

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**UTILIZAÇÃO DE *Burkholderia sp.* 89 PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E
IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SEU METABOLISMO
SECUNDÁRIO ENVOLVIDAS NESSE PROCESSO**

EVELISE BACH

Orientadora: Prof. Dra. Luciane M. P. Passaglia

Porto Alegre

Novembro de 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**UTILIZAÇÃO DE *Burkholderia sp.* 89 PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E
IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SEU METABOLISMO
SECUNDÁRIO ENVOLVIDAS NESSE PROCESSO**

EVELISE BACH

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Prof. Dra. Luciane M. P. Passaglia

Porto Alegre
Novembro de 2016

Instituições Envolvidas/ Locais de Execução

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Biociências, Departamento de Genética – Porto Alegre/RS;
- Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Curitiba/PR;
- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Laboratório de Fitopatologia – Porto Alegre/RS;
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) – Porto Alegre/RS;
- Eberhard Karls Universität Tübingen, Pharmaceutical Institute, Department of Pharmaceutical Biology - Tübingen, Alemanha.

Fontes financiadoras

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil);
- Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD, Alemanha).
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica do Nitrogênio- CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi feito por muitas mãos, cérebros e corações e, por isso, faço os seguinte agradecimentos:

Às várias mãos que fizeram parte do capítulo 1, que ajudaram a construí-lo, a fazê-lo possível e a torná-lo menos cansativo: Fernanda Moreira, Pedro Beschoren da Costa, Andress Pontes, Laura Trarbach, Laura Cappelatti, Letícia Gal, Magali Stival, João Frederico Mangrich dos Passos, Camille Granada, Aline Johnson, Adriana Ambrosini, Rocheli Manfroi, Milena Zambiasi, Douglas Jardim Messeder, Fernanda Lazzarotto, Ana Folmer, Flávio Veras e principalmente meus co-autores Guilherme Seger e Gabriela Fernandes. Agradeço também o suporte, sugestões e discussões do Dr. Bruno Brito Lisboa, Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira e Dr. Luciano Kayser Vargas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO); a Prof. Dra. Sueli van der Sand (ICBS-UFRGS) pelas sugestões e fornecimento dos fungos fitopatogênicos; ao Prof. Dr. Valmir Duarte (Fitopatologia- UFRGS) pelas bactérias fitopatogênicas; e ao Prof. Dr. Adriano Brandelli pelas sugestões, pelo uso de seu laboratório e pelo fornecimento dos fungos filamentosos.

Aos colegas que foram muito importantes nas discussões de outras etapas deste trabalho como Fernando Sant'Anna, Renan Zanini Porto, Luiz Gustavo Borges, Belize Leite, Márcia Goetze, Lauro Bücken Neto e Ronei Machado; e a todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da UFRGS pelo coleguismo, pelas discussões científicas e por fazer nosso dia-a-dia muito mais agradável.

À grande companheira deste doutorado, Gabriela Fernandes, pela parceria nas longas jornadas de trabalho, por acreditar, pelas proveitosas longas discussões científicas e não científicas, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório.

Aos colegas da Alemanha, pelos diversos ensinamentos e muita paciência: Henrique Miess, Ghazaleh Jahanshah, Anina Buchmann, Norbert Kirchner, Judith Bauer, Lina Assad e, especialmente, Julia Paterson que tornou as horas de HPLC muito mais divertidas.

Ao CNPq e ao DAAD pela bolsa e auxílios concedidos; ao INCT da Fixação Biológica do Nitrogênio (CNPq) pela possibilidade de discutir nosso trabalho com especialistas da área com contribuições muito relevantes dos Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (UFPR), Prof. Gary Stacey (University of Missouri, USA) e Dr. Euan Kevin James (James Hutton Institute, Escócia); ao Centro Brasileiro- Argentino de Biotecnologia (CBAB) que me proporcionou grande aprendizado e a oportunidade de discutir este trabalho

no laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas (Unicamp) e no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), com especial agradecimento às contribuições de Bárbara Cibelle Soares Farias, Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini, Prof. Dr. Davila Zampieri e Prof. Dr. Denise Cavalcante Hissa.

À UFRGS e seus funcionários pela estrutura para o desenvolvimento de pesquisa de qualidade internacional e pelo Restaurante Universitário (RU) que fornece suporte às longas jornadas de estudo e de trabalho. Ao PPGBM por proporcionar a divulgação deste trabalho em congresso nacional e internacional, e, em especial, ao funcionário Elmo Cardoso, que torna as burocracias muito menos complicadas.

À Prof. Dra. Luciane Passaglia pela orientação e discussões, por viabilizar todo meu trabalho e formação e, principalmente, por acreditar na nossa capacidade e dar flexibilidade para seguirmos nossa intuição dentro da pesquisa. Ao Prof. Dr. Harald Gross pelos ensinamentos, orientação, paciência e por viabilizar meu trabalho no período da Alemanha.

Àquelas pessoas que contribuíram para manter minha mente sadia ao longo da caminhada e que, muitas vezes, respeitaram minhas ausências: Gabriela Fernandes, Fernanda Moreira, Nicole Veto, Fernanda Lopes, Jamile Queiroz, Juliana Simionovski, Milena Rosenfield, Andréia Thomaz, Carolina Gualdi, Larissa Smaniotto, Isabel Giehl, Juliana Shirazawa, Hellen Tarasconi, Giovanni Neves e todos os integrantes e agregados do grupo Maracatu Truvão.

À minha família por sempre acreditar, confiar e apoiar minhas escolhas, seu suporte e torcida sempre foi muito importante! Ao meu irmão Léo pelas profissionais assessorias com as imagens. À família do Gui pelo apoio e incentivo.

Ao meu companheiro, Guilherme Seger, pelo incentivo, apoio, conversas, conselhos, alegrias, amor, pela parceria no trabalho e na vida.

Sem vocês, muito disso não seria possível! Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC- 1-aminociclopropano-1-carboxilato

AIA- ácido indol acético

ANI- Identidade média de nucleotídeos

BCC- complexo *Burkholderia cepacia*

DDH- hibridização DNA:DNA

FBN- Fixação Biológica do Nitrogênio

GA- giberelinas

HSL- homoserino lactonas

MLSA- análise multi locus

NRPS- peptídio sintetase não ribossomal

PGP- promoção ou promotor de crescimento vegetal

PGPR- rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

PKS- sintetases de policetídeos

UFC- unidades formadoras de colônia

RESUMO

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal ou agentes de biocontrole como inoculantes agrícolas é uma alternativa importante e ecologicamente correta, com grandes benefícios na agricultura para substituir, ou ao menos suplementar, a excessiva utilização de fertilizantes e pesticidas. Neste trabalho avaliamos a capacidade de biocontrole e de competência rizosférica de três bactérias com características de promoção de crescimento vegetal (*Plant growth promoting* - PGP): *Bacillus mycoides* B38V, *Paenibacillus riograndensis* SBR5 e *Burkholderia* sp. 89. As três bactérias avaliadas apresentaram grande versatilidade na utilização de substratos, o que poderia lhes garantir uma vantagem competitiva no ambiente rizosférico. Porém, inconsistências foram observadas nos ensaios em câmara de crescimento, ou seja, as características de PGP e de biocontrole observadas *in vitro* não se refletiram em benefícios para a planta. A linhagem 89 destacou-se pela produção de um metabólito estável com ampla atividade contra fungos fitopatogênicos. Através de abordagens genômicas e de análises multilocus, descrevemos *Burkholderia* sp. 89 como uma nova espécie membro do complexo *Burkholderia cepacia*, denominada de *B. catarinensis* 89^T. O sequenciamento de seu genoma, seguido de uma análise pela ferramenta AntiSMASH, revelou a presença de um agrupamento gênico de peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS) relacionadas com a biossíntese do sideróforo ornibactina e um agrupamento híbrido NRPS-poliketídico sintetase responsável pela biossíntese do glicolipeptídeo cíclico com atividade antifúngica burkholdina. Como estratégia de purificação de metabólitos secundários foi utilizada a metodologia da mineração de genoma combinada com fracionamento guiado por bioensaios seguida de análises em espectrômetro de massas. Desta forma, purificamos com sucesso duas variantes de ornibactina, D e F (761 e 789 Da, respectivamente), e detectamos a variante ornibactina B ($m/z=733$) e as moléculas sinalizadoras homoserina lactonas C6-HSL, 3OH-C8-HSL e C8-HSL. Análises de espectrometria de massas demonstraram a presença de um grupo de metabólitos com massas de 1240, 1254, 1268, 1216, 1244 e 1272 Da, que, provavelmente, são novas variantes do antifúngico burkoldina. Sendo assim, *B. catarinensis* 89^T possui potencial biotecnológico com possíveis aplicações farmacêuticas e agrônomicas para o biocontrole de fungos fitopatogênicos.

Palavras chave: biocontrole, competência rizosférica, identificação de *Burkholderia*, genoma bacteriano, metabólito antifúngico.

ABSTRACT

The use of plant growth promotion bacteria or biocontrol agents as agricultural inoculants is an important eco-friendly alternative to substitute, or at least supplement, the excessive use of fertilizers and pesticides. In this work, we evaluated the biocontrol potential and rhizosphere competence of three bacteria that had shown plant growth promotion (PGP) abilities: *Bacillus mycoides* B38V, *Paenibacillus riograndensis* SBR5 and *Burkholderia* sp. 89. All three bacteria presented great versatility in their substrate utilization, which could enable them to survive in a competitive rhizosphere environment. However, inconsistencies were observed in the greenhouse experiments, whereas their interesting abilities observed *in vitro* did not result in benefits to the plants. Strain 89 produces a stable metabolite with a wide range of antifungal activity. Genomic comparisons and multilocus sequence analysis revealed *Burkholderia* sp. 89 as a new species of the *Burkholderia cepacia* complex and we described it as *B. catarinensis* 89^T. We sequenced its genome and analyzed it with the AntiSMASH tool. This *in silico* prediction revealed the presence of a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) cluster, which is related to the production of the siderophore ornibactin. Moreover, a hybrid NRPS- polyketide synthetase cluster for the production of the antifungal cyclic glycolipopeptide burkholdin was also found. A genome mining combined with a bioassay-guided fractionation with further mass spectrometry analysis was applied for the purification of these compounds. This approach enabled us to purify and characterize two variants of the siderophore ornibactin, D and F (761 and 789 Da, respectively). Also, we could detect the variant ornibactin B ($m/z= 733$) and the quorum sensing molecules homoserine lactones C6-HSL, 3OH-C8-HSL and C8-HSL in the supernatant of *B. catarinensis* 89^T. Mass spectrometry analysis showed the presence of a group of metabolites with the masses 1240, 1254, 1268, 1216, 1244 and 1272 Da, which are probably new variants of the antifungal metabolite burkoldin. Therefore, *B. catarinensis* 89^T has a great biotechnological potential for the production of metabolites with pharmaceutical and agricultural applications for the biocontrol of phytopathogenic fungi.

Keywords: biocontrol, rhizosphere competence, *Burkholderia* identification, bacterial genome, antifungal metabolite.

| SUMÁRIO | Página |
|--|------------|
| INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS..... | iii |
| AGRADECIMENTOS..... | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vi |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| SUMÁRIO | ix |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. Rizosfera e rizobactérias promotoras de crescimento vegetal..... | 10 |
| 1.1.1. Produção de fitormônios..... | 10 |
| 1.1.2. Captação e disponibilização de nutrientes..... | 12 |
| 1.1.3. Biocontrole | 13 |
| 1.1.4. Indução de mecanismos de defesa vegetal | 14 |
| 1.1.5. Competência rizosférica | 14 |
| 1.2. Potencial uso de PGPR para o biocontrole de doenças fúngicas de trigo | 15 |
| 1.3. As PGPR deste estudo | 16 |
| 1.3.1. A PGPR <i>Bacillus mycoides</i> B38V | 17 |
| 1.3.2. A PGPR <i>Paenibacillus riograndensis</i> SBR5 ^T | 18 |
| 1.3.3. A PGPR <i>Burkholderia</i> sp. 89 | 19 |
| 1.3.3.1. Identificação de bactérias e da <i>Burkholderia</i> sp. 89..... | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 3. CAPÍTULOS..... | 24 |
| 3.1. CAPÍTULO 1 | 24 |
| 3.2. CAPÍTULO 2 | 38 |
| 3.3. CAPÍTULO 3 | 57 |
| 3.4. CAPÍTULO 4 | 73 |
| 3.4. CAPÍTULO 5 | 102 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 125 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 130 |
| ANEXO I..... | 140 |
| Outros trabalhos desenvolvidos durante o doutorado..... | 140 |
| Seleção para curso e auxílios recebidos | 141 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Rizosfera e rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

A rizosfera compreende a região de solo imediatamente próxima às raízes e fortemente afetada pelos exsudatos da planta. Tais compostos permitem, na rizosfera, o desenvolvimento de grande riqueza e densidade de micro-organismos, quando comparados com solo não rizosférico (Alami et al. 2000; Moreira 2006; Govindasamy et al. 2011). As bactérias que habitam a rizosfera, ou rizobactérias, podem estabelecer tanto relações positivas, neutras ou negativas com as plantas (Francis et al. 2010). As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (ou PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) constituem um grupo benéfico de micro-organismos encontrado na rizosfera, na superfície das raízes (rizoplano) ou em associação com as mesmas. As PGPR tem efeito no crescimento e na saúde da planta, produzindo e modulando a produção de fitormônios, acelerando a disponibilidade e assimilação de nutrientes, suprimindo patógenos e diminuindo toxicidade do solo (Francis et al. 2010; Govindasamy et al. 2011). Além destas importantes aplicações agronômicas, o estudo destes micro-organismos vem crescendo pelo seu potencial como auxiliares das plantas na revegetação e reflorestamento de áreas inférteis ou de solos contaminados com material abiótico (Bashan and Holguin 2002).

1.1.1. Produção de fitormônios

Muitas PGPR produzem fitormônios ou compostos similares que modulam diretamente o crescimento vegetal. Existem cinco classes de fitormônios bem descritas: giberelinas, ácido abscísico, citocininas, auxinas e etileno (Taiz et al. 2015), sendo os micro-organismos rizosféricos uma potencial fonte destas moléculas.

Giberelinas (GA do inglês *gibberellic acid*) influenciam a germinação de sementes, alongamento do caule, floração e frutificação. A capacidade de produção de quatro tipos de giberelinas (GA1, GA3, GA4 e GA20) foi descrita para bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas*, entre outros (MacMillan 2001; Tsavkelova et al. 2006).

Ácido abscísico e ácido jasmônico produzidos por linhagens de *Bacillus pumilis* endofíticos de girassol induzem o crescimento vegetal (Forchetti et al. 2007). De forma similar, *Bacillus subtilis* produtores de citocininas inoculados em alface cultivada sob estresse hídrico foram benéficos para o crescimento e aumento da biomassa da planta

(Arkhipova et al. 2007). Já o grande impacto de *Paenibacillus polymyxa* no crescimento vegetal ocorre pela combinação da produção de citocininas e de auxinas (Lal and Tabacchioni 2009).

Além das plantas, diversas bactérias e fungos possuem a capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) com implicações variadas na interação micro-organismo- planta, podendo variar de patogênese à fitoestimulação. Ao menos seis diferentes rotas de biossíntese já foram descritas e a redundância na biossíntese de AIA é comumente encontrada em bactérias com associação com plantas (Spaepen et al. 2007). AIA é a principal auxina em plantas, sendo responsável pelo controle de muitos processos fisiológicos importantes, como o alongamento de células e divisão celular, diferenciação de tecidos, crescimento radicular, crescimento de frutos, controle da abscisão foliar, estímulo da captação de nutrientes e resposta à luz e gravidade (Teale et al. 2006; Taiz et al. 2015). Rizóbios e outras bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Azospirillum*, *Ralstonia*, *Pantoea*, além das Gram-positivas, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Streptomyces* e *Corynebacterium* são capazes de produzir AIA (Spaepen et al. 2007).

Espécies de *Rhodococcus* e *Bacillus* frequentemente apresentam, também, a atividade enzimática de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) deaminase, utilizando o ACC como fonte de nitrogênio (N), através de sua hidrólise à amônia e α -cetobutirato. A concentração de ACC (precursor imediato da síntese de etileno em plantas superiores) nas plantas associadas com estas bactérias é diminuída e, conseqüentemente, o acúmulo de etileno, que induz estresse, também diminui (Francis et al. 2010). Condições de estresse geradas por salinidade, seca, metais pesados e patogenicidade, por exemplo, elevam a produção endógena de etileno pelas plantas, afetando de forma negativa o crescimento das raízes e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal como um todo (Saleem et al. 2007). Plantas tratadas com bactérias produtoras de ACC-deaminase apresentam crescimento radicular aumentado devido à diminuição de etileno (Burd et al. 2000), assim como melhores respostas a diversos tipos de estresses (Safronova et al. 2006).

1.1.2. Captação e disponibilização de nutrientes

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é a característica das PGPR melhor caracterizada devido a sua importância na agricultura, visto que este o N é um fator limitante para o desenvolvimento vegetal. Do N presente na ecosfera, apenas 0,04% está nos sistemas aquáticos e terrestres. O grande reservatório de N, que compõe cerca de 78% da atmosfera, não é acessível nutricionalmente aos eucariotos e à maioria dos procariotos (Moreira 2006). Os micro-organismos fixadores de N atmosférico (diazotróficos) são capazes de reduzir sua forma molecular N_2 à amônia, através do complexo enzimático da nitrogenase, tornando-o disponível para outros seres vivos. Devido à eficiência da FBN obtida pela interação rizóbio-leguminosa, estes micro-organismos são largamente estudados e utilizados comercialmente como inoculantes agrícolas (Parnell et al. 2016). Porém, outros gêneros de bactérias, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas, também apresentam tal característica e vêm apresentando potencial para aplicação agrônômica (Steenhoudt and Vanderleyden 2000; Coenye and Vandamme 2003; Pérez-García et al. 2011; Kumar et al. 2012; Kazi et al. 2016).

Outro micronutriente limitante no solo, porém sem reservatório atmosférico, é o fósforo (P). No solo, o fósforo orgânico é encontrado, principalmente, como formas insolúveis de mio-inositol hexafosfato ou fitato (Pérez-García et al. 2011). As PGPR aumentam a disponibilidade do P para as plantas através da mineralização de fosfatos orgânicos ou pela solubilização de fosfatos precipitados. Formas inorgânicas de P são solubilizadas pela produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como ácido glucônico e ácido ceto glucônico, que dissolvem fosfato mineral ou quelam íons de P, como o PO_4^{3-} . Linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* são descritas como produtoras de ácidos orgânicos que liberam fósforo de sedimentos de rochas (Francis et al. 2010). Outro mecanismo associado à disponibilização de P é a extrusão de prótons para a diminuição do pH do solo, que facilita sua solubilização (Chen et al. 2006; Govindasamy et al. 2011). Já a mineralização de fosfatos orgânicos ocorre pela produção de fosfatases, como as fitases. Bactérias Gram-positivas, como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*, são as mais efetivas PGPR na produção de fitases (Francis et al. 2010). A biomassa microbiana funciona como um reservatório de fosfato evitando que ele seja adsorvido ou fixado e que permaneça disponível no solo.

A forma mais comum do Fe no solo é o íon férrico Fe^{3+} , também relativamente insolúvel se comparado com o íon ferroso Fe^{2+} . A importância do ferro está na sua alta

capacidade de receber e doar elétrons prontamente, interconvertendo-se entre a forma férrica e ferrosa, que o torna um componente prostético extremamente versátil para incorporação em metaloproteínas atuando como centro catalítico ou carreador de elétrons (Krewulak and Vogel 2008). Processos celulares, como o transporte de elétrons, a redução de oxigênio associada a síntese de ATP, a fotossíntese e a síntese de aminoácidos, nucleosídeos e DNA, a fixação de N₂, produção de H₂ e a metanogênese, são dependentes de ferro (Andrews et al. 2003).

A baixa disponibilidade de Fe no ambiente induz a produção de sideróforos (Wandersman and Delepelaire 2004), metabólitos secundários microbianos de baixo peso molecular altamente eletronegativos com grande afinidade para a complexação de Fe²⁺, aumentando sua mobilidade e disponibilidade no solo. Mais de 500 diferentes tipos de sideróforos já foram descritos, principalmente de origem bacteriana, e, apesar de sua grande variedade, a maioria apresenta uma estrutura peptídica de análogos de aminoácidos não proteicos. Podem ser classificados em três tipos químicos principais, de acordo com o grupo funcional utilizado como ferro-ligante: hidroxamato (aerobactina e ferricromo); catecolatos (enterobactina); e hidroxicarboxilatos (fioquelina). Alguns sideróforos podem conter mais de um destes três grupos (Wandersman and Delepelaire 2004; Miethke and Marahiel 2007).

Após quelar o ferro no ambiente externo o sideróforo é transportado de volta à célula microbiana para finalmente disponibilizar o metal à bactéria (Dobbelaere et al. 2003). Apesar das plantas também secretarem sideróforos ou quelantes para facilitar a captação de Fe, algumas plantas reconhecem e utilizam sideróforos bacterianos. Alguns microorganismos também são capazes de captar sideróforos exógenos e possuem proteínas de membrana específicas para sua utilização (Khan et al. 2006). Além disso, a captação de Fe também pode representar um mecanismo de competição entre comunidades bacterianas, de atividade antifúngica (Tortora et al. 2011) e de indução à resposta de defesa vegetal (Francis et al. 2010).

1.1.3. Biocontrole

O controle biológico, ou biocontrole, consiste no combate a pestes ou na supressão de fitopatógenos por organismos residentes ou introduzidos, ou parte deles (Pal and Gardener 2006; Pérez-García et al. 2011). A interferência direta acontece pela produção de compostos antimicrobianos (bacteriocinas, lipopeptídeos), inseticidas (proteína Cry) ou

nematicidas; produção de enzimas hidrolíticas (celulases, proteases, quitinases); competição por micronutrientes como Fe pela produção de sideróforos; competição por espaço; inativação de fatores de germinação do patógeno; degradação de fatores patogênicos ou parasitismo do patógeno (Govindasamy et al. 2010). Lal e Tabacchioni (2009), por exemplo, descreveram a produção de um peptídeo antibiótico pelo endofítico *Paenibacillus* sp. HKA-15 que protegeu a soja do fungo da doença da podridão preta, *Rhizoctonia bataticola*. Algumas espécies de *Bacillus*, como *B. thuringiensis*, são capazes de degradar moléculas sinalizadoras pela produção de acil homoserina lactona (AHL) lactonases, silenciando a virulência de bactérias (Pérez-García et al. 2011). Da mesma forma, vários trabalhos descrevem o uso de PGPR para o biocontrole de fitopatogenias por mecanismos diversos (Parke and Gurian-Sherman 2001; Compant et al. 2005; Haas and Defago 2005; Beneduzi et al. 2012). Uma forma indireta de biocontrole ocorre pela indução de mecanismos de defesa da planta.

1.1.4. Indução de mecanismos de defesa vegetal

Além do aumento da resistência a condições adversas, as PGPR também são descritas como indutoras da resistência sistêmica induzida (ISR) e da resistência sistêmica adquirida (SAR). ISR é induzida pela colonização da rizobactéria, enquanto SAR é a proteção de longa duração contra amplo espectro de micro-organismos induzida pela prévia infecção por patógenos. A presença de lipopolissacarídeos e de flagelos na membrana externa de bactérias, sideróforos e ácido salicílico (Ramamoorthy et al. 2001; Van Loon 2007), bem como de lipopeptídeos cíclicos, do fator antifúngico Phl, da molécula sinalizadora (AHL), compostos voláteis produzidos por *B. subtilis* GB03, de acetoína e 2,3-butanodiol tem sido descritos como indutores de mecanismos de defesa vegetal (Kloepper et al. 2004; Yang et al. 2009).

1.1.5. Competência rizosférica

Para serem efetivos, PGPR ou agentes de biocontrole devem ter a capacidade de colonizar as raízes da planta e sobreviver na rizosfera ao menos pelo período em que eles devem exercer o efeito benéfico à planta. Desta forma, os inoculantes devem expressar características que lhes permitam competir espacialmente e nutricionalmente com os micro-

organismos nativos. Ao conjunto destas características se dá o nome de competência rizosférica (Bevivino et al. 1998; Raaijmakers et al. 2009).

Os fatores que contribuem para uma melhor competitividade na rizosfera incluem a produção de antimicrobianos, capacidade de utilização de sideróforos e habilidade de utilizar os exsudatos das plantas (Parke and Gurian-Sherman 2001). Somando-se a isso, também é interessante que o micro-organismo consiga utilizar outros substratos presentes no solo, através da produção de enzimas hidrolíticas (Weller 1988), que seja capaz de produzir surfactantes que aumentem sua mobilidade no solo (Dutta and Podile 2010) e que produza biofilmes, que o protejam de estresses bióticos e abióticos (Raaijmakers and Mazzola 2012; Mavrodi et al. 2013).

1.2. Potencial uso de PGPR para o biocontrole de doenças fúngicas de trigo

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2013), o trigo (*Triticum aestivum L.*) é a terceira cultura mais plantada no mundo, superado apenas pelo milho e arroz. No Brasil, o trigo está na quarta posição da produção total de grãos (3,31%). Sendo uma cultura de inverno, os estados do sul do Brasil são os maiores produtores desta gramínea (CONAB 2016). Doenças fúngicas são uma importante fonte de estresse para o trigo e são responsáveis por perdas elevadas no rendimento e na qualidade dos grãos. O volume de perdas é variável de ano para ano, dependendo das condições climáticas. Períodos com temperaturas altas e precipitações pluviais frequentes favorecem o desenvolvimento de inúmeras doenças, principalmente aquelas causadas por fungos (Fernandes 1999).

A giberela é causada por *Gibberella zeae*, anamorfa *Fusarium graminearum*, e é uma doença de infecção floral e de controle difícil, altamente influenciada pelo ambiente. As espiguetas atacadas apresentam-se descoloridas, com aspecto esbranquiçado, o que acarreta em reduções da produtividade e da qualidade dos grãos que podem acumular micotoxinas. Alguns fungicidas inibidores da biosíntese de ergosterol (IBE) apresentam controle de até 75% de *G. zeae* em trigo (Fernandes 1999).

As manchas foliares são causadas pelos fungos *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera* spp., *Stagonospora nodorum* e *Septoria tritici*. A mancha marrom (*B. sorokiniana*) pode ocorrer em qualquer parte ou estágio de desenvolvimento da planta, podendo também atacar as raízes (podridão comum das raízes) e os grãos (ponta preta). Esses micro-organismos

possuem em comum alta habilidade saprofítica e a formação de lesões necróticas com halo clorótico, além de apresentarem a capacidade de sobreviver na semente e nos restos culturais do solo. Portanto, o aumento da intensidade desses fungos na lavoura está diretamente condicionado a três fatores: ao uso de sementes infectadas, à monocultura e ao plantio direto (Fernandes 1999). As primeiras medidas para controle dessas manchas são a produção de sementes indenadas, seu tratamento com fungicidas e a rotação de culturas. Os fungicidas com fungitoxicidade maior para *B. sorokiniana* e *Drechslera* spp., em ordem decrescente, são triadimenol, difenoconazol, carboxina + tiram e flutriafol (Cunha, Gilberto Rocca; Caierão 2014). Contudo, o controle é muito difícil, pois não existem cultivares resistentes e os fungicidas atualmente recomendados não erradicam o patógeno quando o nível de infecção é elevado (IAPAR 2013).

O manejo mais comumente utilizado para o controle de doenças fúngicas envolve o uso de pesticidas e a adoção de práticas agrícolas, como rotação de culturas, revolvimento do solo, adubação orgânica, solarização e cruzamento de cultivares para gerar plantas resistentes (Raaijmakers et al. 2009). Além da baixa eficiência destas abordagens, existe um aumento na preocupação com a saúde pública e ambiental com os resíduos de fungicidas, bem como o desenvolvimento de patógenos resistentes a algumas cultivares, o que aumenta a necessidade da busca por alternativas mais confiáveis e que não agridam o meio ambiente (Lorentz et al. 2006). O uso de inoculantes que atuam como PGPR e/ou como controle biológico tem surgido como uma potencial alternativa ao crescente uso de fertilizantes e fungicidas.

1.3. As PGPR deste estudo

Nosso grupo de trabalho possui grande experiência no isolamento e seleção de PGPR de diversas culturas agrônômicas, bem como na realização de ensaios em casa de vegetação e a campo para investigar o potencial destas bactérias como inoculantes agrícolas (Beneduzi et al. 2008a; Beneduzi et al. 2008b; Ambrosini et al. 2012; de Souza et al. 2013; Granada et al. 2013; dos Passos et al. 2014; Moreira et al. 2016). Desta forma, possuíamos um amplo banco de PGPR com algumas bactérias sendo estudadas como candidatas para utilização como inoculantes. Destas, destacam-se as bactérias a seguir:

1.3.1. A PGPR *Bacillus mycoides* B38V

O gênero *Bacillus* pertence ao filo Firmicutes, família Bacillaceae que se caracteriza por bastonetes Gram-positivos aeróbios e esporulantes de grande versatilidade e interesse clínico e biotecnológico. Este gênero pode ser encontrado no solo, em associação com plantas, rios, e estuários, produzindo vários metabólitos de interesse industrial, como enzimas (Schallmey et al. 2004; Bach et al. 2011) e biosurfactantes (Kumar et al. 2007; Velho et al. 2011; Huang et al. 2012). Algumas espécies podem ser patogênicas de mamíferos (*B. anthracis*) e insetos (*B. sphaericus* e *B. thuringiensis*) (Govindasamy et al. 2011). *B. cereus* e *B. thuringiensis* já foram relacionados com casos de gastroenterite (Drobniewski 1993; Jackson et al. 1995) mas, ao mesmo tempo, *B. thuringiensis* pode ser considerado um dos maiores exemplos de sucesso no uso de micro-organismos para o biocontrole de insetos e proteção de culturas agrícolas. A alta especificidade e segurança ambiental faz com que espécies como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis* sejam comercialmente utilizadas como agentes de biocontrole (Pérez-García et al. 2011).

Este gênero é um dos mais prevalentes na rizosfera, apresentando contagens de 10^3 a 10^6 UFC/g solo (Seldin et al. 1998). Muitos *Bacillus* possuem a capacidade de solubilização de fosfatos, produção de AIA e sideróforos e fixação biológica de nitrogênio, promovendo, assim, o crescimento de feijão (Kumar et al. 2012), canola (Ghosh et al. 2003), videira (Karagöz et al. 2012), arroz (Beneduzi et al. 2008b) e girassol (Ambrosini et al. 2015). Além disso, muitos *Bacillus* produzem compostos antimicrobianos, como iturina, surfactina, subtilosina, fengicina e bacilomicina (Pérez et al. 2007; Govindasamy et al. 2011; Velho et al. 2011), que lhe conferem a capacidade de proteger plantas de fungos fitopatogênicos (Kumar et al. 2012; Chen et al. 2013; Chowdhury et al. 2013).

Além de apresentar características de PGP, é desejável que o inoculante tenha estabilidade populacional durante a formulação, estocagem e aplicação do produto. Neste contexto, características de crescimento de bactérias esporulantes são muito vantajosas (Govindasamy et al. 2011). Formulações contendo esporos combinados com carreadores inertes aumentam o tempo de prateleira e podem ser transportadas e estocadas de forma segura, bem como facilmente aplicadas pela ressuspensão em líquidos (Fravel 2005). Desta forma, bactérias esporulantes, como *Bacillus* e *Paenibacillus*, possuem uma vantagem para sua aplicação como inoculantes.

O gênero *Bacillus* pode ser dividido em dois grupos de bactérias proximamente relacionadas, o grupo do *B. subtilis* e o do *B. cereus*. *B. mycooides* B38V pertence ao grupo do *B. cereus*, que também inclui as espécies *B. thuringiensis* e *B. pseudomycooides* (Govindasamy et al. 2011). A linhagem B38V foi isolada da rizosfera de girassol cultivado no Rio Grande do Sul e promoveu seu crescimento, contribuindo com o aumento do conteúdo de nitrogênio, fósforo e potássio (Ambrosini et al. 2016). B38V apresentou atividade antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Ambrosini et al. 2016), um fungo causador de podridão mole ou mofo branco de diversas culturas, inclusive do girassol (Kamal et al. 2016).

1.3.2. A PGPR *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T

O gênero *Paenibacillus* foi criado por (1994) para acomodar o anterior “grupo 3” do gênero *Bacillus*. O gênero compreende mais de 180 espécies de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas, formadoras de endósporos, neutrofilicas, periflageladas, heterotróficas de baixo G+C % (de acordo com o banco de dados do LPSN, *List of Prokaryotic Names*, <http://www.bacterio.net/index.html>). *Paenibacillus* são comumente isolados da rizosfera de plantas (Seldin et al. 1983; Berge et al. 2002), como trigo (von der Weid et al. 2005; Beneduzi et al. 2008a), cevada (Ryu et al. 2006; Choi et al. 2009) e soja (Senthilkumar et al. 2007).

Espécies deste gênero possuem a capacidade de fixar nitrogênio, produzir fitormônios, sideróforos e metabólitos antifúngicos, como fusaricidina (Li and Jensen 2008), pelgipeptina (Qian et al. 2012) e polimixina (Choi et al. 2009) e, assim, há relatos de *Paenibacillus* com potencial para PGP (Lal and Tabacchioni 2009; Grady et al. 2016) e, principalmente, para biocontrole (von der Weid et al. 2005; Lorentz et al. 2006; Senthilkumar et al. 2007; Haggag and Timmusk 2008).

Paenibacillus riograndensis SBR5^T foi isolada da rizosfera de trigo cultivado no município de São Borja, Rio Grande do Sul (Beneduzi et al. 2008a), e proposta como espécie por Beneduzi e colaboradores (2010). Experimentos em casa de vegetação demonstraram sua habilidade para promover aumento da parte aérea e do peso seco de plantas de trigo, além de provável indução de alongamento das raízes pela produção de AIA (Beneduzi et al. 2008a). Além disso, esta bactéria apresenta a capacidade de fixação de nitrogênio pela

produção de nitrogenase e, também, pela produção de uma nitrogenase alternativa (Fernandes et al. 2014).

1.3.3. A PGPR *Burkholderia* sp. 89

O gênero *Burkholderia* pertence à classe das β -proteobacterias e foi proposto em 1992 para separar sete espécies do grupo II do RNA ribossomal de *Pseudomonas* (Yabuuchi et al. 1992). Este gênero pode ser encontrado nos mais diversos ambientes, como solos nativos e contaminados, rizosfera e fitosfera de plantas, trato intestinal de vertebrados, bem como no trato respiratório de humanos (Coenye and Vandamme 2003). Há descrições de espécies de *Burkholderia* vivendo de forma endofítica em videiras (Compant et al. 2005) e cana-de-acúcar (Mendes et al. 2007), como simbioses de legumes (Bontemps et al. 2010; Howieson et al. 2013) e até como simbioses obrigatórios de plantas da família Rubiaceae (Verstraete et al. 2013).

Dentre as patogênicas, destacam-se *B. mallei* e *B. pseudomallei* por serem o agente etiológico de mormo e melioidose, respectivamente (Coenye and Vandamme 2003), que são doenças cutâneas ou sistêmicas transmissíveis entre homens e outros mamíferos. *B. glumae* e *B. plantari* causam doenças em arroz (Mahenthiralingam et al. 2005). A espécie tipo deste gênero, *B. cepacia*, pode causar podridão amarela/marrom das escamas de cebola (Burkholder 1950) e faz parte de um grupo com 20 espécies descritas de especial importância biotecnológica e clínica, chamado de complexo *Burkholderia cepacia*, ou Bcc (do inglês *Burkholderia cepacia complex*) (Peeters et al. 2013; Vandamme and Peeters 2014; De Smet et al. 2015). Estudos mostram que a doença provocada por *B. cepacia* está associada a uma pectato hidrolase e ao sistema de secreção do tipo IV localizados em um plasmídeo, podendo também ser causada pelos membros do Bcc, *B. cenocepacia* e *B. vietnamiensis* (Mahenthiralingam et al. 2005). Muitas espécies membros do Bcc também estão relacionadas a uma pneumonia fatal, chamada de síndrome cepacia, que afeta pacientes com fibrose cística. As espécies de maior relevância clínica são *B. cenocepacia* e *B. multivorans*, que causam de 85- 97% das infecções destes pacientes (Agnoli et al. 2012). A preocupação maior em relação às infecções causadas por membros do Bcc se deve a sua capacidade natural de resistir a vários antibióticos, como cefalosporinas, β -lactâmicos, polimixinas e aminoglicosídeos (Tedesco et al. 2015).

Interessantemente, estes mesmos membros de Bcc que possuem implicações clínicas também apresentam grande interesse biotecnológico para biorremediação, promoção de crescimento vegetal e biocontrole. Estas espécies estão entre as bactérias cultiváveis mais prevalentes da rizosfera de plantas, podendo ser encontradas em números de 10^3 a 10^5 UFC/g solo, principalmente em solos de culturas gramíneas como milho e trigo (Balandreau et al. 2001; Fiore et al. 2001; Parke and Gurian-Sherman 2001; Arruda et al. 2013; Moreira et al. 2016).

Espécies de *Burkholderia* se destacam em sua capacidade de produção de sideróforos, ácido indol acético e solubilização de fosfato (Vial et al. 2007; Ambrosini et al. 2012; Suárez-Moreno et al. 2012; de Souza et al. 2013; Costa et al. 2014; Moreira et al. 2016). Desta forma, espécies deste gênero têm mostrado capacidade de promoção de crescimento vegetal de cebola (Sessitsch et al. 2005), arroz (Ait Barka et al. 2006), milho (Bevivino et al. 1998; Ciccillo et al. 2002) e trigo (Shaharoon et al. 2007).

Além disso, muitas espécies do grupo Bcc produzem metabólitos antifúngicos, como pirrolnitrina, fenazina, cepacina, cepaciamida, cepacidina (xilocandina), pseudanas (quinolinonas), lipopeptídeos, rizoxina e sideróforos (Parke and Gurian-Sherman 2001; Quan et al. 2006). Muitas *Burkholderia* protegem plantas de fungos fitopatogênicos (Janisiewicz and Roitman 1988; Huang and Wong 1998; Bevivino et al. 2000) e inclusive já foram o princípio ativo de produtos comercializados para biocontrole, como o Deny (Helena Chemicals, Memphis, TN) e Intercept (Soil Technologies Corp., Fairfield, IA) (Mendes et al. 2007).

Burkholderia sp. 89 foi isolada do solo de campo nativo do estado de Santa Catarina e foi descrita como capaz de produzir sideróforos e fitormônios e de ser antagonista do fungo de maçã *Colletotrichum gloeosporioides* (dos Passos et al. 2014). Estes autores também reportaram que a linhagem 89 possui a habilidade de retardar os sintomas da doença causada por este fungo em plantas de maçã em ensaios em estufa.

1.3.3.1. Identificação de bactérias e da *Burkholderia* sp. 89

Um número crescente de novas espécies de *Burkholderia* vem sendo descrito e, atualmente, existem mais de 80 espécies formalmente catalogadas no banco de dados do LPSN. Muitos trabalhos discutem a dificuldade de identificação de membros do Bcc, visto que estas bactérias são proximamente relacionadas. Membros do Bcc possuem alta

identidade de genes comumente usados na taxonomia bacteriana, como 16S rRNA e *recA* (níveis de identidade de 98-100% e 94-95%, respectivamente) e níveis moderados de hibridização DNA:DNA (DDH; 30- 50%) (Peeters et al. 2013). Além disso, o perfil de ácidos graxos também não as distingue (Peeters et al. 2013). Alternativamente, alguns trabalhos vem mostrando o uso da análise de multilocus como uma ferramenta com alto poder de resolução para a identificação destas espécies (Baldwin et al. 2005).

Análises de multilocus ou MLSA (do inglês, *Multi Locus Sequence Analysis*) ou também MLST (do inglês, *Multi Locus Sequence Typing*) empregam procedimentos filogenéticos baseados na sequência nucleotídica de múltiplos genes para revelar similaridades entre linhagens e diferentes espécies e gêneros (Gevers et al. 2006). Esta metodologia tem sido utilizada para o gênero *Burkholderia* em estudos de epidemiologia, genética de populações e definições de espécies. Diferentes genes *housekeeping* são úteis para este propósito e existe um banco de dados específico para membros do Bcc, o PubMLST (<http://pubmlst.org/bcc/>) (Estrada-de Los Santos et al. 2013). Neste banco, é possível encontrar as sequências de um grande número de isolados dos seguintes genes *housekeeping*: *atpD*, da cadeia beta da ATP sintetase; *gyrB*, da subunidade B da DNA girase; *gltB*, da subunidade maior da glutamato sintetase; *lepA*, da proteína de ligação a GTP; *phaC*, da acetoacetil coenzima A redutase, *recA*, da recombinase A; e *trpB*, da cadeia beta da triptofano sintetase.

Estes sete genes também são utilizados para o cálculo da média de divergência das sequências gênicas concatenadas e foi demonstrado que um limiar de 3% pode ser utilizado para distinguir espécies dentro de Bcc e seria o equivalente ao limiar de 70% de DDH previamente estabelecido para separação de espécies (Vanlaere et al. 2009; Peeters et al. 2013). Utilizando este cálculo, Vandamme e Peeters (2014) analisaram linhagens de Bcc depositadas no PubMLST e demonstraram a possibilidade de haver ao menos 16 novas espécies de Bcc ainda não descritas, o que ele chamou de “Outras Bcc de A a P”. Estes autores discutem que, provavelmente, muitas destas espécies ainda não foram descritas, pois existe grande dificuldade para cumprir todas as exigências necessárias para publicar a descrição de uma nova espécie. Eles relatam que existe uma resistência muito grande em aceitar novas metodologias que substituam as clássicas análises polifásicas para a descrição de espécies e que isto precisa ser revisto diante das evoluções da área genômica.

Tradicionalmente, a identificação de espécies bacterianas é realizada através de uma abordagem polifásica, que inclui dados fenotípicos (testes bioquímicos), quimiotaxonômicos (composição de ácidos graxos), genotípicos (*fingerprints* de DNA) e filogenéticos (sequências de rRNA) (Gevers et al. 2006). Existe muita discussão sobre a necessidade de rever esta abordagem polifásica frente ao surgimento e facilidade de utilização de abordagens genômicas (Sutcliffe et al. 2012; Ramasamy et al. 2014). Atualmente, para se descrever uma espécie existe a necessidade de apresentar ao menos uma característica fenotípica que a diferencie das demais. Esta exigência foi determinada por um comitê de taxonomia bacteriana em 1987 (Wayne et al. 1987). Porém, a busca por um teste diferencial pode ser bastante trabalhosa, onerosa e desestimulante para quem pretende descrever uma nova espécie (Vandamme and Peeters 2014). Além disso, observa-se baixa reprodutibilidade e logo, baixa confiabilidade dos testes bioquímicos. Os resultados dos testes fenotípicos podem sofrer variações de acordo com a concentração do inóculo, temperatura e tempo de incubação, composição do meio e critérios de análise dos resultados (Boone et al. 2001). Existem trabalhos que, inclusive, propõem o abandono de testes fenotípicos e sua substituição por técnicas moleculares para descrição de espécies bacterianas (Konstantinidis et al. 2006; Goris et al. 2007; Chan et al. 2012).

Outro parâmetro bastante utilizado para a definição de espécies é o grau de relação de DDH maior que 70% (Wayne et al. 1987). O DDH é um ensaio de bancada que surgiu para estimar a semelhança de genomas inteiros em uma época em que não haviam técnicas de sequenciamento facilmente disponíveis. Sabe-se que genes diferentes podem indicar histórias filogenéticas distintas (Coenye et al. 2005) e esta técnica superou as limitações de se comparar espécies através de apenas um gene. Contudo, o DDH é de difícil realização por exigir uma grande quantidade de DNA de alta qualidade (Goris et al. 2007) e, além disso, sua necessidade parece ultrapassada frente a atual possibilidade de realmente comparar genomas (Vandamme and Peeters 2014).

Algumas abordagens genômicas simples e gratuitas tem surgido como alternativa ao uso do DDH, como o DDH digital (dDDH) e o ANI (do inglês, *Average Nucleotide Identity*). Meier-Kolthoff e colaboradores provaram a eficácia do uso do mesmo limiar de 70% para o dDDH (Meier-Kolthoff et al. 2014). Da mesma forma, foi estabelecido um limiar de 95% ou mais de identidade de ANI para dois genomas pertencerem a mesma espécie e este valor possui alta correlação com os 70% de DDH (Goris et al. 2007; Richter and Rosselló-Móra

2009). O ANI calcula por comparações par-a-par a identidade de sequências presentes em duas linhagens, ignorando sequências divergentes (Goris et al. 2007) e já se mostrou eficaz na definição de espécies de Bcc (Vanlaere et al. 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial uso de bactérias com características de promoção de crescimento vegetal (PGPR) no controle biológico de fungos fitopatogênicos e identificar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) genômica e bioquimicamente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1. Avaliar a capacidade de controle biológico e competência rizosférica de três bactérias com características de promoção de crescimento vegetal.

Capítulo 2. Re-examinar a posição taxonômica de *Burkholderia* sp. 89 utilizando as abordagens polifásica e genômica.

Capítulo 3. Sequenciar o genoma de *Burkholderia* sp. 89 para melhor compreender suas habilidades de PGP e contribuir com a identificação taxonômica de espécies de Bcc pela abordagem genômica.

Capítulo 4. Comparar as características de bioatividade, biossíntese e estruturais de metabólitos secundários antifúngicos dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*.

Capítulo 5. Purificar metabólitos secundários de *Burkholderia* sp. 89 utilizando a mineração de genoma como guia.

3. CAPÍTULOS

3.1. CAPÍTULO 1

Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria

Evelise Bach^a, Guilherme Dubal dos Santos Seger^b, Gabriela de Carvalho Fernandes^a, Bruno Brito Lisboa^c, Luciane Maria Pereira Passaglia^a

^aDepartamento de Genética, Instituto de Biociências (IB), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cFundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Porto Alegre, RS, Brazil.

Artigo publicado na revista *Applied Soil Ecology* 99 (2016) 141–149.

DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.11.002

3.2. CAPÍTULO 2

***Burkholderia catarinensis* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species isolated from Southern Brazilian native grassland soil**

Evelise Bach^a, Fernando Hayashi Sant'Anna^a, João Frederico Mangrich dos Passos^b, Eduardo Balsanelli^c, Valter Antonio de Baura^c, Fábio de Oliveira Pedrosa^c, Emanuel Maltempo de Souza^c, Luciane Maria Pereira Passaglia^a

^a Laboratório de Microbiologia Agrícola, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina, Lages, SC, Brazil.

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Curitiba, PR, Brazil

Nota submetida para a revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

3.3. CAPÍTULO 3

Draft genome of *Burkholderia catarinensis*, a novel rhizobacterium with plant growth promoting and antifungal abilities

Evelise Bach^a, Fernando Hayashi Sant'Anna^a, Eduardo Balsanelli^b, Valter Antonio de Baura^b, Fábio de Oliveira Pedrosa^b, Emanuel Maltempi de Souza^b, Luciane Maria Pereira Passaglia^a

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Curitiba, PR, Brazil

Artigo a ser submetido para a revista *Journal of Biotechnology*.

3.4. CAPÍTULO 4

Comparison of antimicrobial metabolites produced by the secondary metabolism of *Burkholderia* and *Pseudomonas*

Evelise Bach^a, Harald Gross^b, Luciane Maria Pereira Passaglia^a

^a Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Institute for Pharmaceutical Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

Mini-review em preparação a ser submetida para a revista *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.

3.4. CAPÍTULO 5

Genome mining of *Burkholderia catarinensis* reveals the production of a new derivative of the antifungal burkholdin

Evelise Bach,[†] Julia Paterson,[‡] Judith S. Bauer,[‡] Harald Gross,[‡] Luciane Maria Pereira Passaglia[†]

[†] Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

[‡] Institute for Pharmaceutical Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

Artigo em preparação para a revista *Journal of Natural Products*.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura atual ainda está baseada no uso de grandes quantidades de agrotóxicos e fertilizantes para a garantia da produtividade. Porém, devido ao conhecimento dos efeitos prejudiciais dessa prática, tanto para o ambiente (Yang et al. 2009) quanto para a saúde humana, tem se aumentado a procura por tecnologias mais limpas. Neste contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (mais conhecidas como *Plant growth promoting bacteria*-PGPB) como inoculantes surge como uma alternativa ecologicamente correta e com grandes benefícios na agricultura para substituir, ou ao menos suplementar, as práticas agressivas atualmente utilizadas (Castro-Sowinski et al. 2007; Bhattacharyya and Jha 2012).

As três PGPB avaliadas neste trabalho, *B. mycooides* B38V, *P. riograndensis* SBR5 e *Burkholderia* sp. 89 apresentaram grande versatilidade na utilização de substratos que poderia lhes garantir uma vantagem competitiva no ambiente rizosférico. De fato, foi possível re-isolar *B. mycooides* B38V e *Burkholderia* sp. 89 de raízes de trigo 30 dias após sua inoculação. Estas duas bactérias também apresentaram atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos, sendo que B38V demonstrou grande capacidade de competição e a linhagem 89 apresentou a produção de um metabólito antifúngico bastante estável e com amplo espectro de atividade contra fungos filamentosos. Entretanto, os resultados dos ensaios de PGP e biocontrole em plantas de trigo não refletiram os resultados observados *in vitro*.

Resultados inconsistentes em ensaios de PGP e de biocontrole têm sido muito discutidos (Ryu et al. 2006; Lugtenberg and Kamilova 2009; Raaijmakers et al. 2009; Chowdhury et al. 2013) e constituem um dos maiores impedimentos para a disseminação do uso de inoculantes e agentes de biocontrole. Problemas relacionados à homogeneidade, microhabitats, clima e competência rizosférica são propostos como responsáveis por essas variações. O substrato utilizado e condições ambientais do solo também possuem grande influência sobre os micro-organismos (Babalola 2010). Desta forma, se faz necessário entender quais variáveis influenciam a regulação dos sistemas benéficos presentes nas bactérias selecionadas.

Além disso, para serem efetivos, PGPB e agentes de biocontrole devem estabelecer uma comunicação molecular com a planta (Haas and Defago 2005). As raízes das plantas fornecem grande quantidade de exsudatos para bactérias do solo (Bais et al. 2006), que

também atua na seleção da comunidade microbiana (Mazzola 2002). Em contrapartida, micro-organismos simbióticos rizosféricos fornecem serviços às plantas, incluindo proteção contra patógenos pela produção de antibióticos e estimulando as defesas da planta (Compant et al. 2005). Plantas ajustam a quantidade e composição dos exsudatos em resposta a patógenos, simbiontes de raiz, produtos bacterianos e disponibilidade nutricional (Paterson et al. 2006) e a composição do exsudato modifica o padrão da expressão gênica de bactérias associadas à raiz (de Werra et al. 2011; Subramoni et al. 2011). Especificamente, plantas podem estimular a produção de compostos antifúngicos por bactérias rizosféricas em resposta à presença de patógenos (Haas and Keel 2003; de Werra et al. 2008; Jousset et al. 2010). Desta forma, para melhorar a consistência *in vivo* da atividade de bactérias com ação de PGP e biocontrole se faz necessário entender como se dá sua comunicação molecular com as plantas saudáveis e plantas infectadas por fungos fitopatogênicos. Uma técnica que vem sendo utilizada para compreensão da comunicação entre bactérias e plantas ou fungos é a análise do transcriptoma por RNA-Seq (Hershkovitz et al. 2013; Li et al. 2014; Magbanua et al. 2014), que possibilita o estudo da expressão gênica total em uma determinada situação.

Temos como perspectiva deste trabalho a análise de dados de RNA-Seq da bactéria *Burkholderia* sp. 89 quando em contato com o fungo *D. tritici-repentis* e quando em contato com raízes de trigo infectadas por este fungo. Desta forma, esperamos compreender melhor a comunicação entre estes micro-organismos e a planta para também melhor compreender as situações em que a bactéria estará expressando seus genes benéficos para a planta. Finalmente, temos como grande objetivo desta análise contribuir com o entendimento das situações que proporcionam a expressão dos genes de interesse pelas bactérias para diminuir as inconsistências observadas sistematicamente em testes de inoculantes em câmaras de crescimento e a campo.

Outra contribuição interessante deste trabalho foi a descrição de uma nova espécie de *Burkholderia* membro do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), a *B. catarinensis* 89^T. Frequentemente, utiliza-se o sequenciamento do 16S rRNA para a identificação de espécies bacterianas. Porém, neste trabalho, observamos e discutimos a importância da utilização de abordagens genômicas e de MLSA para a identificação de espécies, especialmente para o Bcc. *B. catarinensis* reforça o interesse neste grupo de bactérias bastante relacionadas, versáteis e de habilidades contrastantes, sendo que alguns membros possuem interesse

clínico, enquanto que, ao mesmo tempo, apresentam grande capacidade biotecnológica para biorremediação, PGP e/ou biocontrole.

O sequenciamento do genoma de *B. catarinensis* 89 foi inicialmente planejado para termos um genoma de referência para mapear transcritos do experimento de RNA-Seq. Desta forma, optamos por uma metodologia de sequenciamento mais rápida e de baixo custo, o Ion Torrent (Thermo Fischer Scientific) (Goodwin et al. 2016). Utilizamos três montadores: CLC Genomics Workbench, Mira e Spades e, apesar de termos obtido boa completude do genoma (95.75%), ele estava fragmentado em 892 *contigs*.

Posteriormente, surgiu a oportunidade de trabalhar com mineração de genoma e purificação guiada pelo genoma para tentar desvendar os genes relacionados à produção do metabólito antifúngico de *B. catarinensis* 89, através da busca de sequências específicas dentro do genoma. Neste momento, quanto melhor a qualidade do genoma, melhor são as suposições possíveis de serem feitas para guiar a purificação do metabólito. Infelizmente, o genoma sequenciado pela metodologia Ion Torrent forneceu *clusters* muito fragmentados e dificultou nosso trabalho de mineração de genoma.

Desta forma, decidimos utilizar outra metodologia de sequenciamento que fornece leituras maiores, o Illumina MiSeq, com a qual conseguimos menor fragmentação do genoma. Sendo assim, o sequenciamento do genoma de *B. catarinensis* 89^T nos auxiliou na identificação desta espécie, na melhor compreensão de suas potencialidades e guiou a purificação de seus metabólitos de interesse pela metodologia de mineração de genoma. Além disso, a disponibilidade de um genoma de referência facilitará as futuras análises de RNA-Seq.

A metodologia de mineração de genoma surgiu com a maior disponibilidade e facilidade de sequenciamento de genomas e consiste em detectar *in silico* os *clusters* relacionados à biossíntese de produtos naturais e prever as características de seus possíveis produtos. A partir da predição realizada através da ferramenta antiSMASH foi possível identificar os *clusters* responsáveis pela produção de metabólitos secundários por *B. catarinensis* e traçar estratégias para sua purificação ou detecção de sua produção por espectrometria de massas. Utilizando a metodologia de mineração de genoma combinada com o fracionamento guiado por bioensaios, conseguimos purificar com sucesso duas variantes do sideróforo ornibactina (D e F), confirmando experimentalmente suas massas (761 e 789 Da) e fórmulas moleculares (C₂₈H₅₃N₈O₁₃ e C₃₀H₅₇N₈O₁₃), respectivamente.

Além disso, também detectamos pelo espectrômetro de massas LC-MS a variante ornibactina B ($m/z=733$) e as moléculas sinalizadoras homoserina lactonas C6-HSL e C8-HSL.

Infelizmente, o genoma que tínhamos disponível na época da realização destes experimentos estava muito fragmentado e dificultou nossas suposições de um possível metabólito antifúngico e, sendo assim, tivemos de optar pela abordagem tradicional de purificação baseada em fracionamentos guiados por bioensaios. Realizamos extrações com diversos solventes e resinas, cromatografia líquida, extração em fase sólida e diversos passos em HPLC. Obtivemos atividade antifúngica em praticamente todas as frações geradas e isso dificultou a purificação do composto. Mais estudos deverão ser realizados para verificarmos a possibilidade desta bactéria estar produzindo mais de um composto antifúngico. Contudo, todas as frações ativas apresentaram a presença de metabolitos com massas maiores de 1000 Da, que já indicavam a presença de lipopeptídeos. Esta hipótese foi confirmada com o novo sequenciamento do genoma.

Realizamos nova predição pelo antiSMASH com o genoma mais completo e obtivemos a indicação de que *B. catarinensis* 89 seria capaz de produzir o glicolipopeptídeo cíclico com atividade antifúngica chamado de burkholdina. Análises das frações bioativas nos espectrômetros de massas MALDI-ToF/ToF e Orbitrap demonstraram a presença de um grupo de metabólitos com massas de 1240, 1254, 1268, 1216, 1244 e 1272 Da, provavelmente sendo novas variantes do antifúngico burkoldina. Pretendemos, como perspectiva, construir uma linhagem mutante dessa bactéria onde parte dos genes de biossíntese deste lipopeptídeo seja inativada para nos certificarmos que este metabólito está relacionado com sua capacidade antifúngica e verificar se existem outros mecanismos relacionados com esta atividade em *B. catarinensis* 89^T.

Durante este trabalho surgiu a necessidade de melhor conhecer as características dos metabólitos antifúngicos produzidos pelo gênero *Burkholderia* e do gênero proximalmente relacionado, *Pseudomonas*. Desta forma, elaboramos uma tabela comparativa contendo informações sobre suas atividades biológicas, estruturais e biossintéticas que também nos auxiliou a guiar nosso trabalho de identificação e purificação do metabólito. Acreditamos que esta tabela possa ser útil para futuros trabalhos com este gênero e, por isso, iniciamos a preparação de um artigo de revisão sobre o assunto.

Sendo assim, neste trabalho descrevemos uma nova espécie de bactéria de solo membro do Bcc que possui um amplo espectro de atividade contra fungos fitopatogênicos. *B. catarinensis* 89^T possui potencial biotecnológico para a produção de novas variantes do glicolipopeptídeo cíclico burkholdina, que possui uma atividade antifúngica bastante estável com possíveis aplicações farmacêuticas e agronômicas para o biocontrole de fungos fitopatogênicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnoli K, Schwager S, Uehlinger S, Vergunst A, Viteri DF, Nguyen DT, Sokol PA, Carlier A and Eberl L (2012) Exposing the third chromosome of *Burkholderia cepacia* complex strains as a virulence plasmid. *Mol Microbiol* 83:362–378.
- Alami Y, Achouak W, Marol C and Heulin T (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. Strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66:3393–3398.
- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro F, Vargas L and Passaglia LP (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356:245–264. doi: 10.1007/s11104-011-1079-1
- Ambrosini A, Sant’Anna FH, de Souza R, Tadra-Sfeir M, Faoro H, Alvarenga SM, Pedrosa FO, Souza EM and Passaglia LMP (2015) Genome Sequence of *Bacillus mycoides* B38V, a Growth-Promoting Bacterium of Sunflower. *Genome Announc*. doi: 10.1128/genomeA.00245-15
- Ambrosini A, Stefanski T, Lisboa BB, Beneduzi A, Vargas LK and Passaglia LMP (2016) Diazotrophic bacilli isolated from the sunflower rhizosphere and the potential of *Bacillus mycoides* B38V as biofertiliser. *Ann Appl Biol* 168:93–110.
- Andrews SC, Robinson AK and Rodríguez-Quñones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215–237.
- Arkhipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko E V, Melentiev AI and Kudoyarova GR (2007) Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil* 292:305–315.
- Arruda L, Beneduzi A, Martins A, Lisboa B, Lopes C, Bertolo F, Passaglia LMP and Vargas LK (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Appl Soil Ecol* 63:15–22. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.09.001
- Ash C, Priest FG and Collins MD (1994) *Paenibacillus* gen. nov. and *Paenibacillus polymyxa* comb. nov. Valid. Publ. new names new Comb. previously Eff. Publ. Outs. IJSB, List
- Babalola O (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0
- Bach E, Cannavan FS, Duarte FRS, Taffarel JAS, Tsai SM and Brandelli A (2011) Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. *Int Biodeterior Biodegrad*. doi: 10.1016/j.ibiod.2010.07.005
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S and Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266. doi: doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Balandreau J, Viallard V, Cournoyer B, Coenye T, Laevens S and Vandamme P (2001) *Burkholderia cepacia* Genomovar III Is a Common Plant-Associated Bacterium. *Appl Environ Microbiol* 67:982–985. doi: 10.1128/aem.67.2.982-985.2001
- Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCI, Govan JR, Speert DP, LiPuma JJ, Vandamme P and Dowson CG (2005) Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 43:4665–4673.

- Bashan Y and Holguin G (2002) Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees* 16:159–166.
- Beneduzi A, Ambrosini A and Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35:1044–1051.
- Beneduzi A, Costa PB, Parma M, Melo IS, Bodanese-Zanettini MH and Passaglia LMP (2010) *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:128–133. doi: 10.1099/ij.s.0.011973-0
- Beneduzi A, Peres D, da Costa PB, Bodanese Zanettini MH and Passaglia LMP (2008a) Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Res Microbiol* 159:244–250. doi: 10.1016/j.resmic.2008.03.003
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH and Passaglia LMP (2008b) Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl Soil Ecol* 39:311–320. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.01.006
- Berge O, Guinebretière M-H, Achouak W, Normand P and Heulin T (2002) *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:607–616.
- Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S and Chiarini L (2000) Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol Fertil Soils* 31:225–231. doi: 10.1007/s003740050649
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C and Chiarini L (1998) Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol Ecol* 27:225–237. doi: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00539.x
- Bhattacharyya PN and Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350.
- Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, Dos Reis JÚnior FábB, Gross E, Lawton RC, Neto NE, De FÁTima Loureiro M, De Faria SM, Sprent JI et al. (2010) *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 19:44–52. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x
- Boone DR, Castenholz RW and Garrity GM (2001) Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. New York [etc.]: Springer
- Burd GI, Dixon DG and Glick BR (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 46:237–245.
- Burkholder WH (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115–117.
- Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y and Jurkevitch E (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 276:1–11.
- Chan JZM, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C and Pallen MJ (2012) Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol* 12:1.
- Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R and Guo J (2013) Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm

- formation. *Environ Microbiol* 15:848–864. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W-A and Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl soil Ecol* 34:33–41.
- Choi S-K, Park S-Y, Kim R, Kim S-B, Lee C-H, Kim JF and Park S-H (2009) Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191:3350–3358.
- Chowdhury SP, Dietel K, Rändler M, Schmid M, Junge H, Borriss R, Hartmann A and Grosch R (2013) Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. *PLoS One* 8:e68818. doi: 10.1371/journal.pone.0068818
- Ciccillo F, Fiore A, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S and Chiarini L (2002) Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environ Microbiol* 4:238–245.
- Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P and Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev* 29:147–167.
- Coenye T and Vandamme P (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5:719–729.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka EA (2005) Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951–4959. doi: 10.1128/aem.71.9.4951-4959.2005
- CONAB (2016) Acompanhamento da safra brasileira de grãos. CONAB 3:
- Costa PB da, Granada CE, Ambrosini A, Moreira F, de Souza R, dos Passos JFM, Arruda L and Passaglia LMP (2014) A Model to Explain Plant Growth Promotion Traits: A Multivariate Analysis of 2,211 Bacterial Isolates. *PLoS One* 9:e116020. doi: 10.1371/journal.pone.0116020
- Cunha, Gilberto Rocca; Caierão E (2014) Informações Técnicas para Trigo e Triticale - Safra 2015. Embrapa Trigo
- De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M and Ginther JL (2015) *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2265–2271.
- de Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Da Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R and Passaglia LMP (2013) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366:585–603.
- de Werra P, Baehler E, Huser A, Keel C and Maurhofer M (2008) Detection of Plant-Modulated Alterations in Antifungal Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on Roots by Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* 74:1339–1349. doi: 10.1128/aem.02126-07
- de Werra P, Huser A, Tabacchi R, Keel C and Maurhofer M (2011) Plant- and Microbe-Derived Compounds Affect the Expression of Genes Encoding Antifungal Compounds in a Pseudomonad with Biocontrol Activity. *Appl Environ Microbiol* 77:2807–2812. doi: 10.1128/AEM.01760-10

- Dobbelaere S, Vanderleyden J and Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:107–149.
- dos Passos JFM, da Costa PB, Costa MD, Zaffari GR, Nava G, Boneti JI, de Oliveira AMR and Passaglia LMP (2014) Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Genet Mol Biol* 37:560–572.
- Drobniowski FA (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* 6:324–338.
- Dutta S and Podile AR (2010) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit Rev Microbiol* 36:232–244.
- Estrada-de Los Santos P, Vinuesa P, Martínez-Aguilar L, Hirsch AM and Caballero-Mellado J (2013) Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr Microbiol* 67:51–60.
- Fernandes G de C, Trarbach LJ, de Campos SB, Beneduzi A and Passaglia LMP (2014) Alternative nitrogenase and pseudogenes: unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. *Res Microbiol* 165:571–580. doi: 10.1016/j.resmic.2014.06.002
- Fernandes JMC (1999) Controlando as doenças de trigo na hora certa. Embrapa Trigo
- Fiore A, Laevens S, Bevivino A, Dalmastri C, Tabacchioni S, Vandamme P and Chiarini L (2001) *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. *Environ Microbiol* 3:137–143.
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D and Abdala G (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1145–1152.
- Francis I, Holsters M and Vereecke D (2010) The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environ Microbiol* 12:1–12.
- Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol 1. *Annu Rev Phytopathol* 43:337–359.
- Gevers D, Dawyndt P, Vandamme P, Willems A, Vancanneyt M, Swings J and De Vos P (2006) Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361:1911–1916.
- Ghosh S, Penterman JN, Little RD, Chavez R and Glick BR (2003) Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem* 41:277–281.
- Goodwin S, McPherson JD and McCombie WR (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17:333–351.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P and Tiedje JM (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81–91.
- Govindasamy V, Senthilkumar M, Magheshwaran V, Kumar U, Bose P, Sharma V and Annapurna K (2011) *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. In: Maheshwari DK (ed) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, pp 333–364
- Govindasamy V, Senthilkumar M, Magheshwaran V, Kumar U, Bose P, Sharma V and Annapurna K (2010) *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. *Plant growth and health*

- promoting bacteria. Springer, pp 333–364
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A and Yuan Z-C (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* 15:203.
- Granada C, Da Costa PB, Lisboa BB, Vargas LK and Passaglia LMP (2013) Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. *Plant Soil* 373:339–358.
- Haas D and Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Micro* 3:307–319.
- Haas D and Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 41:117–153. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656
- Haggag WM and Timmusk S (2008) Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J Appl Microbiol* 104:961–969. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03611.x
- Hershkovitz V, Sela N, Taha-Salaime L, Liu J, Rafael G, Kessler C, Aly R, Levy M, Wisniewski M and Droby S (2013) De-novo assembly and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fructicola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. *BMC Genomics* 14:168.
- Howieson JG, De Meyer SE, Vivas-Marfisi A, Ratnayake S, Ardley JK and Yates RJ (2013) Novel *Burkholderia* bacteria isolated from *Lebeckia ambigua* – A perennial suffrutescent legume of the fynbos. *Soil Biol Biochem* 60:55–64. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.01.009
- Huang KH, Chen BY, Shen FT and Young CC (2012) Optimization of exopolysaccharide production and diesel oil emulsifying properties in root nodulating bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1367–1373.
- Huang Y and Wong PTW (1998) Effect of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and soil type on the control of crown rot in wheat. *Plant Soil* 203:103–108. doi: 10.1023/A:1004377801490
- IAPAR (2013) Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale.
- Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R and Kasatiya S (1995) *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett Appl Microbiol* 21:103–105.
- Janisiewicz WJ and Roitman J (1988) Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78:1697–1700.
- Jousset A, Rochat L, Lanoue A, Bonkowski M, Keel C and Scheu S (2010) Plants Respond to Pathogen Infection by Enhancing the Antifungal Gene Expression of Root-Associated Bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:352–358. doi: 10.1094/MPMI-09-10-0208
- Kamal MM, Savocchia S, Lindbeck KD and Ash GJ (2016) Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed Brassicas. *Australas Plant Pathol* 45:1–14.
- Karagöz K, Ateş F, Karagöz H, Kotan R and Çakmakçı R (2012) Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. *Eur J Soil Biol* 50:144–150.

- Kazi N, Deaker R, Wilson N, Muhammad K and Trethowan R (2016) The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field. *F. Crop. Res.*
- Khan A, Geetha R, Akolkar A, Pandya A, Archana G and Desai AJ (2006) Differential cross-utilization of heterologous siderophores by nodule bacteria of *Cajanus cajan* and its possible role in growth under iron-limited conditions. *Appl Soil Ecol* 34:19–26.
- Kloepper JW, Ryu C-M and Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259–1266.
- Konstantinidis KT, Ramette A and Tiedje JM (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361:1929–1940.
- Krewulak KD and Vogel HJ (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta (BBA)- Biomembranes* 1778:1781–1804.
- Kumar M, León V, Materano ADS and Ilzins OA (2007) A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. *World J Microbiol Biotechnol* 23:211–220.
- Kumar P, Dubey RC and Maheshwari DK (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res* 167:493–499. doi: 10.1016/j.micres.2012.05.002
- Lal S and Tabacchioni S (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J Microbiol* 49:2–10.
- Li B, Ibrahim M, Ge M, Cui Z, Sun G, Xu F and Kube M (2014) Transcriptome analysis of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* cultivated in vivo and co-culture with *Burkholderia seminalis*. *Sci. Rep.* 4:
- Li J and Jensen SE (2008) Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 involves direct activation of a D-amino acid. *Chem Biol* 15:118–127.
- Lorentz RH, Ártico S, Da Silveira AB, Einsfeld A and Corção G (2006) Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. *Lett Appl Microbiol* 43:541–547. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01995.x
- Lugtenberg B and Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- MacMillan J (2001) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Growth Regul* 20:387–442.
- Magbanua Z V, Arick M, Buza T, Hsu C-Y, Showmaker KC, Chouvarine P, Deng P, Peterson DG and Lu S (2014) Transcriptomic dissection of the rice–*Burkholderia glumae* interaction. *BMC Genomics* 15:1.
- Mahenthalingam E, Urban TA and Goldberg JB (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3:144–156.
- Mavrodi D V, Parejko JA, Mavrodi O V, Kwak Y-S, Weller DM, Blankenfeldt W and Thomashow LS (2013) Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environ Microbiol* 15:675–686. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02846.x
- Mazzola M (2002) Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:557–564. doi: 10.1023/A:1020557523557

- Meier-Kolthoff JP, Klenk H-P and Göker M (2014) Taxonomic use of DNA G+ C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:352–356.
- Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL and Raaijmakers JM (2007) Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. *Appl Environ Microbiol* 73:7259–7267. doi: 10.1128/aem.01222-07
- Miethke M and Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:413–451.
- Moreira F da S, Costa PB da, Souza R de, Beneduzi A, Lisboa BB, Vargas LK and Passaglia LMP (2016) Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Genet Mol Biol* 39:111–121.
- Moreira FM de S (2006) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Ufla
- Pal KK and Gardener BM (2006) Biological control of plant pathogens. *plant Heal Instr* 2:1117–1142.
- Parke JL and Gurian-Sherman D (2001) Diversity of the *Burkholderia cepacia* Complex and Implications for Risk Assessment of Biological Control Strains. *Annu Rev Phytopathol* 39:225–258. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.225
- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM and DiLeo M V (2016) From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Front. Plant Sci.* 7:
- Paterson E, Sim A, Standing D, Dorward M and McDonald AJS (2006) Root exudation from *Hordeum vulgare* in response to localized nitrate supply. *J Exp Bot* 57:2413–2420. doi: 10.1093/jxb/erj214
- Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ and Vandamme P (2013) *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol* 36:483–489.
- Pérez C, Muñoz-Garay C, Portugal LC, Sánchez J, Gill SS, Soberón M and Bravo A (2007) *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* 9:2931–2937.
- Pérez-García A, Romero D and De Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr Opin Biotechnol* 22:187–193.
- Qian C-D, Liu T-Z, Zhou S-L, Ding R, Zhao W-P, Li O and Wu X-C (2012) Identification and functional analysis of gene cluster involvement in biosynthesis of the cyclic lipopeptide antibiotic pelgipeptin produced by *Paenibacillus elgii*. *BMC Microbiol* 12:1.
- Quan CS, Zheng W, Liu Q, Ohta Y and Fan SD (2006) Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:1276–1284. doi: 10.1007/s00253-006-0425-3
- Raaijmakers J, Paulitz T, Steinberg C, Alabouvette C and Moëgne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321:341–361. doi: 10.1007/s11104-008-9568-6
- Raaijmakers JM and Mazzola M (2012) Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 50:403–424. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-

- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V and Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot* 20:1–11.
- Ramasamy D, Mishra AK, Lagier J-C, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, Raoult D and Fournier P-E (2014) A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:384–391.
- Richter M and Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci* 106:19126–19131.
- Ryu C-M, Kim J, Choi O, Kim SH and Park CS (2006) Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biol Control* 39:282–289. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.04.014
- Safronova VI, Stepanok V V, Engqvist GL, Alekseyev Y V and Belimov AA (2006) Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biol Fertil Soils* 42:267–272.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S and Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:635–648.
- Schallmey M, Singh A and Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50:1–17.
- Seldin L, Rosado AS, da Cruz DW, Nobrega A, van Elsas JD and Paiva E (1998) Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl Environ Microbiol* 64:3860–3868.
- Seldin L, Van Elsas JD and Penido EGC (1983) *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant Soil* 70:243–255.
- Senthilkumar M, Govindasamy V and Annapurna K (2007) Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Curr Microbiol* 55:25–29.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz A V, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B and Glick BR (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1187–1192.
- Shaharoon B, Jamro GM, Zahir ZA, Arshad M and Memon KS (2007) Effectiveness of Various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* Containing ACC-Deaminase for Improving Growth and Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Microbiol Biotechnol* 17:1300.
- Spaepen S, Vanderleyden J and Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–448.
- Steenhoudt O and Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24:487–506.
- Suárez-Moreno Z, Caballero-Mellado J, Coutinho B, Mendonça-Previato L, James E and Venturi V (2012) Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. *Microb Ecol* 63:249–266. doi: 10.1007/s00248-011-9929-1

- Subramoni S, Gonzalez JF, Johnson A, Péchy-Tarr M, Rochat L, Paulsen I, Loper JE, Keel C and Venturi V (2011) Bacterial subfamily of LuxR regulators that respond to plant compounds. *Appl Environ Microbiol* 77:4579–4588. doi: 10.1128/aem.00183-11
- Sutcliffe IC, Trujillo ME and Goodfellow M (2012) A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101:13–20.
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM and Murphy A (2015) *Plant physiology and development*. Sinauer Associates, Incorporated
- Teale WD, Paponov IA and Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:847–859.
- Tedesco P, Visone M, Parrilli E, Tutino ML, Perrin E, Maida I, Fani R, Ballestriero F, Santos R and Pinilla C (2015) Investigating the Role of the Host Multidrug Resistance Associated Protein Transporter Family in *Burkholderia cepacia* Complex Pathogenicity Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. *PLoS One* 10:e0142883.
- Tortora ML, Díaz-Ricci JC and Pedraza RO (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch Microbiol* 193:275–286.
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA and Netrusov AI (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42:117–126.
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254.
- Vandamme P and Peeters C (2014) Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:57–65.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthalingam E, Speert DP, Dowson C and Vandamme P (2009) Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:102–111.
- Velho R V, Medina LFC, Segalin J and Brandelli A (2011) Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiol (Praha)* 56:297–303. doi: 10.1007/s12223-011-0056-7
- Verstraete B, Janssens S, Smets E and Dessein S (2013) Symbiotic β -proteobacteria beyond legumes: *Burkholderia* in Rubiaceae. *PLoS One* 8:e55260.
- Vial L, Groleau M-C, Dekimpe V and Déziel É (2007) *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol* 17:1407–1429.
- von der Weid I, Artursson V, Seldin L and Jansson JK (2005) Antifungal and Root Surface Colonization Properties of GFP-Tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177. *World J Microbiol Biotechnol* 21:1591–1597. doi: 10.1007/s11274-005-8123-3
- Wandersman C and Delepelaire P (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58:611–647.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC,

- Murray Rge and Stackebrandt E (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 37:463–464.
- Weller DM (1988) Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 26:379–407. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T and Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36:1251–1275.
- Yang J, Kloepper JW and Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14:1–4. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.004

ANEXO I

Outros trabalhos desenvolvidos durante o doutorado

Artigos publicados/aceitos:

de Brito LF, Bach E, Kalinowski J, Ruckert C, Passaglia LMP, Wendisch VF (2015) Complete genome sequence of *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T, a Gram-positive diazotrophic rhizobacterium. J Biotechnol 207:30-31. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.025

Bach E, Fernandes GDC, Passaglia LMP (2016) How to transform a recalcitrant *Paenibacillus* strain: from culture medium to restriction barrier. J Microbiol Methods 131: 135–143. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.012>

Sant'anna V, Biondo E, Kolchinski EM, da Silva LFS, Corrêa APF, Bach E, Brandelli A (2016) Total Polyphenols, Antioxidant, Antimicrobial and Allelopathic Activities of Spend Coffee Ground Aqueous Extract. Waste and Biomass Valori. doi: 10.1007/s12649-016-9575-4

Submetido:

Sant'anna FH, Ambrosini A, Souza R, Fernandes GDC, Bach E, Balsanelli E, Baura VA, Brito LF, Wendisch VF, Pedrosa FO, Souza EM, Passaglia LMP. Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a subspecies of *Paenibacillus sonchi*: genome-based methods outperform traditional polyphasic taxonomy methods. Submetido a Systematic and Applied Microbiology.

Seleção para curso e auxílios recebidos

Auxílio de curta duração recebido do DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst, Alemanha)- para realização de parte da pesquisa na Universidade Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Alemanha de 01 de setembro de 2015 a 31 de janeiro de 2016 (5 meses).

Participação no curso “APLICAÇÃO DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM ANÁLISES DE METABÓLITOS MICROBIANOS” realizado na Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP de 16 a 27 de maio, 2016 (Carga horária: 80h). Participação custeada pelo Centro Brasileiro- Argentino de Biotecnologia (CBAB) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Participação no curso “FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA APLICADAS ÀS ANÁLISES DE RNA-SEQ” realizado no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) de 04 a 15 de julho, 2016 (Carga horária: 80h). Curso promovido pelo CBAB do MCTI.