mais de 30% das proteínas solúveis totais em batata (*Solanum tuberosum*), sendo encontrados em todos os cultivares. Em plantas, as patatinas são proteínas de estoque, mas apresentam atividade enzimática lipolítica que catalisa a hidrólise não específica de uma grande variedade de lipídeos acil, como os fosfolipídeos, glicolipídeos, sulfolipídeos, e mono e diacil-gliceróis (ANDREWS et al., 1988). As patatinas são encontradas em grandes quantidades nos tubérculos, e não muito frequentemente em outros órgãos das plantas, porém, em certas condições podem ser induzidas a acumular altos níveis em caules e pecíolos (PAIVA; LISTER; PARK, 1983).

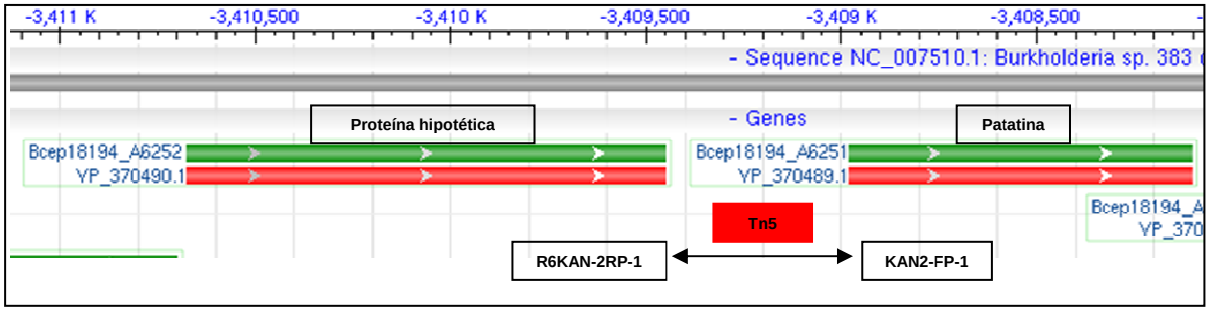

Figura 15. Contexto genômico da inserção do transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2> no DNA do mutante de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M01, flanqueando uma proteína hipotética da superfamília das ferritinas (a jusante) e uma proteína semelhante a patatina (a montante).

Patatinas B2 de batata e fosfolipases A_2 ($cPLA_2$) citossólicas em humanos demonstraram compartilhar domínios conservados de proteínas homólogas, contendo sítios ativos, a mais comum, uma tríade das enzimas lipolíticas Ser-His-Asp (ou Glu) (HIRSCHBERG et al., 2001). *A posteriori*, a ExoU, uma citotoxina tipo III, um fator de

virulência de *Pseudomonas aeruginosa* com atividade do tipo fosfolipase A, demonstrou regiões definidas de homologia protéica a patatina B2 e a $cPLA_2$, com uma díade putativa de Ser-Asp, sendo considerada a primeira hidrolase semelhante a patatina descrita em bactérias. Atualmente, outras proteínas semelhantes à patatina já foram encontradas em diferentes espécies de bactérias (SATO et al., 2003).

O envolvimento das patatinas 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 já foram evidenciados. Dhondt et al. (2000) observaram que plantas de tabaco com lesões necróticas aparentes, causadas pelo vírus mosaico, apresentaram reação de hipersensibilidade com um forte aumento na atividade de Fosfolipases A_2 (PLA_2) solúveis. Esse aumento na atividade das fosfolipases pode mobilizar ácidos graxos insaturados da membrana lipídica precursores das oxilipinas. As oxilipinas constituem uma ampla classe de compostos de defesa ativos, resultantes da ação de pelo menos três cascatas de enzimas individuais que metabolizam ácidos graxos hidroperóxidos (BLÉE, 1998). Uma isoforma desta fosfolipase, com maior atividade enzimática, foi parcialmente purificada e sua sequência N-terminal demonstrou similaridade com as patatinas. Experimentos com RT-PCR (RealTime Polymerase Chain Reactin) desenvolvidos no mesmo trabalho, demonstraram uma rápida ativação transcricional de três genes relacionados as patatinas de tabaco, nas folhas infectadas pelo vírus, e este evento precedeu ao aumento da atividade da PLA_2. Essa rápida ativação da PLA_2 ocorreu após o acúmulo de 12-oxofitodienóico e ácido jasmônico, dois sinais de defesa em plantas derivados de ácidos graxos. Em outro trabalho, os autores observaram que o acúmulo massivo de 12-oxofitodienóico e ácido jasmônico ocorreu apenas no local onde uma proteína elicitadora de morte celular foi infiltrada, e em outras áreas, suas concentrações foram baixas, indicando uma resposta local, somente nas áreas adjacentes a lesão (DHONDT et al., 2002).

O jasmonato proporciona proteção contra patógenos em diversas espécies de plantas, e pode envolver duas vias: a via jasmonato-etileno e via de resistência sistêmica. Os mecanismos de resposta que o jasmonato desempenha sobre os patógenos ainda não são bem compreendidos, mas um estudo em *Arabidopsis* cita que estes sinais podem induzir genes relacionados à patogênese e defensinas (THALER; OWEN; HIGGINS, 2004).

A proteína hipotética identificada à jusante da região intergênica onde o Tn5 se inseriu, é descrita como pertencente de uma Superfamília de ferritinas, que são constituídas de proteínas com um grande número de funções biológicas, como a regulação do ferro, mono-oxigenação, e produção de radicais reativos. As acyl-ACP desaturases pertecem a essa

superfamília de ferritinas, e de alguma forma podem estar envolvidas na atividade das patatinas, estando relacionadas à desaturação de ácidos graxos, lembrando que estes são precursores das oxilipinas. Diferentes Acyl-ACP desaturases já foram exploradas como enzimas de potencial aplicação em indústrias de produção de óleos vegetais monoinsaturados, demonstrando a capacidade destas enzimas em modificarem lipídeos nas plantas (SCHULTZ; SUH; OHLROGGE, 2000).

A análise dos genes nocauteados para o mutante *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M01, levanta hipóteses de que um dos mecanismos que pode estar envolvido no controle da podridão mole de *P. carotovora*, em plantas de *Oncidium* Alowa Iwanaga, esteja relacionada à Resposta Hipersensitiva (HR) elicitada por enzimas produzidas por microrganismos.

A Resposta Hipersensitiva (HR) frente a microrganismos é uma das mais drásticas reprogramações metabólicas e celulares que diferentes células de planta podem realizar. A HR é caracterizada por morte celular do hospedeiro, que contribui para o estabelecimento de um estado de eficiente resistência antimicrobiana em células vivas ao redor da área de lesão, devido a síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese, e também o reforço da parede celular nas áreas vizinhas a infecção (DANGL; DIERICH; RICHBERG, 1996).

5.8.2 Mutantes com inserção na região codificadora de Proteínas Hipotéticas com traços da sequência do 23S rDNA

Os mutantes *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M02, M03, M08, M09 e M13, apresentaram uma inserção do Tn5 dentro de uma proteína hipotética BMULJ_05092 ou BMULJ_05093 de *Burkholderia multivorans* ATCC17616, apresentando traços da sequência do 23S rRNA, quando estas são comparadas com o banco de dados de proteínas através do Blastx. No entanto, a análise contra a base de dados do GenBank por meio da ferramenta Blastn, mostrou um alinhamento com alto score e identidade para o gene do 23S rRNA.

A mutação no gene 23S rRNA pode ter seu efeito indiretamente associado a mutação em si, devido a mudanças nos sítios de ligação de proteínas ribossomais. Proteínas ribossomais são proteínas que em conjugação com o rRNA, compõem as subunidades ribossomais envolvidas no processo celular de tradução. Processos biológicos que podem ser afetados por alteração nos sítios de ligação a proteínas ribossomais envolvem resistência a antibióticos, efeitos fisiológicos (sensibilidade a temperatura), e outros processos celulares envolvidos com o crescimento (NOMURA; MORGAN, 1977).

Consequências da mutação em regiões do gene 23S rRNA são descritas na literatura e em sua maioria estão envolvidas como determinantes nas mudanças do padrão de resistência a antibióticos. Quatro diferentes mutações em experimentos individuais sobre regiões do 23S de *Mycobacterium smegmatis*, uma linhagem contendo uma cópia única do operon rRNA, resultaram em uma diminuição significativa na suceptibilidade ao antibiótico nemulina, e também resistência cruzada a cloranfenicol e linezolido. Tais mutações nem sempre se posicionam diretamente no sítio de ligação aos antibióticos, mas perturbam indiretamente a estrutura dos sítios ligantes das drogas ou alteram a flexibilidade local que causa a resistência. No entanto, esta situação não é tão simples, pois em alguns casos, as mutações são toleradas por um organismo e deletérias ou letais para outros; e em outros casos, um fenótipo de resistência pode depender da presença de múltiplas mutações nos rRNA ou nas proteínas ribossomais (LONG et al., 2009). Outros trabalhos relatando a mudança no padrão de susceptibilidade a antibióticos devido a diferente mutações no 23S ribossomal, geralmente se localizando no centro da peptidil tranferase, estão disponíveis na literatura, como a resistência a evernimicina em *Streptococcus pneumoniae* (ADRIAN et al., 2000); oxazolidinona em *Escherichia coli* (XIONG et al., 2000; BOBKOVA et al., 2003); eritromicina em *Thermus thermophilus* (GREGORY; CATE; DAHBERG, 2001); claritomicina em *Helicobater pylori* (KIM et al., 2002); anisomicina em *Haloarcula marismortui* (BLAHA et al., 2008), entre outros.

Liiv e O'Connor (2006) demonstraram que mutações no 23S rDNA, em regiões envolvidas na formação de sete das vinte pontes de ligação de intersubunidades no ribossomo de *Escherichia coli*, afetaram a formação da subunidade 70S. Sabe-se que as subunidades dos ribossomos são unidas por uma série de pontes que são conservadas entre mitocôndrias e ribossomos eucarióticos e procarióticos. Além da união das subunidades do ribossomo serem importantes para o início da síntese de proteínas, uma variedade de funções são propostas para estas pontes, como a transmissão de sinais entre centros funcionais de duas subunidades, modulação do tRNA (RNA transportador) e fatores de interação dos ribossomos, e mediação durante a movimentação de pequenas e grandes subunidades ribossomais durante a translocação.

A construção de uma biblioteca de mutantes de *B. cenocepacia* K56-2, utilizando transposon, foi realizada a fim de se investigar genes importantes para o sucesso da colonização destes isolados em infecções crônicas no pulmão de pacientes com fibrose cística. Foram encontrados 102 mutantes defectivos na sobrevivência *in vivo*, ou que tiveram sua capacidade atenuada, e as regiões flanqueadoras do sítio de inserção do transposon foram

identificadas. Genes envolvidos em cinco diferentes categorias: metabolismo, duplicação/recombinação/tradução do DNA, regulação, superfície celular e transporte foram identificados. Quatro dos 102 mutantes apresentaram um inserção dentro do gene 23S rRNA, em dois operons (HUNT et al., 2004). Não se conhece até o momento a função dos conjuntos de rRNA na virulência de *B. cenocepacia*, mas em *E. coli*, cinco dos sete operons de rRNA presentes no genoma, são necessários para dar suporte a um ótimo crescimento em meio de cultura complexo, enquanto todos os sete operons são necessários para rápida adaptação a mudanças de nutrientes e temperatura (CONDON et al., 1995). Em *E. coli*, acredita-se que esse número abundante de operons rRNA existem para suportar os altos níveis de produção de ribossomos necessários para uma rápida taxa de crescimento. Outras duas possíveis razões para esse abundante número de cópias pode ser hipotetizada, uma delas pode ser que cada um desses operons estão envolvidos em funções celulares específicas, ou estes operons operam sobre condições fisiológicas particulares, conferindo vantagem em algumas circunstâncias, e o questionamento sobre a heterogeneidade entre os promotores dos operons tem sido questionada (NOMURA; MORGAN, 1977). Em um estudo com *B. multivorans* ATCC17616, foi observado que esta linhagem possui 3 cromossomos de 3.4, 2.5 e 0.9 Mb de tamanho (cromossomos 1, 2 e 3, respectivamente), e cada cromossomo contem pelo meno menos uma cópia do operon rRNA (KOMATSU et al., 2003).

Embora cinco mutantes foram apresentados (M02, M03, M08, M09 e M13) no presente trabalho como defectivos para o controle da podridão mole, outros mutantes também apresentaram mutações para o 23s rDNA, no entanto, foi observado uma instabilidade deste fenótipo ao longo das repetições dos experimentos e descartados para esta análise. A alta ocorrência de mutantes para o gene 23S rRNA pode ter sido favorecida pela natureza da própria mutação. Como citado acima por Long et al. (2009), mutações em determinados sítios do 23S ribossomal pode elevar a resistência a diferentes antibióticos, aumentando o fitness do microrganismo, o que pode ter conferido vantagem durante o crescimento dos transformantes em meio suplementado com canamicina, frente a outras classes de mutações que podem ter sido deletérias ou fatais. O sulfato de canamicina trata-se de um agente antibiótico da classe dos aminoglicosídeos. Os aminoglicosídeos são açúcares hidrofílicos multifuncionais que possuem alta afinidade para certas porções do RNA, especialmente para o rRNA de procariotos (KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2009).

Finalizando, a associação da mutação no gene 23S rRNA com o fenótipo dos mutantes *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M02, M03, M08, M09 e M13 observado ainda é obscuro e exige estudos mais aprofundados. No entanto, baseado na literatura, é concebível a hipótese de que,

de forma similar a *E. coli*, em *Burholderia cenocepacia*, a adaptação a condições ambientais *in vivo* podem requerer genes do operon rRNA.

5.8.3 Mutantes com inserção na região codificadora da Glicosil Transferase do Grupo I

Os mutantes *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 M04, M05 e M10 apresentaram uma inserção do Tn5 dentro de uma proteína glicosiltransferase do grupo 1 de diversas espécies bacterianas. No entanto, a análise contra a base de dados do GenBank, por meio da ferramenta Blastn, não encontrou nenhuma sequência de DNA similar às sequências flanqueadoras do Tn5 nestes mutantes, podendo se tratar de alguma proteína desconhecida que contenha homologia de sequência ou sítios conservados das glicosiltransferases.

As glicosiltransferases do grupo 1 catalisam a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativas para moléculas aceptoras específicas, formando ligações glicosídicas. Estas moléculas aceptoras podem ser lipídeos, proteínas, compostos herocíclicos, e outros resíduos de carboidratos. Estas proteínas representam uma das enzimas mais abundantes em sistemas biológicos, sendo responsáveis por catalisar a síntese de gliconjugados. Os gliconjugados incluem glicolipídeos, glicoproteínas e polissacarídeos, que são sintetizados pela transferência de um resíduo mono ou oligossacarídeo que inicia o alongamento de uma cadeia de carboidrato. A glicosilação é uma reação altamente específica em relação à configuração anomérica do resíduo de açúcar e o sítio de adição (KAPITONOV; YU, 1999).

As glicosiltransferases estão envolvidas na síntese de inúmeros compostos ativos naturais contendo carbono, como os oligossacarídeos, na biossíntese de antibióticos (LUZHETSKYY; VENTE; BECHTHOLD, 2005). Em alguns casos, frações de açúcar auxiliam a solubilização de produtos naturais, por tornar possível que porções hidrofóbicas partilhem para fases aquosas, desse modo, estabelecendo concentrações intracelulares e extracelulares. Este pode ser o caso de um açúcar GlcNAc do tipo *housekeeping*, adicionado no núcleo heptapeptídeo do teicoplanina ou na cadeia dimanosila da ramoplanina. A análise da sequência do cluster A40926 de biossíntese do antibiótico revelou um gene da glicosiltransferase. Foi sugerido que esta glicosiltransferase realiza a manolização durante a secreção deste antibiótico, em contraste com o mecanismo de transferência glicosil que ocorre nos compostos quando dentro da célula. As transferências glicosil podem ter uma função de

proteção à célula. Por exemplo, glicosilações que promovem uma inativação temporária do antibiótico recém-produzido podem ocorrer no microrganismo. Somente quando o antibiótico latente é secretado, as glicosidades hidrolíticas reativam o antibiótico pela remoção da hexose (WALSH; MEYERS; LOSEY, 2003). Por meio deste estudo, pôde-se atribuir às glicosiltransferases uma importância na modulação da maturação de antibióticos, permitindo que estes sejam armazenados de forma inativa, quando intracelularmente, e realizar sua ativação quando este é secretado para o meio externo.

Ormeño-Orrillo et al. (2008) avaliaram 3 mutantes Tn5 de *Rhizobium tropici* CIAT889 que apresentaram ser defectivos na biossíntese de um lipopolissacarídeo (LPS), e estes foram avaliados quanto a capacidade de colonização interna da raiz e rizosfera de milho. Foi observado que os mutantes colonizavam a planta em menor extensão quando comparada a linhagem selvagem. Parâmetros de motilidade e taxa de crescimento também foram avaliadas nestes mutantes, mas não foram suficientes para explicar essa mudança no comportamento de colonização. No entanto, os mutantes apresentaram sensibilidade a um composto antimicrobiano produzido pelo milho, a 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA), sugerindo que este lipolissacarídeo pode proteger *Rhizobium tropici* contra as respostas de defesa da planta durante a colonização da rizosfera e raiz. A sequência parcial de uma das regiões flanqueadas pelo transposon nestes mutantes demonstrou similaridade com uma β-glicosiltransferase, que pode ser essencial para montagem deste lipolissacarídeo. Os lipolissacarídeos (LPS) são complexos de glicolipídeos, que são os principais componentes das camadas externas da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Estes lipolissacarídeos são importantes para a interação com o ambiente e hospedeiros eucarióticos.

Em interações planta-microrganismos, diversas funções já foram propostas para o LPSs, contribuindo na adaptação celular para um ótimo contato célula-célula em relações simbióticas, ou como uma barreira protetora conta compostos antimicrobianos (LEROUGE; VANDERLEYDEN, 2001; SHARYPOVA et al., 2003).

Os LPSs em *B. cepacia* têm sido associados como elicitadores da resposta de defesa de *Nicotinae tabacum* contra esporos do oomiceto *Phytophtora nicotianae*. A atividade elicitadora de defesa da planta tem sido associada com a indução de proteínas-PR em plantas, que estão associadas à resistência adquirida, porém, pouco é conhecido sobre este mecanismo. A resistência adquirida é definida como um sistema de resposta das plantas após indução por linhagens fracamente agressivas, avirulentas ou organismos com formas incompatíveis de causarem doença. Com a resistência adquirida, um grupo de genes protetores, incluindo aqueles que estão relacionados a patogênese, são expressos (COVENTRY; DUBERY, 2001).

Pode-se observar que a atividade da glicosiltransferase está envolvida na biossíntese de diferentes compostos biológicos, e uma mutação em seu gene pode alterar os mais diversos aspectos do metabolismo em bactérias. Embora alguns exemplos da literatura auxiliem na tentativa de criar uma hipótese da importância das glicosiltransferases sobre o fenótipo observado nos mutantes, a associação desta mutação precisa ser estudada de forma aprofundada, uma vez que cada glicosiltransferase possui doadores, aceptores e ligações específicas, que são responsáveis pela biossíntese destas estruturas complexas (UNLIGIL; RINI, 2000). Além disso, existe um grande número de glicosiltransferases nos organismos, e esta quantia está proporcionalmente relacionada com o número total de genes no genoma. As glicosiltransferases contabilizam cerca de 1% a 2% dos produtos gênicos de um organismo, sejam eles uma archea, uma bactéria ou um eucarioto (LAIRSON et al., 2008).

5.8.4 Mutantes com inserção na região codificadora da Glutamato Sintase (ferredoxina)

A análise de dois mutantes de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3, M06 e M14, reveleram uma sequência flanqueadora da inserção do Tn5 identificada para uma glutamato sintase dependente de ferredoxina. A glutamato sintase cataliza a transferência redutora de um grupo amido da glutamina para a posição α-ceto da 2-oxoglutarato, resultando na formação de duas moléculas de glutamato e amônia. A glutamato sintase é enzima encontrada em diversas plantas e bactérias, e ocorre em três formas distintas: uma glutamato dependente de NADH, uma glutamato dependente de NADPH, e uma glutamato dependente de ferredoxina. O NADH, NADPH e a ferredoxina são cofatores necessários para transferência intermolecular. Estas formas diferem na massa molecular, composição de subunidades, cinética enzimática, especificidade de cofatores e antigênica, e função metabólica. Em bactérias, ocorrem duas formas distintas, a ferredoxina-glutamato sintase e a NADPH-glutamato sintase (NALBANTOGLU, 1998).

A glutamato sintase está envolvida em diversos processos como o metabolismo do glutamato, aspartato e alanina; o metabolismo do nitrogênio principalmente em bactérias fixadoras de nitrogênio; entre outras rotas metabólicas (MENARD et al., 2007).

Em bactérias, o glutamato não é somente precursor de outros aminoácidos, mas também está envolvido em outros processos biológicos, como a osmorregulação, fonte de grupos aminos para produção de antibióticos, e em alguns casos, como precursor da

biossíntese de ferro, como substrato de proteínas carreadoras de acila (ACP).

Bactérias que habitam ambientes que sofrem influência dos produtos metabólicos das plantas e outros microrganismos necessitam de mecanismos osmoadaptativos para sobreviverem nestes locais, uma vez que há uma grande mudança de composição química ao longo do tempo. O acúmulo de glutamato por *Rhizobium* sp. tolerante a sais já foi relatado quando esta bactéria foi crescida em meio com alta osmolaridade, sendo proposto que a via glutamina sintetase / glumato sintase é importante para a biossíntese de glutamato durante o estresse salino. Em experimentos com pseumonados e azospirilla também foi observado um acúmulo de glutamato, porém os mecanismos relacionados ao efeito do glutamato sobre a alta osmolaridade ainda não são bem explorados. Em pseumonados, foi observado que a tolerância osmótica apresentou correlação com a habilidade destes microrganismos em colonizarem o sistema radicular de batata. Umas das explicações é que a alta concentração de sais aumenta a transpiração da planta, e estas aberturas naturais são a principal porta de entrada para estes microrganismos. Desta forma, uma mutação em genes da glutamato sintase pode afetar a habilidade de bactérias em colonizar plantas, perdendo competitividade frente a outros microrganismos no mesmo ambiente (MILLER; WOOD, 1996).

As glutamato sintases podem, em alguns casos, atuarem como precursores da biossíntese de ferro, servindo de substrato para proteínas carreadoras de acila (AC). As proteínas carreadoras de acila (ACP) possuem papel central na síntese e transferência de grupamentos acila de uma variedade de produtos lipídicos. Além da biossintese de ácidos graxos, podem ser doadoras de grupos acil para a síntese de fosfolipideos, lipídio A, hemolisinas e acil homoserina lactonas (GONG; BYERS, 2003), sendo muitas dessas moléculas de natureza lipídicas, podem estar envolvidas na ativação do sistema de resposta de defesa da planta, e no caso das acil homoserina lactonas, influenciar as interações entre microrganismos de um mesmo ambiente e a síntese de antibióticos. As ACPs tratam-se de proteínas que interagem com sistemas multienzimáticos de síntese de ácidos-graxos ou sintases policetídeos, como a síntese de antibióticos policetídeos. Os policetídeos são cadeias de ácidos graxos provenientes do metabolismo secundário que podem apresentar atividades farmacológicas como antitumorais, imunosupressores, fitoalexinas e antibióticos (WATANABE; PRASEUTH; WANG, 2007).

Em um estudo correlacionando o metabolismo primário e secundário na produção de antibióticos por *Streptomyces tenebrarius*, foi observado que a biossíntese de antibióticos aminoglicosídeos necessitam de um glutamato como fonte de grupo amino reduzido por reações de aminação (BORODINA et al., 2005). No presente trabalho, diante da perda da

capacidade destes mutantes em controlar *P. carotovora*, em *Oncidium* Alowa Iwanaga, pode-se hipotetizar que a interrupção do gene da enzima glutamato sintase afetou vias metabólicas centrais que indiretamente podem ter interferido na síntese de antibióticos; ou talvez na produção de moléculas quorum sensing, que segundo a literatura estão associadas a regulação de diversos genes bacterianos associados a produção de antibióticos e de interação microrganismo-microrganismo e microrganismo-planta; na adaptação ao meio durante a colonização, devido às evidências do glutamato participar da osmorregulação de bactérias em ambientes com alto estresse hídrico, conferindo vantagem em competição pelo nicho.

5.8.5 Mutantes com inserção na região codificadora de Transportadores da Superfamília Facilitadora Principal (MFS)

A análise da sequência flanqueadora da inserção do Tn5 em três mutantes (M07, M11 e M12) de *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 estão relacionadas com transportadores da Superfamília Facilitadora Principal (MFS). Esta Superfamília é um grupo grande e diverso de transportadores secundários, compostos de proteínas uniporte, simporte e antiporte. Essas proteínas MFS facilitam o transporte de uma variedade de substratos através da membrana citoplasmática interna, incluindo íons, açúcares, açúcares fosfato, drogas, neurotransmissores, nucleosídeos, aminoácidos, peptídeos e outros solutos hidrofílicos (LEMIEUX; HUANG; WANG, 2004). Em bactérias, os sistemas de transporte permitem a captação de nutrientes e íons, a excreção de produtos finais do metabolismo e substâncias deletérias, e a comunicação entre células e com o ambiente (PAO; PAULSEN; SAIER, 1998).

A PcaK é uma permease 4-hidroxibenzoato (4-HBA) presente na bactéria *Pseudomonas putida*, e pode mediar a quimiotaxia nessa bactéria. A PcaK é encontrada em membros da MFS, sendo um transportador da família H simporter de ácidos aromáticos. A quimiotaxia é um fenômeno em que células bacterianas se movimentam no ambiente de acordo com a disponibilidade de certas substâncias químicas. Em ensaios de quimiotaxia feitos com mutantes completamente defectivos na expressão da PcaK, o 4-HBA não conseguiu se difundir pela membrana plasmática para dentro da célula em taxas que a bactéria fosse capaz de sentir e responder a este ácido orgânico, e pode influenciar na motilidade e colonização de nichos (DITTY; HARWOOD, 2002).

Em *Erwinia amylovora*, o agente causal da doença da ferrugem em rosaceas, um sistema de transporte de efluxo de multidrogas auxilia na competição *in vitro* com bactérias

epifíticas. *E. amylovora* acessa os tecidos da planta, colonizando a superfície do estigma, competindo por espaço e fonte de nutrientes com a comunidade epifítica. Diversos desses microrganismos epifíticos são capazes de sintetizar antibióticos que podem antagonizar a bactéria fitopatogênica. Foi identificado um transportador de efluxo de multidrogas *NorM*, da MFS, que confere a *E. amylovora* tolerância às toxinas produzidos por esses microrganismos. Um mutante *NorM* foi construído e embora sua virulência fosse observada na planta hospedeira, o fitopatógeno se tornou suscetível aos antibióticos produzidos pelo epífitos, mostrando que os transportadores da MFS podem empenhar um importante papel na competição entre os microrganismos no ambientes naturais (BURSE; WEINGART; ULLRICH, 2003). Sistemas de resistência a multidrogas e solventes orgânicos podem ser observados em *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, e o não patógeno *Pseudomonas putida*, e são causadas pela sinergia entre a baixa permeabilidade da membrana externa combinada com a expressão de um conjunto de proteínas transportadoras específicas. Estes sistemas, além do efluxo de drogas, exportam outros compostos: biocidas, corantes, detergentes, inibidores metabólicos, solventes orgânicos e moléculas envolvidas na comunicação célula-célula em bactérias (SCHWEIZER, 2003).

Outra proteína transportadora representante da MFS são os sideróforos. Os sideróforos são definidos como compostos microbianos de baixo peso molecular com uma alta afinidade por ferro. Sua função é mediar a captação de ferro para as células microbianas. Embora a maior parte dos sideróforos seja solúvel em água e excretada para o ambiente, existem alguns sideróforos que não são secretados em sua totalidade, como a micobacitinas, sintetizadas por micobactérias, que são localizadas entre o envelope celular. A principal função dos sideróforos é adquirir ferro de hidróxidos insolúveis ou de ferro absorvido de superfícies sólidas, mas também são capazes de extrair ferro de vários outros compostos solúveis e insolúveis, como o citrato férrico, fosfato férrico, Fe-transferrina, ferritina ou ferro conjugado a açúcares, pigmentos flavonóides de plantas, entre outros. Em ambientes onde a disponibilidade de ferro é limitada, uma alta concentração local de sideróforos pode ser produzida quando existem células vizinhas. Esta superprodução de sideróforos pode ser um recurso a ser utilizado na adaptação de bactérias e fungos em seus hospedeiros, e na capacidade do aumento da virulência (WINKELMANN, 2002), sendo mais um mecanismo para competição entre microrganismos.

A mutação em proteínas transportadoras da MFS pode resultar em diferentes conseqüências metabólicas aos microrganismos, que podem resultar em uma redução do

fitness da bactéria no ambiente e menor competitividade devido ao aumento da suscetibilidade a antibióticos e compostos tóxicos produzidos por seus hospedeiros, e competitividade contra microrganismos vivendo no mesmo ambiente, na competição por nutrientes, motilidade e diversos outros mecanismos biológicos. Assim como as glicosiltransferases, diversas famílias de transportadores da MFS ocorrem em bactérias, com diferentes proteínas que realizam inúmeras atividades biológicas. Logo, um estudo mais aprofundado sobre esta proteína de transporte membrânico é necessário para relacionar ao fenótipo defectivo dos mutantes frente a podridão mole em orquídeas.

5.8.6 Mutante com inserção na região codificadora da Poli-beta-hidroxialcanoato Depolimerase

A sequência flanqueadora da inserção do Tn5 identificada no mutante M16, restão relacionadas a uma Poli-beta-hidroalcanoato depolimerase. Os poli-hidroxialcanoatos (PHAs) bacterianos são poliésteres hidroxiácidos produzidos como grânulos intracelulares por uma grande variedade de bactérias quando crescem em condições subótimas. Os grânulos de PHA correspondem em mais de 90% do peso seco da bactéria, sendo sua diversidade química muito ampla. A maioria das bactérias acumula PHA como estoque de carbono e energia se uma fonte de carbono é disponibilizada em excesso, e se qualquer outro nutriente, como um nitrogênio, enxofre, fosfato, ferro, magnésio, potássio ou oxigênio está limitado. Quando o suprimento de um nutriente se torna limitado, o PHA pode ser depolimerizado e subsequentemente metabolizado como uma fonte de carbono e energia (KESSLER; WITHOLT, 2001). A importância ecológica do acúmulo de PHAs é cogitada para que seja usado pela bactéria para aumentar a capacidade de sobrevivência e tolerância ao estresse em mudanças ambientais, e determinante competitivo onde as fontes de carbono e energia são limitadas, como encontradas muitas vezes no solo e rizosfera (KADOURI et al., 2005). Com um melhor estudo, será possível compreender a função que o PHAs como um polímero de estoque de fundamental importância em ecologia microbiana, e tratar de estratégia beneficiadora da manutenção de inoculantes em plantas e solos.

A via de degradação do PHA é iniciada com a depolimerização do PHA para monômeros de β-hidroxibutirato por uma PHA depolimerase (codificado pela *phaZ*), e pode ocorrer tanto intracelularmente ou extracelularmente. As PHA depolimerases são secretadas extracelularmente por várias bactérias de ambientes muito variados, sob condições aeróbicas e

anaeróbicas. Esta secreção externa serve para a utilização de PHAs no ambiente após a lise de células em que estes compostos foram acumulados. Em contraste, as PHA depolimerases intracelulares degradam grânulos de PHA acumulados internamente em casos de ausência de fontes adequadas de carbono e energia exógena (KADOURI et al., 2005).

Avaliando dois mutantes de *Pseudomonas resinovorans*, um com atividade total e o outro com atividade parcial bloqueada por uma transposição no gene phaZ, que realiza a depolimerização do PHA, foram comparados ao selvagem. Os pesquisadores observaram que os mutantes, quando crescidos em meio contendo fonte de nitrogênio limitada por 5 dias, ou excesso de nitrogênio por 3 dias. Um decréscimo dramático na quantidade PHA foi observado no selvagem durante os 5 dias de limitação de nitrogênio, enquanto que para as duas linhagens mutantes não foi observada nenhuma mudança nas duas fases de crescimento. Estes resultados demonstram a importância da atividade da enzima polihidroxialcanoato depolimerase na adaptação a variações de disponibilidade de nutrientes no ambiente (SOLAIMAN; ASHBY; FOGLIA, 2003).

Portanto, as PHAs depolimerases podem desempenhar um importante papel para adaptação de células bacterianas em diferentes condições de estresse ambiental, como a baixa disponibilidade de nutrientes e fatores químicos, físicos e biológicos nocivos. Para lidar com essas mudanças em ambientes oligotróficos, muitas bactérias desenvolvem estratégias para sobrevivência, e o acúmulo e degradação de PHA foram hipotetizadas como uma forma das bactérias melhorarem seu estabelecimento, proliferação e sobrevivência em ambientes competitivos.

5.8.7 Mutante com inserção na região codificadora da Ácido-graxo Desaturase

A mutação identificada para a sequência flanqueadora do Tn5 no mutante M15 foi identificada para o gene de uma ácido-graxo desaturase. As ácido-graxo desaturases são enzimas que desempenham um papel essencial no metabolismo dos ácidos graxos e a regulação da fluidez da membrana celular. Sabe-se que diversos tipos de estresses ambientais, como térmico e osmótico, causam alterações nas propriedades físicas da membrana lipídica de células vivas. Estas células percebem estas alterações via proteínas sensoras e transferem estes sinais do ambiente por uma comunicação via sinais de transdução, que resultam na regulação da expressão gênica. O estado físico da membrana lipídica age diretamente sobre a regulação

da atividade das proteínas de membrana, como a translocação de pequenas moléculas, canais de íons, receptores associados às proteínas kinases, e proteínas sensoras (LOS; MURATA, 2004). As enzimas ácido graxo desaturases mostraram ser importantes para adaptação de *Bacillus subtilis* ao choque térmico quando expostas a baixas temperaturas (WEBER et al., 2001).

Em plantas, ácido graxo desaturases podem desempenhar importante papel em sistema de defesa em plantas. Uma mutação recessiva *ssi2* resultou em um aumento na resistência a *Peronospora parasítica*, porém, em contraste, um subconjunto de respostas de defesa reguladas pela via de sinalização do ácido jasmônico (JA), incluindo a expressão de defensina e a resistência a *Botrytis cinerea* pela planta foi prejudicada. Uma abordagem baseada no mapeamento da *ssi2* mostrou que esta codifica uma estearoil-ACP desaturase, um ácido graxo desaturase arquetípico membro de uma família de ácidos graxos desaturases solúveis. Estas enzimas desempenham um importante papel na regulação do nível geral de ácidos graxos insaturados da célula, e neste trabalho foi observado que diferenças no perfil de ácidos graxos insaturados levam a indução de determinadas respostas de defesa e a inibição de outros, propondo que sinais derivados dos ácidos graxos modulam a comunicação de diferentes vias de sinalização (KACHROO et al., 2001). Este trabalho demonstra que as ácido graxo desaturases podem se comportar como elicitadoras de resposta de defesa na planta, mas a possibilidade de enzimas dessa natureza, derivadas de microrganismos, estarem envolvidas neste mecanismo exigem estudos mais aprofundados.

Os resultados obtidos até o momento levantam a hipótese de que vários mecanismos podem atuar em conjunto para o controle biológico de *P. carotovora* por *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 em *Oncidium*. Estes possíveis mecanismos estão associados à síntese de compostos antimicrobianos, indução de respostas de defesa na planta hospedeira, competição por nutrientes, capacidade de colonização, interações entre microrganismos, entre outras estratégias.

Compant et al. (2005) em sua revisão, reforça a idéia de que diferentes mecanismos estão associados ao controle de patógenos, desde ações diretas contra o patógeno, e ações indiretas, mediando os sistema de defesa da planta. Dentre os mecanismos citados pelo autor, estão: a competitividade durante a colonização da planta, que é dependente da competência de cada microrganismo em sobreviver e proliferar nos tecidos da planta por um período considerável de tempo, na presença dos habitantes naturais e frente às condições ambientais. A biossíntese de aleloquímicos bacterianos pode contribuir nesta competição, como a produção de sideróforos quelatizantes de ferro (ambientes naturais geralmente possuem uma

baixa biodisponibilidade de ferro), antibióticos, biocidas voláteis, enzimas líticas (parasitismo em fungos), e enzimas de detoxificação (detoxificação de fatores de virulências produzidos por patógenos e toxinas vegetais). Somando a essas propriedades, a interação com o hospedeiro, através da indução do sistema de defesa (ISR), um fenômeno semelhante a SAR resistência sistêmica adquirida, que difere por não causar sintomas visíveis na planta hospedeira e sim apenas uma reação de hipersensibilidade, geralmente induzida por bactérias não patogênicas a planta. A SAR se desenvolve quando a planta ativa com sucesso seu mecanismo de defesa em resposta primária a infecção por um patógeno, onde ocorre uma lesão necrótica local e excisão do tecido.

Este trabalho é mais um exemplo que, a supressão de doenças em plantas por agentes de biocontrole está relacionada aos multi-fatores que interagem simultaneamente, configurando as interações ecológicas no meio. A avaliação de variações fenotípicas de mutantes produzidos por técnicas de mutagênese aleatória e a identificação de genes associados, mostram que esta estratégia é adequada para estudos de sistemas complexos.

6 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos no presente estudo, foram identificados 7 genes associados ao controle da podridão mole, com isso, foi possível concluir que:

- Isolados de *Burkholderia* spp. obtidos de cana de açúcar são capazes de controlar a podridão mole de *Oncidium* sp. causada por *P. carotovora,*

- A mutagênese aleatória por transposon constitui uma abordagem eficiente na identificação de genes envolvidos no controle da podridão mole de *Pectobacterium carotovora* pela linhagem de *Burkholderia cepacia* TC3.4.2R3 (O SEQUENCIAMENTO DO GENE Rec MOSTROU ISSO), permitindo gerar uma biblioteca de mutantes com perda da expressão de diferentes genes;

- O controle deste patógeno por *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 em *Oncidium* ocorre por meio da produção de compostos aleloquímicos, competição por nutrientes, adaptação às condições ambientais, interação com a planta hospedeira, e entre microrganismos.

- Como perspectiva futura, um estudo mais aprofundado, a partir de uma análise mais específica e pontual para cada gene interrompido, auxiliarão no entendimento dos processos alterados nestes mutantes e a sua importância nas interações entre microrganismos em sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS*

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.

ADRIAN, P. V.; MENDRICK, C.; LOEBENBERG, D.; McNICHOLAS, P.; SHAW, K. J.; KLUGMAN, K. P.; HARE, R. S.; BLACK, T. A. Evernimicin (SCH27899) Inhibtis a Novel Ribosome Target Site: Analysis of 23S Ribosomal DNA Mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3101-3106, 2000.

ANDERSSON, R. A.; ERIKSSON, A. R. B.; HEIKINHEIMO, R.; MÄE, A.; PIRHONEN, M.; KÖIV, V.; HYYTIÄINEN, H.; TUIKKALA, A.; PALVA, T. Quorum Sensing in the Plant Pathogen *Erwinia cartovora* subsp. *caratovora*: The Role of expREcc. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 13, p. 384-393, 2000.

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, 1988.

AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J.; TOTH, R. L.; TOTH, I. K. Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Taxonomy and Identification of the Soft Rot Bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Applied and Environmental Micriobiology**, v. 68, p. 1499-1508, 2002.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico.** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, 2000. v. 3, p. 57-87.

BAKKER, P. A. H. M.; RAN, L. X.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Understanding the Involvement of Rhizobacteria-mediated Induction of Systematic Resistence in Biocontrol of Plant Diseases. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 25, p. 5-9, 2003.

---

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

BAMKEKE, F. V.; BALZI, E.; TULKENS, P. M. Antibiotic Efflux Pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 457-470, 2000.

BARBOSA, A. S.; LIN, C. J. Silenciamento de Genes com RNA Intererência: Um Novo Instrumento para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, p. 612-619, 2004.

BASNAYAKE, W. V. S.; BIRCH, R. G. A Gene from *Alcaligenes denitrificans* that Confers Albicidin Resistence by Reversible Antibiotic Binding. **Microbiology**, v. 141, p. 551-560, 1995.

BAUER, D. W., BOGDANOVE, A. J., BEER, S. V., AND COLLMER, A. *Erwinia chrysanthemi hrp* Genes and their Involvement in Soft Rot Pathogenesis and Elicitation of the Hypersensitive Response. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 7, p. 573-581, 1994.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALMANN, A.; TUZUN, S. Induction of Defense-Related Ultrastructural Modification in Pea Root Tissues Inoculated with Endophytic Bacteria. **Plant Physiology**, v. 112, p. 919-929, 1996.

BEVININO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MC17 in Disease Supression and Growth Promotion of Maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 225-231, 2000.

BLAHA, G.; GUREL, G; SCHROEDER, S. J.; MOORE, P. B.; STEITZ, T. A. Mutations Outside the Anisomycin-Binding Site can Make Ribosomes Drug-Resistent. **Journal Molecular Biology**, v. 379, p. 505-519, 2008.

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

BOBKOVA, E. V.; YAN, Y. P.; JORDAN, D. B.; KURILLA, M. G.; POMPLIANO, D. L. Catalytic Properties of Mutant 23S Ribosomes Resistant to Oxazolidinones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9802-9807, 2003.

BOLWELL, G. P.; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the Generation of Reactive Oxygens

Species in Plant Defence – Broad Perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v. 51, p. 347-366, 1997.

BORODINA, I.; SCHOLLER, C.; ELIASSON, A.; NIELSEN, J. Metabolic Network Analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* Species with a Active Entner-Doudoroff pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2294-2302, 2005.

BOSGELMEZ-TINAZ, G. Quorum Sensing in Gram-negative Bacteria. **Turkey Journal Biology**, v. 27, p. 85-93, 2003.

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.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 155-194, 2005.

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.

BURSE, A.; WEINGART, H.; ULLRICH, M. S. *NorM*, an *Erwinia amylovora* Multidrog Efflux Pump Involved in *In Vitro* Competition with Other Epiphytic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 693-703, 2003.

BUYER, J. S.; SIKORA, L. J. Rhizosphere Interactions and Siderophores. **Plant and Soil**, v. 129, p. 101-107, 1990.

CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA JR., L. J.; FALKINHAM, J. O. Identification and Characteristics of a Novel Burkholderia Strain with Broad-spectrum Antimicrobial Activity. **Applied and Environmental Micriobiology,** v. 66, p. 4139-4141, 2000.

CAMPOS, D. M. **Orquídeas**: Pragas e Doenças. 2. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura,

2002.

CAMPOS, D. A.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of Chalcone Synthase and Phenylalanine Ammonia-lyase by Salicilic Acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in Common Bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.

CAVE, G. L.; THOMAS, W. E. Risk Analysis of the Importation of Moth Orchid, *Phalaenopsis* sp., Plants in Approved Growing Media from Taiwan into the United States. **Animal an Plant Health Inspections Service. Plant Protection and Quarantine**, p. 1-34, 2003.

CHIA-HUI, L.; JIAN-CHENG, L.; VENKATESH, P.; HSIN-HAO, H.; SU-JUAN, Y.; JENT-TURN, L.; NING-SUN, Y.; HSIANG-EN, H.; TENG-YUNG, F.; WEN- HUEI, C.; MING-TSAIR, C. The Sweet Pepper Ferredoxin-like Protein (*pflp*) Conferred Resistance Against Soft Rot Disease in *Oncidium* Orchid. **Transgenic Research**, v. 12, p. 329-336, 2003.

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.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. L.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a Novel Member of *Bulkholderia cepacia* Complex Including Biocontrol and Cystic Fibrosis-Related Isolates. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1481-1490, 2001a.

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, 2001b.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and Significance of *Burkholderia* Species Occupying Diverse Ecological Niches. **Environmental Microbiology,** v. 9, p. 719-729, 2003.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Apllied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4951-

4959, 2005.

CONDON, C.; LIVERIS, D.; SOUIRES, C.; SCHWARTZ, I.; SQUIRES, C. L. rRNA Operon Multiplicity in *Escherichia coli* and the Physiological Implications of rrn Inactivation. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4152-4156, 1995.

COVENTRY, H. S.; DUBERY, I. A. Lipopolysaccharides from Burkholderia cepacia Contribute to an Enhanced Defensive Capacity and the Induction of Pathogenesis-related Protein in Nicotianae tabacum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p. 149-158, 2001.

DANGL, J. L.; DIERICH, R. A.; RICHBERG, M. H. Death don't Have no mercy: Cell Death Programas in Plant-microbe interactions. **Plant Cell**, v. 8, p. 1797-1807, 1996.

DAUGHTREY, M. L.; BENSON, D. M. Principles of Plant Health Management for Ornamental Plants. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 43, p. 141-169, 2005.

De BOER, S. H. Characterization of Pectolytic *Erwinias* as Highly Sophisticated Pathogens of Plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 893-899, 2003.

DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. Charged Amino Acids Conserved in the Aromatic Acid/H+ Synporter Family of Permeases are Required for 4-Hydroxybenzoate Transporte by PcaK from *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 5, p. 1444-1448, 2002.

DHONDT, S.; GEOFFROY, P.; STELMACH, B. A.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. Soluble phospholipase A_2 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.

DHONDT, S.; GOUZERH, G.; MULLER, A.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl-hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogeneous levels of salicycle acid. **The Plant Journal**, v. 32, p. 749-762, 2002.

DONG, Y.; ZHANG, X.; XU, J.; ZHANG, L. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulent by New Form of Microbial Antagonism, Signal Interference. **Applied and Envirornmental Microbiology**, v. 70, p. 954-960, 2004.

DOW, J. M.; FENG, J.; BARBER, C. E.; TANG, J.; DANIELS, M. J. Novel Genes Involved in the Regulation of Pathogenicity Factor Production Within the *rpf* Gene Cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, v. 146, p. 885-891, 2000.

DOW, M.; NEWMAN, M. A.; VON ROEPENACK, E. The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology,** v. 38, p. 241-261, 2000.

DUFF, J.; DALY, A. Orchid Diseases in the Northern Territory. **Agnote,** v. 13, p. 1-5, 2002.

DUFFY, B.; SHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen Self-Defense: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 41, p. 501-538, 2003.

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.

EXPERT, D. Withholding and Exchanging Iron: Interaction Between *Erwinia* ssp. and their Plant Hosts. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 307-334, 1999.

FAST, W. Molecular Radio Jamming: Autoinducer Analogs. **Chemistry Biology**, v. 10, p. 1-3.

FILONOW, A. B.; VISHNIAC, H. S.; ANDERSON, J. A.; JANISIEWICZ, W. J. Biological Control of *Botrytis cineria* in Aple by Yeasts from Various Habitats and their Putative Mechanisms of Antagonism. **Biological Control**, v. 7, p. 212-220, 1996.

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.

GERHARDSON, B. Biological Substitutes for Pesticides. **Trends in Biotechnology,** v. 20, p. 338-343, 2002.

GONG, H.; BYERS, D. M. Glutamate-41 of *Vibrio harveyi* acyl carrier protein is essencial for fatty acid synthase but not acyl-ACP synthetase Activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 302, n. 1, p. 35-40, 2003.

GORYSHIN, I. Y.; REZNIKOFF, W. Tn5 *in Vitro* Transposition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 7367-7374, 1998.

GORYSHIN, I. Y.; JENDRISAK, J.; HOFFMAN, L. M.; MEIS, R.; REZNIKOFF, W. S. Insertional Transposon Mutagenesis by Electroporation of Released Tn5 Transposition Complexes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 97-100, 2000.

GRANT, S. N.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. Differential Plasmid Rescue from Transgenic Mouse DNAs into *Escherichia coli* Methylation-Restriction Mutants. **Procedings National Academic Sciences**, v. 87, p. 4645-4649, 1990.

GREGORY, S. T.; CATE, J. H. D; DAHLBERG, A. E. Spontaneous Erythromycin Resistence Mutation in a 23S rRNA Gene, rrlA, of the Extreme Thermophile *Thermus thermopiles* IB-21. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 14, p. 4382-4385, 2001.

HAMMER, P. E.; HILL, D. S.; LAM, S. T.; VAN PÉE, K.; LIGON, J. M. Four Genes from *Pseudomonas fluorecens* that Encode the Biosynthesis of Pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2147-2154, 1997.

HAAS, D.; KEEL, C.; REIMMANN, C. Signal Transduction in Plant-beneficial Rhizobacteria with Biocontrol Properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 385-395, 2002.

HAUBEN, L; MOORE, E. R. B.; VAUTERIN, L.; STENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 384-397, 1998.

HAYES, F. Transposon-Based Strategies for Microbial Functional Genomics and Proteomics. **Annual Reviews in Genetics**, v. 37, p. 3-29, 2003.

HEUNGENS, K.; PARKE, J. L. Postinfection Biological Control of Oomycete Pathogens of Pea by *Burklholderia 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 Piyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and Role of Pyrrolnitrin Synthesis in Biological Control of Plant Disease. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 78-85, 1994.

HIRSCHBERG, H. J. H. B; SIMONS, J. F. A.; DEKKER, N.; ERGMOND, M. R. Cloning , expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. **European Journal Biochemistry**, v. 268, p. 5037-5044, 2001.

HOLEVA, M. C.; BELL, K. S.; HYMAN, L. J.; AVROVA, A. O.; WHISSON, S. C.; BIRCH, P. R. J.; TOTH, K. Use of a Pooled Transposon Mutation Grid to Demonstrate Roles in Disease Development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* Putative Type III Secreted Effector (DspE/A) and Helper (HrpN) Proteins. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 17, p. 943-950, 2004.

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, Z.; BONSALL, R. F.; MAVRODI, D. V.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with Genes for Biosynthesis of Phenazine-1-carboxylic Acid Improves Biocontrol of Rhizoctonia Root and in Situ Antibiotic Production. **FEMS Microbiology Ecology,** v. 49, p. 243-251, 2004.

HUANG, Y.; WRONG, P. T. W. Effect of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) cepacia and Soil Type on the Control of Crow Rot in Wheat. **Plant and Soil**, v. 203, p. 103-108, 1998.

HUNT, T. A.; KOOI, C.; SOKOL, P. A.; VALVANO, M. A. Identification of *Burkholderia cenocepacia* Genes Required for Bacterial Survival in Vivo. **Infection and Immunity**, v. 72,

n. 7, p. 4010-4022, 2004.

HWANG, J.; BENSON, D. M. Biocontrol of Rhizoctonia Stem and Root Rot of Poinsettia with *Burkholderia cepacia* and Binucleate *Rhizoctonia*. **Plant Disease**, v. 86, p. 47-53, 2002.

HYYTIÄINEN, H. **Regulatory Networks Controlling Virulence in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora***. 2005. 57 f. Tese (Mestrado) - Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2005.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y.; CASTRO-SOWINSKI, S. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydryalkanoates. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 55-67, 2005.

KAMPF, A. N. A. Floricultura Brasileira em Números. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v. 3, p. 1-7, 1997.

KANCHROO, P.; SHANKLIN, J.; SHAH, J.; WHITTLE, E. J.; KLESSIG, D. F. A Fatty Acid Desaturase Modulates the Activation of Defense Signaling Pathways in Plants, **PNAS**, v. 98, n. 16, p. 9448-9453, 2001.

KANG, Y.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M. Characterization of Genes Involved in Biosysnteses of a Novel Antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and Their Role in Biological Control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 64, p. 3969-3947, 1998.

KAPITONOV, D.; YU, R. K. Conserved Domains of Glycosyltransferases. **Glycobiology Oxford**, v. 9, n. 10, p. 961-978, 1999.

KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, C.; LAVILLE, J.; BURGER, U.; WIRTHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Supression of Root Diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the Bacterial Secondary Metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** p. 54-13, 1999.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the Regulatory Network of Polyhydroxyalkanoate Metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.

KIM, K. S.; KANG, J. O.; EUN, C. S.; HAN, D. S.; CHOI, T. Y. Mutations in the 23S rRNA Gene of *Helicobacter pylori* Associated with Clarithomycin Resistance. **Journal Korean Medical Science**, v. 17, p. 599-603, 2002.

KOLTER, R.; INUZUKA, M.; HELINSKI, D. R. **Trans-complementation Dependent Replication of a Low Molecular Weight Origin Fragment from Plasmid R6K**. Cell, Cambridge, v. 15, p. 1199-1208, 1978.

KOMATSU, H.; IMURA, Y.; OHORI, A.; NAGATA, Y.; THUSA, M. Distribuition and Organization of Auxotrophic Genes on the Multichromosomal Genome of *Burkholderia multivorans* ATCC17616. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3333-3343, 2003.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistence and Strategies to Counter Resistence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3249-3256, 2009.

KUC, J. Development and Future Direction of Induced Systemic Resistance in Plants. **Crop Protection**, v. 19, p. 859-861, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAL, 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 Potencial for Plant Growth Promotion. **Environmental Microbiology,** v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software for Computers. **Computer Applied Biosciences,** v. 10, n. 2, p. 189-191, 2004.

KUSANO, T.; SUGAWARA, K. Specific Binding of *Thiobacillus ferrooxidans RbcR* to the Intergenic Sequence Between the *rbc* Operon and the rbcR Gene. **Journal of Bacterioloy**, v. 175, n. 4, p. 1019-1025, 1993.

KUSANO, T.; TAKESHIMA, T.; INOUE, C.; SUGAWARA, K. Evidence for Two Sets of Structural Genes Coding for Ribulose Biophosphate Carobylase in Thiobacillus ferrooxidans. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 7317-7723, 1991.

LAIRSON, L. L.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions and Mechanisms. **Annual Reviews**, v. 77, p. 521-555, 2008.

LAMBERG, A.; NIEMINEN, S.; QIAO, M.; SAVILAHTI, H. Efficient Insertion Mutagenesis Strategy for Bacterial Genomes Involving Electroporation of in Vitro-Assembled DNA Transposition Complexes of Bacteriophage Mu. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 705-712, 2001.

LEMIEUX, M. J.; HUANG, Y.; WANG, D. The Structural Basis of Substrate Translocation by the *Escherichia coli* Glycerol-3-phosphate transporter: a Member of the Major Facilitator Superfamily. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 405-412, 2004.

LEROUGE, I.; VANDERLEYDEN, J. O-antigen Structural Variation: Mechanisms and Possible Roles in Animal/plant-microbe Interactions. **Microbiology Reviews**, v. 26, p. 17-47, 2001.

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.

LIIV, A.; O'CONNOR, M. Mutations in the Subunit Bridge Regions of 23S rRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29850-29862, 2006.

LONG, K. S.; POEHISGAARD; HANSEN, L. H.; HOBBIE, S. N.; BOTTGER, E. C.; VESTER, B. Single 23S rRNA mutations at the ribosomal peptidyl transferase centre confer resistence to valnemulin and other antibiotics in *Mycobacterium smegmatis* by perturbation of drug binding pocket. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1218-1227, 2009.

LOS, D. A.; MURATA, N. Membrana Fluidity and its Roles in the Perception of Environmental Signals. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 142-157, 2004.

LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A. A. C.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic Diversity and Plant-growth Related Features of *Burkholderia* sp. From Sugarcane Roots. **World Journal of Microbiology; Biotechnology**, v. 26, p. 1829-1836, 2010.

DSMZ. **Approved Lists of Bacterial Names. Bacterial Nomeclature Up-to-date**. Braunscheweig, Alemanha. 2010. Disponível em: < http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=BURKHOLDERIA>. Acesso em: 08 out. 2010.

LUZHETSKYY, A.; VENTE, A.; BECHTHOLD, A. Glycosyltransferases involved in the Biosynthesis of Biologicaly Active Natural Products that Contain Oligosaccharides. **Molecular Biosystems**, v. 1, p. 117-126, 2005.

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, 2005.

MAHENTHIRALIGAM, E.; BALDWIN, A.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 533-538, 2002.

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

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.

MARCON, J. **Efeito de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre comunidades bacterianas**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARITS, R., TSHUIKINA, M., PIRHONEN, M., LAASIK, E., MÄE, A. Regulation of the Expression of prtW::gusA Fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Microbiology**, v. 148, p. 835-842, 1999.

MARTINS, K. M. **Avaliação microbiológica e epidemiológica de cepas do Complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística.** 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MCEVOY, J. L., MURATA, H., CHATTERJEE, A. K. Molecular Cloning and Characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Pectin Lyase Gene that Responds to DNA-Damaging Agents. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3284-3289, 1990.

MELLO, C. C.; CONTE JR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, n. 16, p. 338-342, 2004.

MENARD, A.; MONNEZ, C.; SANTOS, P. E.; SEGONDS, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; LIPUMA, J. J; CHABANON, G.; COURNOVER, B. Selection of Nitrogen-fixing Deficient *Burkholderia vietnamensis* Strains by Cystic Fibrosis Patients: Involvement of *nif* Gene Deletions and Auxotrophic Mutations. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1176-1185, 2007.

MENDES, R. **Diversidade de Caracterização de Comunidades Microbianas Endofíticas Associadas a Cana-de-açúcar**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2008.

MERCADO-BLANCO, J.; BAKKER, P. A. H. M. Interactions Between Plants and Beneficial *Pseudomonas* sp.: Exploiting Bacterial Traits for Crop Protection. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, p. 367-389, 2007.

MEYER, S. L. F.; ROBERTS, F. P.; CARTA, L. K.; LUMSDEN, R. D.; MAO, W. Application od *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, Alone and in Combinations, Against Meloidogyne incognita on Bell Pepper. **Nematropica**, v. 31, p. 75-86, 2001.

MILLER, K. J.; WOOD, J. M. Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 50, p. 101-136, 1996.

MINAMI, S. N. **Diversidade e Controle Biológico de *Pectobacterium carotovora* em Orquídeas Utilizando Bactérias Endofíticas.** 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil, 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.

MORGAN, J. A. W.; BENDING, G. D.; WHITE, P. J. Biological Costs and Benefits to Plant-Microbe Interactions in the Rhizoshere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1729-1739, 2005.

NACAMULLI, C.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Perturbation of Maize Rrhizosphere Microflora Following Seed Bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI7. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 183-193, 1997.

NALBANTOGLU, B. Analysis of Functional Domains on Glutamate Synthase. **Turkey Journal Biology**, v. 24, p. 197-213, 2000.

NOMURA, M.; MORGAN, E. A. Genetics of Bacterial Ribosomes. **Annual Reviews in Genetic,** v. 11, p. 297-347, 1977.

OJIAMBO, P. S.; SCHERM, H. Biological and Application-Oriented Factors Influencing Plant Disease Supression by Biological Control: A Meta-Analytical Review. **Phytopathology**, v. 96, p. 1168-1174, 2006.

ORMENO-ORRILLO, E.; ROSENBLUETH, M.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Mutations in Lipopolysaccharide Biosynthetic Genes Impair Maize Rhizosphere and Root Colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1271-1284, 2008.

PAIVA, E.; LISTER, R. M.; PARK, W. D. Induction and Accumulation of Major Tuber Protein in Stems and Petioles. **Plant Physiology**, v. 71, p. 161-168, 1983.

PAJUNEN, M. I.; PULLIAINEN, A. T.; FINNE, J.; SAVILAHTI, H. Generation of Transposon Insertion Mutant Libraries for Gram-positive Bacteria by Eletroporation of Phage Mu DNA Transposition Complexes. **Microbiology**, v. 151, p. 1209-1218, 2005.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER JR., M, H. Major Facilitator Superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 1-34, 1998.

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.

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.

PEMBERTON, C.; SALMOND, G. P. C. The Nep1-like Proteins - A Growing Family of Microbial Elicitors of Plant Necrosis. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 353–359, 2004.

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.

PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the Soft Rot Erwinias. **Annual Reviews in Phytopathology**, v. 18, p. 361-387, 1980.

PÉROMBELON, M. C. M.; WOLF, J. M. V. D. **Methods for the Detection and Quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on Potatoes: a Laboratory Manual**. Scottish Crop Research Institute, v. 10, 2002.

PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.; KARLSSON, M. B.; PALVA, E. T. Identification of Pathogenicity Determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by Transposon Mutagenesis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 4, p. 276-283, 1991.

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.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1193-1201, 2005.

RANKATARI, A.; VIRTAHARJU, O.; VÄHÄMIKO, S.; TAIRA, S.; PALVA, E. T.;

SAARILAHTI, H. T.; ROMANTSCHUK, M. Type III Secretion Contributes to the Pathogenesis of the Soft-Rot *Erwinia carotovora*: Partial Characterization on the hrp Gene Cluster. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 14, p. 962-968, 2001.

REZNIKOFF, W. S. The Tn5 transposon. **Annual Review Microbiology**, v. 47, p. 945-963, 1993.

REZNIKOFF, W. S.; BHASIN, A.; DAVIES, D. R.; GORYSHIN, I. Y.; MAHNKE, L. A.; NAUMANN, T.; RAYMENT, I.; STEINIGER-WHITE, M.; TWINING, S. S. Tn5: A Molecular Window on Transposition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 266, p. 729-734, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 827-837, 2006.

ROSSETTO, P. B. **Interações entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: A Laboratory Manual. Local: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 765 p.

SANTOS, P. E.; BUSTILLOS, R.; CABALLERO-MELLADO, J. (2001) *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated with Wide Environmental and Geographic. **Applied and Environmental Micriobiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

SANTOS, V. C. P. **Atividade antibacteriana de *Burholderia* sp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar**. 2010. 94 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*-enconded Type III cytotoxin, ExoU. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 12, p. 2959-2969, 2003.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. Jardim de Oportunidades. **Revista Sebrae: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**, v. 1, out. 2005.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Effect of Inactivation of Poly (hydroxyalkanoates) Depolymerase Gene on the Properties of Poly (hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas resinovorans*. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 62, p. 536-543, 2003.

SCHULTZ, D. J.; SUH, M. C.; OHLROGGE, J. B. Stearoyl-Acyl Carrier Protein and Unusual Acyl-Acyl Carrier Protein Desaturase Activities are Differentially Influenced by Ferredoxin. **Plant Physiology**, v. 124, p. 681-692, 2000.

SCHWEIZER, H. P. Efflux as a Mechanism of Resistance to Antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Bacteria: Unanswered Questions. **Genetic Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 48-62, 2003.

SHARYPOVA, L. A.; NIEHAUS, K.; SHEIDLE, H.; HOLST, O.; BECHER, A. Sinorhizobium melioti *acpXL* Mutant Lacks the C28 Hydroxylated Fatty Acid Moiety of Lipid A and Does Not Express a Slow Migrating Form of Lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Biochemistry**, v. 278, n. 15, p. 12946-12954, 2003.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistence. **Plant Physiology**, v. 125, p. 73-76, 2001.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial Microbial Allelopaties in the Root Zone: The Management of Soil Quality and Plant Disease with Rhizobacteria. **Soil; Tillage Research**, v. 72, p. 107-123, 2003.

SUZUKI, N.; OKAI, N.; NONAKA, H.; TSUGE, Y.; INUI, M.; YUKAWA, H. High-Throughput Transposon Mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum* and Construction of a Single-Gene Disruptant Mutant Library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3750-3755, 2006.

THALER, J. S.; OWEN, B.; HIGGINS, V. J. The Role of the Jasmonate Response in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Lifestyles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 530-538, 2004.

TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft-rot Erwinae: from Genes to Genomes. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 17-30, 2003.

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.

UNLIGIL, U. M.; RINI, J. M. Glycosyltransferase Structure and Mechanism. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, p. 510-517, 2000.

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, v. 36, p. 1-25, 2006.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALIGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a Complex Within the *Burkholderia cepacia* Complex, Comprises at Least Two Novel Species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 102-111, 2009.

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.

VELUSAMY, P.; IMMANUEAL, J. E.; GNANAMANICKAM, S.S.; THOMASHOW, L. . Biological Controlo f Rice Bacterial Blight by Plant-associated Bactéria Producing 2,4-diacetylphloroglucinol. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 56-65, 2006.

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 Characterisation Within the *Burkholderia cepacia* Complex. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 1-5, 2002.

WALSH, C.; MEYERS, C. L. F.; LOSEY, H. C. Antibiotic Glycosyltransferases: Antibiotic Maturation and Prospects for Reprogramming. **Medical Chemistry**, v. 46, n. 16, p. 3425-3436, 2003.

WANG, C.; XU, A.; GAO, Y.; FAN, Y.; LIANG, Y.; ZHENG, C.; SUN, L.; WANG, W.; ZHAO, K. Generation and Characterisation of Tn5-tagged *Xanthomonas oryzae* p. *oryzae* mutants that overcome *xa23*-mediated resistance to bacterial blight of rice. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, n. 3, p. 343-351, 2008.

WARREN, A. S.; ARCHULETA, J.; FENG, W.; SETUBAL, J.C. Missing Genes in Annotation of Prokaryotic Genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 2-12, 2010.

WATANABE, K.; PRASEUTH, A. P.; WANG, C. C. C. A Comprehensive and Engaging Overview of the Type III Family of Polyketide Synthases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 279-286, 2007.

WEBER, M. H. W.; KLEIN, W.; MULLER, L.; NIESS, U. M.; MARAHIEAL, M.A. Role of the *Bacillus subtilis* Fatty Acid Desaturase in Membrane Adaptation During Cold Shock. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1321-1329, 2001.

WINKELMANN, G. **Microbial Siderophore-Mediated Transport**. Biometals 2002: Third International Biometals Symposium, 2002.

WOZNIAK, C. A. **Regulatory Review of *Burkholderia cepacia* under FIFRA**. USDA, Cooperative States Research, Education and Extension Service, 2006.

XIONG, L.; KLOSS, P.; DOUTHWAITE, S.; ANDERSEN, N. M.; SWANEY, S.; SHINABARGER, D. L.; MANKIN, A. S. Oxazolidinone Resistance Mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* Reveal the Central Region of Domain as the Primary Site of Drug Action. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5325-5331, 2000.

ZAKI, K.; MISAGHI, I. J.; HEYDARI, A. Control of Cotton Seedling Damping-off in the Field by *Burkholderia* (Pseudomonas) *cepacia*. **Plant Disease**, v. 82, p. 291-293, 1998.

ZELLER, W. Status on Induced Resistence Against Plant Bacterial Diseases. **Fitossanidad**,

v. 10, p. 99-103, 2006.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. The Gene for Albicidin Detoxification from *Pantoea dispersa* Encodes an Esterase and Attenuates Pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to Sugarcane. **Procedings National Academics Science USA,** v. 94, p. 9984-9989, 1997.