

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

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS EM LAVOURAS
DE MACIEIRAS SOB DIFERENTES TIPOS DE MANEJO E
PROSPECÇÃO DE CLONES METAGENÔMICOS INDUTORES DE
RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA NESSA CULTURA**

JOÃO FREDERICO MANGRICH DOS PASSOS

PORTO ALEGRE
2014

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS EM LAVOURAS
DE MACIEIRAS SOB DIFERENTES TIPOS DE MANEJO E
PROSPECÇÃO DE CLONES METAGENÔMICOS INDUTORES DE
RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA NESSA CULTURA**

JOÃO FREDERICO MANGRICH DOS PASSOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requerimento parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Coorientador: Dr. Gilmar Roberto Zaffari

PORTO ALEGRE
2014

À minha esposa Rubia e filha Giovanna
À minha mãe Elvira

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética desta Universidade. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica de Nitrogênio, pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação, pela confiança em minha pessoa e pela amizade que ficou construída.

Ao meu co-orientador Dr. Gilmar Roberto Zaffari pela colaboração oferecida ao trabalho e pelo aceite em me co-orientar.

Ao Dr. Murilo Dalla Costa pela colaboração e apoio nos experimentos em casa de vegetação e produção de material vegetal.

Ao Dr. Gilberto Nava pela colaboração e apoio na coleta dos materiais de solos e plantas a campo.

Ao M.Sc. José Itamar Boneti pela colaboração e apoio na montagem do experimento e produção do inóculo fúngico, objeto deste estudo.

À Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira pela colaboração e apoio na realização dos trabalhos no Laboratório de Fitopatologia da Fepagro.

Ao Dr. Bruno Brito Lisboa pela colaboração nas análises no laboratório de análise foliar da Fepagro e amizade.

Ao Dr. Helisson Faoro, pela orientação nos trabalhos de metagenômica.

Ao professor Dr. Charley Staats pela colaboração na investigação molecular do metabólito produzido pelo inóculo de *Burkholderia* sp.

Aos colegas do Núcleo de Microbiologia Agrícola, do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, em especial: MSc. Pedro Beschoren da Costa, Dr. Roberto Farina, Dra. Adriana Ambrosini, Dra. Rocheli de Souza, MSc. Camille Granada, MSc. Fernanda Moreira, MSc. Evelise Bach, MSc Gabriela Fernandes, Edilena Sperb, Andress Pontes, Jaqueline Meyer, Thaís Chaves e Laura Trarbach.

Aos demais colegas do Departamento de Genética da UFRGS pela troca de experiências, colaboração nos trabalhos realizados e amizades construídas.

Aos demais pesquisadores da Fepagro pela cooperação e amizades construídas: Dr. Luciano Kayser Vargas, Dra. Anelise Beneduzi e Jamilla Sampaio.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à Embrapa pelo auxílio financeiro.

À Epagri pela minha liberação integral para a realização do doutorado.

Aos meus irmãos de coração Rubio e Andréia Meira Schlickmann, que, na minha ausência, estavam presentes dando apoio à minha esposa e filha e pela amizade sólida construída nesses anos de convivência.

À minha esposa Rubia pelo carinho, amor, dedicação à nossa filha e paciência durante essa etapa de nossas vidas. Pela força e incentivo de superarmos juntos esses momentos tão importantes para nossas vidas.

À minha filha Giovanna que sempre me esperava de braços abertos e me enchia de energia para continuar e chegar até esse momento tão esperado.

À minha mãe pelo amor maternal e incondicional, pela minha educação e orientação de vida para que eu pudesse hoje me tornar a pessoa, o cidadão, o marido e o pai que me tornei.

Epígrafe

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.” (Albert Einstein)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	05
LISTA DE ABREVIATURAS	09
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
<i>A cultura da maçã.....</i>	<i>15</i>
<i>Doenças que afetam a cultura da maçã.....</i>	<i>16</i>
<i>O sistema de produção de maçã brasileira.....</i>	<i>17</i>
<i>Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: algumas de suas características.....</i>	<i>18</i>
<i>Fixação Biológica do Nitrogênio.....</i>	<i>18</i>
<i>Produção de sideróforo.....</i>	<i>20</i>
<i>Solubilização de fosfato.....</i>	<i>21</i>
<i>Produção de reguladores de crescimento vegetal.....</i>	<i>22</i>
<i>Indução do Sistema de Resistência Induzida em plantas por PGPBs.....</i>	<i>24</i>
<i>Metagenômica.....</i>	<i>26</i>
JUSTIFICATIVA.....	29
OBJETIVOS.....	30
CAPÍTULO I: Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	31
CAPÍTULO II: Prospecção de clones metagenômicos indutores de Resistência Sistêmica Induzida em macieira.....	69
CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato (<i>1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic</i>)
ARA	Ensaio de redução do acetileno (<i>Acetylene Reduction Assay</i>)
BMS	Biomassa Microbiana do Solo
cmol _c dm ⁻³	centimol de carga por decímetro cúbico
CFU	Unidade Formadora de Colônia (<i>Colony Forming Unit</i>)
CO	Pomar Convencional (<i>Conventional Orchard</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
H'	Índice de Shannon
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Composto Indólico (<i>Indolic Compound</i>)
ICP-OES	Plasma Indutivamente Acoplado – Espectrometria de Emissão Óptica (<i>Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry</i>)
ISR	Resistência Sistêmica Induzida (<i>Induced Systemic Resistance</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
LSPA	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
m/v	proporção de massa por volume (<i>mass by volume</i>)
MPA	<i>Medium Potato Agar</i>
MOS	Matéria Orgânica do Solo
NaCl	Cloreto de Sódio
NF	Campo Nativo (<i>Native Field</i>)
NPK	Nitrogênio, Fósforo e Potássio (<i>Nitrogen, Phosphorus and Potassium</i>)
OD	Densidade Óptica (<i>Optical Density</i>)
OM	Matéria Orgânica (<i>Organic Matter</i>)
OMC	Conteúdo de Matéria Orgânica (<i>Organic Matter Content</i>)
OO	Pomar Orgânico (<i>Organic Orchard</i>)
PCA	Análise do Componente Principal (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	PCR associada ao polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (<i>PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
PD	Batata Dextrose (<i>Potato Dextrose</i>)
PDB	Tampão de diluição do fago (<i>Phage Dilution Buffer</i>)
PDA	Batata Dextrose Ágar (<i>Potato Dextrose Agar</i>)

PGP	Promotor do crescimento vegetal (<i>Plant Growth Promoting</i>)
PGPB	Bactéria Promotora do Crescimento Vegetal (<i>Plant Growth Promoting Bacteria</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRP	Proteína Relacionada com a Patogênese
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida (<i>Systemic Acquired Resistance</i>)
SD	Desvio Padrão (<i>Standard Desviation</i>)
SE	Erro Padrão (<i>Standard Error</i>)
UV	ultravioleta
V	volts
v/v	proporção de volume por volume (<i>volume by volume</i>)
w/v	proporção peso por volume (<i>weight by volume</i>)

RESUMO

O sistema de produção convencional adotado para macieira depende de recursos não-renováveis, como fertilizantes, além de uma quantidade excessiva de inseticidas. Felizmente esse sistema está sendo substituído por um sistema orgânico. Bactérias promotoras de crescimento de plantas são bactérias nativas e benéficas encontradas no solo e na rizosfera de plantas hospedeiras. Estas bactérias também desempenham um papel importante no controle biológico, uma vez que podem induzir resistência sistêmica contra vários agentes patogênicos. Esse estudo teve dois objetivos principais: avaliar a diversidade de bactérias cultiváveis isoladas da rizosfera e raízes de macieiras cultivadas sob diferentes sistemas de plantio na região sul do estado de Santa Catarina e a realizar a prospecção de clones metagenômicos capazes de induzir resistência sistêmica em macieiras contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da doença da mancha foliar. Para o primeiro objetivo, amostras de solo rizosférico e raízes de macieiras foram coletadas de pomar orgânico e convencional, juntamente com amostras de uma área nunca utilizada para agricultura (campo nativo). As bactérias foram identificadas em nível de gênero por PCR-RFLP e sequenciamento parcial do gene do 16S rRNA e foram avaliadas em relação a diversas características de promoção de crescimento vegetal. Entre as 300 linhagens isoladas, 214 foram capazes de produzir sideróforos, 36 foram capazes de solubilizar fosfatos e 21 produziram uma grande quantidade de compostos indólicos. Sessenta e nove isolados também apresentaram alguma atividade antagonista contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*, provavelmente devido à produção de antibióticos. Entre os gêneros bacterianos mais abundantes destacaram-se linhagens pertencentes a *Rahnella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp. e *Raoultella* sp. Um experimento *in vivo* foi conduzido com cinco isolados e o fungo *C. gloeosporioides* e o isolado 89, identificado como *Burkholderia* sp., foi capaz de reduzir os efeitos patogênicos nas plantas inoculadas. Os resultados obtidos permitiram inferir como a atividade humana está afetando as comunidades bacterianas do solo associadas aos sistemas de cultivo de macieiras, bem como obter isolados capazes de inibir o crescimento de um patógeno importante para esta cultura.

Em relação ao segundo objetivo, amostras de solo rizosférico de macieiras cultivadas em pomares orgânicos e convencionais no município de São Joaquim/SC foram coletadas e o DNA metagenômico foi extraído. Para a confecção das bibliotecas metagenômicas foi utilizado o kit *CopyControl™ HTP Fosmid Library Production* (EPICENTRE). Até o momento, 160 clones foram testados quanto à atividade

antagônica contra o fungo *C. gloeosporioides* em ensaios *in vitro*. Entretanto, nenhum destes 160 clones foi capaz de inibir o crescimento do micélio fúngico. As bibliotecas metagenômicas foram estocadas em glicerol e novos clones serão paulatinamente obtidos e testados para a presença de atividade antagônica ao fungo fitopatogênico.

Após todos os testes realizados, resultados preliminares importantes de interesse agrônômico foram obtidos nesse trabalho. Porém pouco ainda se sabe sobre bactérias diazotróficas cultiváveis conhecidas da cultura da macieira. No entanto, com o advento da metagenômica, micro-organismos não cultiváveis do solo poderão ter seu DNA e/ou parte dele desvendado, e, assim, obter uma gama imensurável para ser usada com fins biotecnológicos na cultura da maçã. Dessa forma, as informações adquiridas com a metagenômica, associada com as informações já existentes de PGPBs, poderão trazer mais resultados positivos de associações bacterianas que visam à promoção do crescimento vegetal, bem como o efeito bacteriano antagonista no controle de agentes fitopatogênicos.

ABSTRACT

The conventional production system adopted for apple crop depends on non-renewable resources, such as fertilizers, in addition to the excessive amount of insecticides. Fortunately, this system is being replaced by an organic system. Plant growth promoting bacteria (PGPB) are native and beneficial bacteria found in soil and roots of host plants. These bacteria also play an important role in biological control, as they can induce systemic resistance against various pathogens. This study had two aims: to evaluate the diversity of cultivable PGPB isolated from rhizospheric soil and roots of apple trees cultivated under different crop systems in the south of Santa Catarina state and the bioprospection of metagenomic clones able to induce apple systemic resistance against *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of leaf spot disease. For the first objective, samples of roots and rhizospheric soil of apple trees cultivated in organic and conventional orchards were collected, together with soil samples from an area never used for agriculture. Bacteria were identified at the genus level by PCR-RFLP 16S rRNA gene analysis and partial sequencing methodologies and were evaluated for several plant growth abilities. Among the 300 strains isolated, 214 were able to produce siderophores, 34 were able to solubilize phosphates and 21 isolates produced a large amount of indolic compounds. Seventy-nine isolates presented some antagonist activity against *C. gloeosporioides*, probably due to antibiotic production. Among the most abundant genera identified were, respectively, *Rahnella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., and *Raoultella* sp. An *in vivo* experiment was conducted with five isolates and *C. gloeosporioides* fungus, and isolate 89, identified as *Burkholderia* sp., was able to reduce the phytopathogenic damage in the inoculated plants. Our results allowed us to infer how anthropogenic activity is affecting the bacterial communities in soil associated with apple tree crop systems, and to obtain an isolate that was able to delay the emergence of an important disease for this culture.

In relation to the second objective, samples of rhizospheric soil from apple trees cropped in organic and conventional orchards in São Joaquim locality (SC) were collected and metagenomic DNA was extracted. To construct metagenomic libraries, the *CopyControl*TM *HTP Fosmid Library Production* (EPICENTRE) kit was used. Up to now 160 clones were tested in relation their antagonistic ability against *C. gloeosporioides* fungus in *in vitro* assays. However, none of them was able to inhibit the fungal growth. New metagenomic clones from glycerol metagenomic libraries will be

screened and tested for the presence of antagonistic activity against this pathogenic fungus.

After all tests, important preliminary results of agronomic interest were obtained in this work. Even though, little is known about culturable diazotrophs known of apple orchards. However, with the advent of the metagenomics, non-cultivable microorganisms in the soil may have their DNA and/or parts unraveled, and thus obtain an immeasurable range to be used with biotechnological purposes in apple orchards. Thus, the information acquired with metagenomics, associated with existing information on PGPBs may bring more positive results of bacterial associations seeking to promote plant growth and bacterial antagonist effect in controlling pathogenic agents.

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da maçã

A cultura da maçã tem papel fundamental na economia brasileira, sendo a segunda fruta de clima temperado mais importante no Brasil, com produção de 1.226.555 t em 2012/13 (IBGE – LSPA, agosto de 2013). Nesta safra (12/13), o estado do Rio Grande do Sul respondeu por mais de 52% da produção nacional (52,4%) e o estado de Santa Catarina se tornou o segundo maior produtor brasileiro, sendo responsável por mais de quarenta e três por cento (43,26%) da produção de maçãs no país (IBGE – LSPA, agosto de 2013). Antes do aumento significativo da sua produção, o Brasil importava a maior parte da maçã consumida. Posteriormente, a maçã nacional foi conquistando o mercado interno, substituindo a maçã importada, atendendo, nos dias de hoje, 95% do consumo interno. A partir do final dos anos 1980, iniciou-se, no Brasil, a exportação de maçãs e, atualmente, esta responde por cerca de 15% da produção nacional, mudando a posição do país de importador para exportador (Pereira et al., 2006).

A maçã, originária da Europa e pertencente à família das Rosáceas, é uma fruta nobre, apresentando maior concentração de plantio nas zonas subtropical e subpolar. O ciclo anual da maçã compreende duas fases distintas: repouso e crescimento vegetativo. O período de repouso, característico da fisiologia da planta, é para a produção de hormônios que se acumulam nas gemas. Essas necessitam certa quantidade de frio para que haja uma posterior “quebra de dormência” e, conseqüentemente, o desenvolvimento em ramos vegetativos ou produtivos (Braga et al., 2001). A macieira, quando plantada em sistema de baixa densidade (em espaçamento 6 x 4 m = ± 417 plantas/ha) inicia a produção de maçãs a partir do terceiro ano e atinge a produção máxima entre o sétimo e o oitavo ano. Altas produtividades podem ser obtidas até o vigésimo ano. A longevidade das plantas em algumas situações pode atingir cem anos. Quando os pomares são conduzidos no sistema de alta densidade (em espaçamento 4 x 2 m = ± 1.250 plantas/ha) a produção inicia no segundo ano após a implantação do pomar e as maiores produções são obtidas a partir do quinto ano (Braga et al., 2001).

Conforme mencionado acima, o potencial produtivo de um pomar de maçã está muito relacionado com a quebra de dormência, a qual deve ser a mais uniforme possível. Para que isto ocorra, o elemento climático mais importante é a temperatura durante o estágio de repouso, o que torna o acúmulo de horas de frio uma variável climática decisiva para a determinação das regiões recomendadas ao cultivo de macieiras. As variáveis climáticas adotadas para o zoneamento da maçã no Brasil

foram: temperatura média de outubro a abril menor ou igual a 19°C; precipitação pluvial anual menor ou igual a 2.500 mm; somatório de horas de frio anual (abaixo de 7,2°C) maior ou igual a 450 h. Considerando-se tais variáveis, o estado de Santa Catarina apresentou 56 municípios aptos para o cultivo de macieiras (Braga et al., 2001). Entre esses 56 municípios destacam-se os municípios de Lages e São Joaquim (Figura 1).

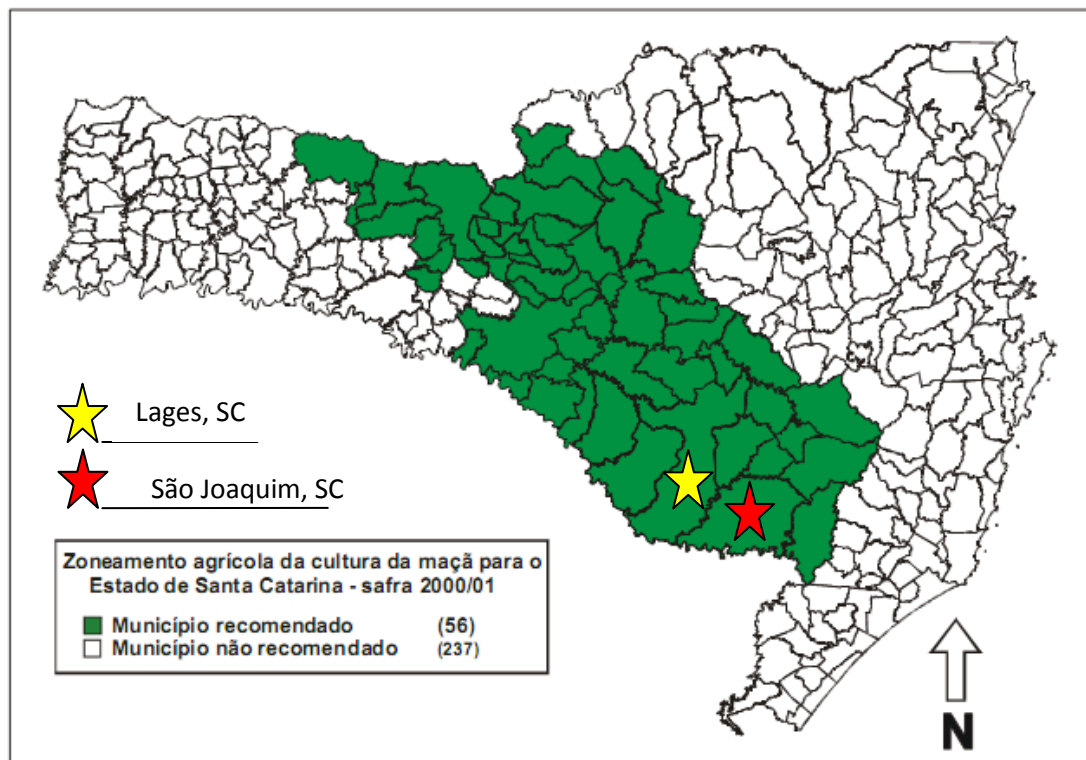


Figura 1. Zoneamento agrícola da cultura da maçã para o estado de Santa Catarina – safra 2000/2001.

Doenças que afetam a cultura da maçã

As pesquisas em melhoramento genético da macieira têm conseguido avanços significativos no desenvolvimento de cultivares resistentes a importantes doenças causadas por fungos, como a sarna (*Venturia inaequalis*) e a mancha foliar de *Glomerella* (forma imperfeita *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.) nos últimos anos. Além dessas, a podridão amarga, causada por *Glomerella cingulata* [(Stoneman) Spaulding & Schrenk] tem causado perdas ao redor de 50% na produção de maçãs no sul do Brasil. Segundo Dunegan (1953 *apud* Denardi et al., 2003), as perdas pelo ataque desta doença no Estado de Arkansas, EUA, chegaram a 96% da produção durante a década de 1950. A incorporação de resistência simultânea às duas doenças citadas acima (sarna e mancha foliar) e à podridão amarga poderá reduzir o uso de fungicidas em mais de 80%. Isto terá efeitos imediatos, não apenas na redução dos

custos de produção, mas também na proteção do produtor, na saúde do consumidor e na preservação do meio ambiente (Denardi et al., 2003).

Muito embora pareça não existir imunidade genética à podridão amarga, têm sido observadas diferenças na reação de resistência entre as cultivares já testadas. Dunegan (1953 *apud* Denardi et al., 2003) observou que a cultivar Golden Delicious é mais suscetível que a Delicious, sendo essas duas as cultivares mais importantes existentes no mercado. Camilo (1989) constatou um amplo gradiente de resistência genética entre os genótipos testados. As cultivares Gala, Fuji e Golden Delicious revelaram-se suscetíveis. Por outro lado, as cultivares Red Rome e Melrose apresentaram um bom nível de resistência (Denardi et al., 2003).

O sistema de produção de maçã brasileira

Além das doenças citadas, o sistema de produção de maçã brasileiro está sofrendo alterações importantes. O sistema de produção convencional está sendo substituído pelo sistema orgânico (Baretta et al., 2007). A migração para o sistema orgânico de produção de maçãs apoia-se no questionamento, por parte de alguns produtores e da sociedade, quanto à sustentabilidade do sistema convencional utilizado no Sul do Brasil. O sistema convencional é caracterizado pelo alto custo de produção, devido, principalmente, à dependência de recursos não-renováveis, a exemplo de fertilizantes requeridos para manutenção de altos níveis de fertilidade do solo, e ao excessivo número de aplicações de agrotóxicos utilizados no controle fitossanitário. Esse sistema promove, ainda, a contaminação das águas subterrâneas e a presença de resíduos químicos em alimentos, degradação do solo, redução da biodiversidade e dos processos microbianos do solo (Altieri, 1999) e representa riscos à saúde dos consumidores e dos trabalhadores que manuseiam os pesticidas (Glover et al., 2000; Baretta et al., 2007).

No Brasil, a agricultura orgânica cresce cerca de 40 a 50% ao ano, em razão, principalmente, da agregação de valor ao produto orgânico, fruto de um mercado de comercialização diferenciado, e da redução dos custos de produção, além dos benefícios quanto à preservação da qualidade do solo e diminuição dos impactos ambientais, em relação ao sistema convencional (Baretta et al., 2007).

O sistema de produção orgânico de maçãs em nosso País ainda é recente, havendo, portanto, poucas informações sobre seus benefícios quanto às alterações nos atributos químicos, físicos e biológicos do solo. Atributos químicos e físicos do solo necessitam de maior período de avaliação e cultivo para responderem ao manejo orgânico. Já as medidas dos processos biológicos são especialmente importantes na

avaliação de sistemas de produção, especialmente no manejo orgânico (Werner, 1997), pois são indicadores sensíveis e precoces de mudanças na dinâmica da matéria orgânica do solo (MOS) e de seus efeitos sobre os atributos físicos e químicos, resultantes das diferentes formas de uso e manejo (Baretta et al., 2007).

O uso de adubos orgânicos tem impacto profundo na qualidade do solo, estimulando processos microbianos que ajudam a desenvolver e manter os agregados deste, bem como sua estrutura, contribuindo para sua resistência à degradação física (pela atividade microbiana do solo) (Glover et al., 2000) e afetando as transformações de seus nutrientes (Baretta et al., 2007).

Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: algumas de suas características

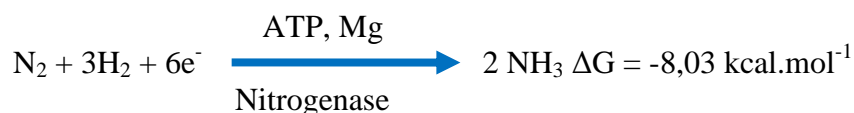
A biomassa microbiana do solo (BMS) é definida como o componente microbiano vivo composto por bactérias, fungos e algas, sendo a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, fluxo de energia, transformação da MOS e imobilização temporária de nutrientes, incluindo o carbono (Baretta et al., 2007).

Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (PGPB – de *Plant Growth Promoting Bacteria*) são bactérias nativas do solo e da rizosfera de plantas e desempenham um importante papel no controle biológico de patógenos de vegetais (Siddiqui, 2006). As PGPBs também podem melhorar profundamente a germinação das sementes, o desenvolvimento radicular e a utilização da água pelas plantas. Essas bactérias estimulam o crescimento das plantas de forma direta, através da produção de hormônios de crescimento e da disponibilização de nutrientes, ou de forma indireta, alterando o equilíbrio microbiano na rizosfera em favor dos micro-organismos benéficos. Elas podem reprimir um amplo espectro de bactérias, fungos e doenças provocadas por nematoides e também podem fornecer proteção contra doenças virais (Siddiqui, 2006).

Fixação Biológica do Nitrogênio

Na natureza o nitrogênio (N), depois do carbono, hidrogênio e oxigênio, é o elemento químico quantitativamente mais abundante na matéria viva (Siqueira, 1988). O nitrogênio constitui cerca de 80% da atmosfera terrestre, ocorrendo na forma molecular diatômica (N_2 ou $N \equiv N$), sendo utilizado apenas por algumas bactérias, incluindo as cianobactérias, e actinomicetos do gênero *Frankia*. Esses organismos contêm a maquinaria enzimática necessária para fazer a sua redução, através de um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN, Halbleib & Ludden, 2000). Do N total existente na ecosfera terrestre somente 0,04% está na forma

combinada, e, desta parte, em torno de 57% na forma orgânica e cerca de 43% na forma inorgânica (Siqueira, 1988). Já do N orgânico terrestre, por volta de 4% fazem parte dos seres vivos, onde 94% estão nas plantas, 4% na biomassa microbiana e 2% nos animais (Siqueira, 1988). As bactérias capazes de realizar a fixação do nitrogênio (chamadas de diazotróficas) dependem de um complexo enzimático denominado de nitrogenase e contam com a participação de Fe, Mg, Mo e energia biológica (ATP), segundo a equação:



Esta reação deveria ser espontânea, devido ao ΔG negativo, entretanto, necessita de muita energia de ativação fornecida em forma de ATP, ficando restrita aos poucos micro-organismos que possuem o sistema enzimático nitrogenase (Dixon & Kahn, 2004). A nitrogenase é inativada pelo oxigênio, o que sugere que ela tenha evoluído cedo na história do planeta, antes que a atmosfera contivesse muito oxigênio molecular e depois que os compostos contendo nitrogênio estivessem disponíveis a partir da matéria orgânica decomposta (Tortora et al., 2012). Um dos produtos da reação catalisada pela nitrogenase é a amônia (NH_3), que a bactéria diazotrófica fornece como fonte assimilável de nitrogênio para os outros organismos ou diretamente para o solo. A relevância deste processo se dá, além da redução dos custos com adubos nitrogenados, pela importância do nitrogênio como um elemento vital, aumentando a produtividade das plantas (Peters et al, 1995).

A fixação do nitrogênio é realizada por dois tipos de micro-organismos: de vida livre e simbióticos. As bactérias de vida livre fixadoras de nitrogênio são encontradas particularmente em altas concentrações na rizosfera, uma região de aproximadamente 2 mm da raiz da planta (Glick, 1995). Entre as bactérias de vida livre que fixam nitrogênio estão espécies aeróbicas pertencentes ao gênero *Azotobacter*, sendo as mais abundantes em solos neutros e alcalinos (Brown, 1974). Esses organismos aeróbicos aparentemente protegem a enzima anaeróbica nitrogenase do oxigênio, por terem uma alta taxa de utilização deste, que minimiza a difusão do mesmo para dentro da célula, onde a enzima está localizada (Tortora et al., 2012). Outro aeróbio obrigatório de vida livre que fixa nitrogênio é *Beijerinckia*, dominante em solos mais ácidos. Algumas bactérias anaeróbicas obrigatórias, como as pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Desulfovibrio*, e anaeróbias facultativas, dos gêneros *Bacillus* e *Klebsiella*, que ocorrem no solo e na água, só fixam N_2 na ausência de oxigênio (Tortora et al., 2012).

As bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio desempenham um papel ainda mais importante no crescimento de plantas para o beneficiamento da colheita. Espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros infectam as raízes de plantas leguminosas, como, por exemplo, soja, feijão, ervilha, amendoim, alfafa e trevo, além de plantas arbustivas ou pequenas árvores encontradas em solos pobres, em várias regiões do mundo (Tortora et al., 2012).

Vários trabalhos vêm caracterizando bactérias diazotróficas encontradas em solos rizosféricos e ou dentro de raízes (endofíticas) em diferentes culturas de importância agrônômica. Ambrosini e colaboradores (2012) encontraram 299 isolados bacterianos endofíticos em solos rizosféricos da cultura do girassol de 5 regiões diferentes do estado do Rio Grande do Sul (RS) com características diazotróficas. Beneduzi e colaboradores (2008) e Souza e colaboradores (2013) encontraram, respectivamente, 296 e 336 isolados bacterianos endofíticos e de solos rizosféricos da cultura do arroz de 13 regiões produtoras diferentes do estado do RS. Na cultura da canola, em um trabalho realizado na cidade de Vacaria, RS, foram isoladas 308 linhagens bacterianas diazotróficas (Farina et al., 2012).

Produção de sideróforo

O ferro é um requisito necessário para a multiplicação da maior parte dos microorganismos, com as exceções dos lactobacilos e *Borrelia burgdorferi* (Dale et al., 2004). Apesar de ser o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, o ferro é frequentemente um nutriente limitante do crescimento. Em ambientes aeróbios e com pH fisiológico, o ferro está presente no estado férrico (Fe^{3+}) e nas formas de hidróxido [$\text{Fe}(\text{OH})_2$] e de oxi-hidróxido [$\text{Fe}^{3+}\text{O}(\text{OH})$] e em precipitados insolúveis, a 10^{-18} M em pH neutro (Dale et al., 2004). A biodisponibilidade microbiana de ferro é amplamente controlada pela presença de agentes quelantes, que são capazes de solubilizar os hidróxidos de ferro ambientais e manter a concentração de ferro solúvel em um domínio ótimo para o crescimento celular. Estes agentes quelantes, chamados sideróforos, são sintetizados por bactérias e outros micróbios para superar a baixa disponibilidade de ferro resultante da solubilidade mínima dos hidróxidos de ferro (Boukhalfa & Crumbliss, 2002). Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular que apresentam alta afinidade ao Fe^{3+} (Gray et al., 2005). Seletivamente, os sideróforos adquirem e mediam o transporte de ferro e a sua deposição no interior da célula. O esquema geral dos sideróforos em mediar a captação de ferro é razoavelmente bem definido. No entanto, os mecanismos moleculares dos diversos passos permanecem pouco claros, tais como a natureza do reconhecimento específico dos complexos de Fe

(III)-sideróforo pelos receptores de membrana celular, os eventos sucessivos que levam os sideróforos a introduzir o complexo no interior da célula e o mecanismo de liberação do ferro dentro da célula, a partir do seu complexo extremamente estável com o sideróforo. Além disso, menos de 10% do ferro celular total presente no interior da célula é de uma forma bem definida, a quantidade restante está presente em formas mal definidas e continuam sendo caracterizadas (Boukhalfa & Crumbliss, 2002).

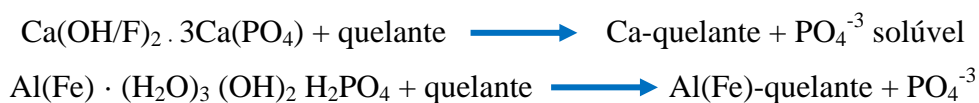
No solo há o exemplo de espécies do gênero *Pseudomonas* que são fluorescentes e sua fluorescência é devida a um pigmento extracelular difusível chamado pioverdina (PVD) ou pseudobactina. Este pigmento tem uma elevada afinidade para os íons Fe^{3+} [a constante de associação da interação (K_{ass}) é $\sim 10^{24}$, a pH 7] e ele é considerado um sideróforo da estirpe produtora (Haas & Défago, 2005). A ferripioverdina (isto é, PVD complexado com Fe^{3+}) interage com um receptor de membrana externa específico, que está presente na linhagem produtora, mas pode também ocorrer em algumas linhagens não produtoras. Subsequentemente, o Fe^{3+} é transportado para o citoplasma e reduzido a Fe^{2+} (Haas & Défago, 2005). Em solos aerados, neutros ou alcalinos, Fe^{3+} é pouco solúvel; o total de espécies Fe^{3+} solúveis representam $\sim 10^{-10}\text{M}$ em equilíbrio com o ferro do solo. Em meios de ferro esgotados *in vitro*, espécies de *Pseudomonas* spp. produtoras de PVD inibem a multiplicação de bactérias e fungos com sideróforos menos potentes (Haas & Défago, 2005).

Na busca por PGPBs, vários trabalhos encontraram isolados bacterianos com a característica de produzir sideróforos e vêm realizando testes para analisar o real potencial de promoção de crescimento vegetal. (Beneduzi et al. 2008; Ambrosini et al., 2012; Farina et al., 2012; Souza et al., 2013).

Solubilização de fosfato

O solo é um enorme reservatório de fósforo (P), mas a maior parte ocorre, geralmente, na fração mineral (Siqueira, 1988). A disponibilidade do fósforo deve determinar se plantas e outros organismos podem crescer em uma área. O fósforo existe inicialmente como íon fosfato (PO_4^{3-}) e sofre pequenas modificações em seu estado de oxidação. O ciclo do fósforo envolve mudanças de formas solúveis para insolúveis e de fosfato orgânico para inorgânico, frequentemente em relação ao pH (Tortora et al., 2012). O P orgânico varia de 3 a 90% do P total do solo, ou de 1 a 3% da matéria orgânica do solo (MOS). Nos solos minerais, ele representa de 20 a 25% do P total, pois a maior parte do P se encontra na forma inorgânica, ligado aos óxidos de Fe e Al, nos solos ácidos, e ao Ca nos solos neutros ou alcalinos (Siqueira, 1988). O processo de fixação de P ocorre com grande rapidez e resulta em compostos com elevada

estabilidade química, limitando a disponibilidade do nutriente na solução do solo. Vários grupos de micro-organismos que vivem no solo ou na rizosfera (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp., *Xanthomonas* sp., *Serratia* sp., *Achromobacter* sp., *Nitrosomonas* sp., por exemplo) são capazes de extrair e solubilizar o P presente no solo, como também dos fosfatos inorgânicos naturais insolúveis, por meio de mecanismos diversos, como, por exemplo, a produção de CO₂ e de ácidos orgânicos, resultantes da mineralização do C orgânico e que exercem ação solubilizadora direta sobre os fosfatos inorgânicos (Siqueira, 1988). O CO₂ produzido transforma-se em H₂CO₃, que solubiliza fosfatos de Ca e Mg, enquanto que outros compostos formam complexos com os metais, liberando o fosfato, de acordo com as reações abaixo:



A produção de ácidos inorgânicos, por micro-organismos quimioautotróficos, com ação solubilizadora, como os ácidos sulfúrico e nítrico, dissolvem várias formas de P no solo (Siqueira, 1988). Segundo Vazquez e colaboradores (2000) alguns isolados microbianos (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Vibrio* sp., *Xanthobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Kluyvera* sp., *Pseudomonas* sp. e *Chryseomonas* sp., por exemplo) são capazes de solubilizar fosfato provavelmente por meio da liberação de ácidos orgânicos e, possivelmente, disponibilizam esse mineral para as plantas.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal presentes no solo e na rizosfera podem se beneficiar do crescimento de plantas por diferentes mecanismos (Glick, 1995). Dado o impacto ambiental negativo dos fertilizantes químicos e seus custos crescentes, o uso de PGPB como fertilizantes naturais é vantajoso para o desenvolvimento da agricultura sustentável (Rodríguez et al., 2006). A capacidade de conversão de fosfatos insolúveis (orgânicos e inorgânicos) para uma forma acessível para as plantas, como a do ortofosfato, é uma característica importante para uma PGPB e pode contribuir para aumentar o rendimento da planta (Rodríguez et al., 2006).

Vários trabalhos vêm encontrando diversos gêneros de PGPB capazes de solubilizar fosfatos insolúveis e disponibilizar para as plantas, tais como: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga, 1999; Beneduzi et al. 2008; Ambrosini et al., 2012; Farina et al., 2012; Souza et al., 2013).

Produção de reguladores de crescimento vegetal

No século XIX, o botânico alemão Julius von Sachs (1832-1897) propôs que mensageiros químicos são os responsáveis pela formação e pelo crescimento de

diferentes órgãos vegetais. Suas ideias levaram à descoberta definitiva desses compostos (Taiz & Zeiger, 2013). Os hormônios são mensageiros químicos que modulam os processos celulares em outra célula, interagindo com proteínas específicas que funcionam como receptores ligados a rotas de transdução de sinal. Hormônios que são transportados para sítios de ação em tecidos distantes do local de síntese são referidos como hormônios endócrinos. Aqueles que agem em células adjacentes ao local de síntese são chamados de hormônios parácrinos. O desenvolvimento vegetal é regulado por seis tipos principais de hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e brassinosteroides (Taiz & Zeiger, 2013). A auxina foi o primeiro hormônio de crescimento estudado em plantas e muitos dos trabalhos pioneiros na fisiologia do mecanismo de expansão celular foram realizados em relação à ação desse hormônio. Este hormônio, junto com a citocinina, parece ser necessário para a viabilidade do embrião vegetal e continuando essencial durante todo o período de desenvolvimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2013). Em meados da década de 1930, foi identificado o ácido indol-3-acético (AIA) como a principal auxina natural. Várias outras auxinas foram descobertas em plantas superiores, mas o AIA é incomparavelmente mais abundante e fisiologicamente mais importante (Taiz & Zeiger, 2013).

As bactérias que habitam a rizosfera podem influenciar o crescimento das plantas, contribuindo para o aumento do *pool* endógeno de uma planta hospedeira de fitormônios, como auxinas. A produção de AIA é generalizada entre as associações de plantas e bactérias (Patten & Glick, 2002). Bactérias benéficas sintetizam AIA predominantemente por uma via dependente de triptofano, por meio de ácido indolpirúvico, no entanto, o papel do AIA bacteriano na promoção do crescimento das plantas ainda permanece mal definida (Patten & Glick, 2002).

A promoção do crescimento radicular é uma das principais características visíveis do efeito benéfico das bactérias promotoras do crescimento vegetal que é mensurável. O estabelecimento rápido de raízes, seja por alongamento das raízes primárias ou pela proliferação de raízes laterais e adventícias, é vantajoso para mudas jovens, pois aumenta a sua capacidade de ancorar-se ao solo e para obter água e nutrientes do seu ambiente, aumentando assim suas chances para a sobrevivência. A maioria das PGPB sintetizam AIA na raiz, e seu efeito sobre as plantas imita o do AIA exógeno (Patten & Glick, 2002).

Patten & Glick (2002) também descreveram que a espécie *Pseudomonas putida* possui algumas características que contribuem para sua habilidade de promover o

crescimento vegetal, tais como: capacidade de sintetizar sideróforo e fornecer ferro para a planta; capacidade de diminuir os níveis de inibição de crescimento por etileno em tecidos de plantas pela produção de ácido 1-aminociclopropano-carboxílico 1 (ACC) desaminase, além da capacidade para secretar AIA.

Além de promover o crescimento vegetal, PGPBs que produzem AIA, também podem ajudar na resistência ou tolerância vegetal em solos contaminados com metais pesados, como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp., que protegeram as plantas contra os efeitos inibitórios de Cr⁶⁺ presente no solo (Rajkumar et al., 2006). Culturas de grande importância econômica como trigo, arroz e cana de açúcar são colonizadas com PGPB. Gêneros como *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* e *Zoogloea* tem sido isolados dessas culturas e de outras espécies de gramíneas (Mirza et al., 2001). Os efeitos benéficos de PGPB sobre plantas também foram atribuídos à produção fitormônios que promovem o desenvolvimento das raízes e sua proliferação, resultando na captação eficiente de água e nutrientes (Mirza et al., 2001).

O uso de PGPBs tornou-se uma prática comum em muitas regiões do mundo. Entretanto, mesmo que o controle significativo de patógenos de plantas por PGPBs tenha sido demonstrado em estudos de laboratório e casa de vegetação, os resultados a campo têm sido inconsistentes. Avanços recentes na compreensão da diversidade, capacidade de colonização e dos mecanismos de formulação e aplicação de inoculantes devem facilitar a aplicação de PGPBs como agentes de biocontrole contra patógenos e em manejo integrado de pragas (Siddiqui, 2006).

Indução do Sistema de Resistência Induzida em plantas por PGPBs

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser ativados por um estímulo apropriado. Geralmente, essa indução de resistência é sistêmica e seu efeito pode ser observado em locais da planta distantes do local de aplicação do indutor. No entanto, às vezes, ocorre somente de forma localizada. Assim, considera-se que a indução de resistência adquirida (SAR – de *Systemic Acquired Resistance*) envolve o acúmulo de Proteínas Relacionadas com a Patogênese (PRPs) como mecanismo induzido de defesa da planta. A indução de SAR é dependente da presença do ácido salicílico e pode resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) na planta que sofreu indução. Enquanto isso, a indução de resistência sistêmica (ISR – de *Induced Systemic Resistance*) não envolve o acúmulo de PRPs, não promove alterações na planta que sofreu indução e não parece ser dependente da presença de ácido salicílico. Existem evidências da existência de outra rota de sinalização, mais associada a jasmonatos e

etileno (Pieterse et al., 1998; Shah et al., 1997; Van Loon et al., 1998; Teixeira et al., 2005).

Em relação ao agente indutor de resistência do tipo SAR, ocorre o envolvimento de indutores químicos ou micro-organismos não patogênicos, formas avirulentas ou raças incompatíveis de um patógeno, ou patógenos virulentos (Van Loon et al., 1998).

Dentre os micro-organismos não patogênicos capazes de induzir resistência sistêmica em plantas, a eficiência de PGPBs tem sido extensivamente estudada. Bactérias não patogênicas podem induzir em plantas resistência sistêmica a vários patógenos, como demonstrado para várias espécies de fungos, bactérias e vírus (ex.: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida*). Os principais determinantes bacterianos de indução de resistência sistêmica, que podem funcionar como elicitores, são os lipopolissacarídeos presentes na membrana (LPS), sideróforos e o ácido salicílico (Van Loon et al., 1997; Van Loon et al., 1998; Teixeira et al., 2005).

Plantas associadas com algumas PGPBs podem apresentar resistência sistêmica contra um amplo espectro de fitopatógenos, entretanto, a ISR é dependente da combinação da planta hospedeira e da estirpe bacteriana associada (Compant et al., 2005a). Doenças fúngicas e de origem bacteriana e viral, e, em alguns casos até mesmo danos causados por insetos e nematoides, podem ser reduzidas após a aplicação de PGPBs (Compant et al., 2005a). Observou-se pela primeira vez a indução da ISR por PGPB em cravo (*Dianthus caryophyllus*), que teve a sensibilidade reduzida à murcha causada por *Fusarium* sp., e em pepino (*Cucumis sativus*), com sensibilidade reduzida à doença foliar causada por *Colletotrichum orbiculare*. A maioria dos relatos de ISR mediada por PGPB envolvem linhagens de bactérias de vida livre, mas bactérias endofíticas também foram observadas para a atividade de ISR. Por exemplo, Viswanathan & Samiyappan (1999) relataram a ocorrência de ISR desencadeada por *Pseudomonas fluorescens* EP1 contra a podridão vermelha causada por *Colletotrichum falcatum* em cana. Vários outros trabalhos também demonstraram resultados similares: *Burkholderia phytofirmans* PsJN contra *Botrytis cinerea* em videira (Barka et al., 2000; Barka et al., 2002; Compant et al., 2005b), *Verticillium dahliae* em tomate (Sharma & Nowak, 1998), *P. denitrificans* (Bloemberg & Lugtenberg, 2001) e *P. putida* (Dong et al., 2004) contra *Ceratocystis fagacearum* em carvalho, *P. fluorescens* contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* em tomate (M'Piga, et al., 1997), *Pythium ultimum* contra *F. oxysporum* f. sp. *pisi* em raízes de ervilha (Benhamou et al., 1996), *Bacillus pumilus* SE34 contra *F. oxysporum* f. sp. *pisi* em raízes de ervilha e contra *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em raízes de algodão (Compant et al., 2005a).

Metagenômica

A metagenômica é descrita como a análise funcional e de sequência de genomas microbianos coletivos contidos em uma amostra ambiental (Handelsman et al, 1998). Seguindo esse conceito, o conjunto de genomas em uma determinada amostra ambiental é denominado de metagenoma. Vários nomes já foram definidos para descrever essa mesma abordagem: bibliotecas de DNA ambiental, zoobibliotecas, bibliotecas de eDNA, genoma de comunidades e bibliotecas ambientais recombinantes (Faoro, 2010). A metagenômica utiliza técnicas clássicas de biologia molecular (purificação de DNA, clonagem e transformação) e de microbiologia (caracterização fisiológica), mas a combinação desses dois campos à luz da vasta diversidade desconhecida tornam ilimitadas as possibilidades para prospecção biotecnológica. Com o uso da metagenômica é possível acessar um grande número de genes que codificam novas enzimas ou enzimas mais eficientes do ponto de vista biotecnológico. Operons de genes que codificam uma via metabólica completa também podem ser recuperados por essa técnica e usados na produção de moléculas do metabolismo secundário (Daniel, 2005).

A metagenômica do solo evoluiu lentamente devido à dificuldade de trabalho com esse tipo de amostra complexa (fragmentos de DNA e iniciadores específicos para o gene 16S rRNA) e à grande quantidade de contaminantes que inibem as reações enzimáticas. Por volta do ano 1999, Rondon e colaboradores (1999), publicaram o primeiro trabalho de metagenômica de solo, realizando, além da análise filogenética, análises funcionais para detecção de enzimas do tipo celulasas, proteases, lipases, esterases, amilases, quitinases, queratinases e DNAses e de vias metabólicas produtoras de biomoléculas. O inserto de DNA dos clones de interesse foi sequenciado, algumas proteínas foram superexpressas e caracterizadas em uma abordagem voltada para a biotecnologia (Faoro, 2010).

A técnica de metagenômica consiste basicamente na purificação e clonagem de DNA de amostras ambientais seguido de prospecção por novos genes. Existem hoje vários protocolos já descritos para a purificação de DNA do solo divididos entre métodos direto e indireto. A purificação de DNA pelo método direto é realizada com toda a matriz do solo. Geralmente, esse método envolve um passo de lise mecânica, na qual o solo é misturado com esferas de sílica e submetido à intensa agitação. O objetivo dessa etapa é desfazer os agregados de solo, liberar o máximo possível de células em solução e também auxiliar na fragmentação da parede celular de bactérias resistentes à lise química. No método indireto de purificação de DNA, as amostras de solo são submetidas a vários ciclos de lavagem e centrifugação com o objetivo de separar as

células bacterianas da matriz do solo. Após se obter a suspensão de células, a purificação de DNA prossegue como uma purificação de DNA genômico tipicamente usada em culturas puras (Faoro, 2010).

A análise ou prospecção de bibliotecas metagenômicas pode ser feita através de dois métodos: o método baseado na análise função-específica e o método baseado na análise sequência-específica (Schloss & Handelsman, 2003). A análise função-específica é onde a identificação de clones que expressam uma determinada característica é analisada. Esta técnica possui várias limitações para a sua expressão em relação à linhagem celular hospedeira, sendo necessário todo o cluster gênico para a expressão. O tamanho do inserto clonado é primordial. Bibliotecas com fragmentos de inserção de 2 a 10 kb são construídas em plasmídeos ou vetores de expressão derivados do bacteriófago lambda; agrupamentos gênicos preferencialmente exigem bibliotecas com fragmentos entre 20 e 40 kb clonados em cosmídeos ou fosmídeos; e fragmentos com tamanhos de 100 a 200 kb devem ser clonados em cromossomos artificiais bacterianos (vetor BAC) (Massini, 2009). Normalmente, a linhagem bacteriana hospedeira mais utilizada para clonagem, *Escherichia coli*, pode não conter as sequências promotoras para a expressão do gene ambiental, ou seja, a utilização de códons dos micro-organismos do ambiente pode ser diferente do da linhagem hospedeira, impedindo a tradução do gene alvo (Rondon et al., 2000; Voget et al., 2003; Jeong et al., 2009; Massini, 2009).

Já o método análise sequência-específica utiliza sequências conservadas do DNA de interesse, através de sondas para hibridização ou produtos de PCR, para analisar a biblioteca metagenômica e, assim, identificar clones que contenham a sequência de interesse (Schloss & Handelsman, 2003; Venter et al, 2004, Schlüter et al, 2008; Morimoto & Fuji, 2009). Nessa metodologia, quanto mais complexa a comunidade estudada mais esforços com sequenciamentos são necessários. Atualmente, com o advento das novas metodologias de sequenciamento, é gerada uma maior quantidade de dados genômicos, dando uma maior cobertura sobre a diversidade de espécies dentro de uma comunidade. Uma desvantagem dessa estratégia ainda é o seu alto custo (Massini, 2009).

A partir dos métodos descritos acima, várias bibliotecas metagenômicas foram construídas com os mais distintos tipos de amostras, como solo, água, biofilme, rumem bovino, boca humana, intestino de cupim, entre outros, tendo-se como principal objetivo o isolamento de novas enzimas (Faoro, 2010).

No entanto, devido às limitações e dificuldade com a técnica de análise das bibliotecas metagenômicas, outras abordagens têm sido aplicadas, como o *screening* direto de genes biossintéticos específicos, através da amplificação do DNA com *primers* e construção de bibliotecas metagenômicas do gene biossintético, fornecendo informações sobre a biodiversidade metabólica em um determinado ambiente (Morimoto & Fuji, 2009).

JUSTIFICATIVA

A produtividade dos sistemas agrícolas depende de processos funcionais oriundos das comunidades microbianas no solo (DORAN & ZEISS, 2000). No entanto, poucos estudos relacionam a diversidade microbiana total com o funcionamento do solo. Nas últimas décadas, os campos nativos do planalto sul catarinense vêm sendo substituídos por culturas agrícolas mais rentáveis economicamente que a pecuária tradicional praticada há mais de um século. Nesse período de tempo, o campo nativo dos municípios de Lages e São Joaquim foi substituído por pomares de macieira, cuja forma de manejo do solo pode estar levando à degradação da biodiversidade microbiana destes, ocasionando a possível perda de micro-organismos. Muitos desses micro-organismos podem fazer parte da comunidade de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, algumas dessas responsáveis pela indução de resistência sistêmica a doenças nas plantas. O impacto da atividade antropogênica sobre a biodiversidade microbiana do solo não tem sido estudado.

Por outro lado, a metagenômica permite a identificação de genes de interesse, como os ligados à produção de enzimas, antibióticos e à indução de resistência das plantas ao ataque de fungos patogênicos. A grande vantagem dessa metodologia é a possibilidade de se encontrar regiões de DNA contendo todos os genes necessários à expressão de uma determinada característica, sem a necessidade do cultivo do micro-organismo, cujo genoma tal fragmento faz parte. Através da análise função-específica é possível a seleção do clone de interesse de um universo significativo de clones (normalmente da ordem de milhares), através da expressão do fenótipo desejado *in vitro*. Uma vez identificado o clone desejado, o sequenciamento do fragmento nele contido identificará os genes atuantes na expressão do fenótipo e definirá o mecanismo de ação. No caso do presente trabalho, o fenótipo desejado será aquele que demonstrar antagonismo ao crescimento de fungos patogênicos à macieira, sendo, por isso, um provável indutor de uma resposta sistêmica induzida nessa planta.

OBJETIVOS

Esse trabalho tem dois objetivos principais:

1) Avaliar a diversidade de bactérias cultiváveis do solo rizosférico e raízes de macieiras plantadas em diferentes sistemas de uso da terra no planalto sul de Santa Catarina e comparar com a comunidade bacteriana correspondente de uma área nunca utilizada para agricultura.

2) Selecionar clones metagenômicos que induzam resistência sistêmica em macieira contra o ataque de fungos patogênicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em relação ao primeiro objetivo:

1) Isolar e caracterizar, por métodos microbiológicos e moleculares, bactérias do solo rizoférico e de raízes de macieiras e de solo de campo nativo; diferenciar as linhagens isoladas por meio de PCR-RFLP do gene do rRNA 16S e agrupá-las de acordo com o padrão de bandas obtido;

2) Avaliar, dentre todos os isolados bacterianos, a presença de características promotoras de crescimento vegetal, tais como a produção de compostos indólicos, solubilização de fosfatos, capacidade de fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos *in vitro* e atividade antagonística contra fungo fitopatogênico;

3) Identificar, por amplificação e sequenciamento do gene do rRNA 16S, pelo menos dois isolados que pertençam a um mesmo agrupamento obtido pela técnica de PCR-RFLP e comparar as populações dos lugares analisados entre si;

4) Realizar experimentos de inoculação em mudas de macieiras livres de microorganismos (micropropagadas) e as diferentes linhagens isoladas em casa de vegetação, a fim de avaliar a promoção efetiva de crescimento das plantas e resistência ao fungo fitopatogênico.

Em relação ao segundo objetivo:

1) Construir bibliotecas metagenômicas em vetor fosmideal a partir de DNAs extraídos de solo rizosférico de macieiras cultivadas em pomares orgânico e convencional;

2) Selecionar clones das bibliotecas que demonstrem antagonismo ao desenvolvimento de fungos patogênicos à cultura da maçã;

3) Utilizar o(s) clone(s) selecionado(s) em experimentos de inoculação (com a bactéria hospedeira ou outra bactéria nativa da macieira) de mudas de macieiras micropropagadas e testar a resistência dessas plantas ao ataque de fungos patogênicos;

CAPÍTULO I:

Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against *Colletotrichum gloeosporioides*.

ACEITE DO ARTIGO PELA REVISTA:

Genetics and Molecular Biology

De: on behalf of+editor+gmb.org.br@manuscriptcentral.com
[mailto:onbehalfof+editor+gmb.org.br@manuscriptcentral.com]
Em nome de editor@gmb.org.br

Enviada em: terça-feira, 6 de maio de 2014 17:40

Para: lpassaglia@terra.com.br

Cc: editor@gmb.org.br

Assunto: Genetics and Molecular Biology - Decision on Manuscript ID GMB-2014-0062.R1

06-May-2014

Dear Dr. Passaglia:

Your manuscript entitled "Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against Colletotrichum gloeosporioides" submitted for publication in Genetics and Molecular Biology has been evaluated by the assigned Associate Editor who concluded that you have adequately addressed the concerns raised by the reviewers.

Therefore, I am pleased to inform you that your manuscript is now accepted for publication.

As a next step, your manuscript will be checked by one of our copy editors for correction of language errors and technical inconsistencies.

You will receive an edited manuscript by e-mail for appreciation and approval of eventual corrections before starting the layout process.

From now on, all correspondence will be directly with the Editorial Office by e-mail: editor@gmb.org.br. Please remember to refer to your Manuscript ID number whenever you contact us.

On behalf of the Editors of Genetics and Molecular Biology, I would like to take the opportunity to thank you for submitting your interesting contribution to our journal.

Sincerely,

Dr. Carlos Menck

Editor in Chief, Genetics and Molecular Biology editor@gmb.org.br

Editor's Comments to Author:

The manuscript was substantially improved with the modifications.

Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against *Colletotrichum gloeosporioides*.

João Frederico M. dos Passos^{1, 2, #}, Pedro B. da Costa^{1, #}, Murilo D. Costa², Gilmar R. Zaffari², Gilberto Nava², José Itamar Boneti², Andréia Mara R. de Oliveira³, Luciane M. P. Passaglia^{1, *}

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43312, CEP 91540-00, Porto Alegre, RS, Brazil

²Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI), Rua João José Godinho s/n, CEP 88502-970, Lages, SC. Brazil

³Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 90130-060, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author at Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, Prédio 43312, sala 207b, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brasil. Phone: 55 51 3308 9813; Fax 55 51 3308 9823. E-mail address: luciane.passaglia@ufrgs.br (L. M. P. Passaglia)

Co-author email addresses: joaopassos@epagri.sc.gov.br; pedro201@gmail.com; murilode@epagri.sc.gov.br; gzaffari@epagri.sc.gov.br; nava@epagri.sc.gov.br; boneti@epagri.sc.gov.br; andreia-oliveira@fepagro.rs.gov.br.

J. F. M. P. and P. B. C. contributed equally to this work and should both be considered the first author.

Running title: Bacteria isolated from apple trees

Abstract

This study evaluated the diversity of cultivable plant growth-promoting (PGP) bacteria associated with apple trees cultivated under different crop management systems and their antagonistic ability against *Colletotrichum gloeosporioides*. Samples of roots and rhizospheric soil from apple trees cultivated in organic and conventional orchards in southern Brazil were collected, together with soil samples from an area never used for agriculture (native field). Bacteria were identified at the genus level by PCR-RFLP and partial sequencing of the 16S rRNA, and were evaluated for some PGP abilities. The most abundant bacterial genera identified were *Enterobacter* (27.7%), *Pseudomonas* (18.7%), *Burkholderia* (13.7%), and *Rahnella* (12.3%). Sixty-nine isolates presented some antagonist activity against *C. gloeosporioides*. In a greenhouse experiment, five days after exposure to *C. gloeosporioides*, an average of 30% of the leaf area of plants inoculated with isolate 89 (identified as *Burkholderia* sp.) were infected, whereas 60 to 73% of the leaf area of untreated plants was affected by fungal attack. Our results allowed us to infer how anthropogenic activity is affecting the bacterial communities in soil associated with apple tree crop systems, and to obtain an isolate that was able to delay the emergence of an important disease for this culture.

Key words: plant growth-promoting bacteria; apple tree; antagonistic activity; *Colletotrichum gloeosporioides*

Introduction

Apples are one of the most important cropped and consumed fruits in the world. According to Brown (2012), apples are the most produced temperate tree crop, and they are widely grown throughout almost the entire temperate climate region in the Northern and Southern hemispheres. Recently, apple cropping has been expanding into subtropical and tropical zones (Karakurt and Aslantas, 2010). To achieve intensive fruit production, which requires very high productivity and fruit quality, large agricultural inputs are required. However, the excessive use of fertilizers, in addition to increasing production costs, leads to an increase in environmental pollution. The use of more sustainable technologies, such as biofertilization, is inevitable for the mitigation of environmental damage (Karakurt and Aslantas, 2010; Rodriguez and Fraga, 1999; Vessey, 2003).

Interactions between the soil bacteria, the so called rhizobacteria, present in rhizospheric soils and the roots of plants have been studied intensively (van Loon, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 1996, 1998, 2001; Gozzo, 2003; Kürkcüoğlu *et al.*, 2007, Beneduzi *et al.*, 2008; Ambrosini *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2013). Rhizobacteria are soil bacteria that colonize plant roots; they are able to multiply and occupy all the ecological niches found on the roots at all stages of plant growth (Antoun and Prévost, 2006). Such bacteria may negatively interact with plants, directly by competing for nutrients. Alternatively, the relationship between rhizobacteria and the host plant can be positive. For example, the bacteria may compete with pathogens for survival in the rhizosphere or they may promote mutualistic relationships with plants they were associated, allowing nutrient exchange and stimulating antibiotic production against phytopathogenic agents (Siddiki, 2006; Conrath *et al.*, 2002). Root-colonizing plant-beneficial bacteria are commonly referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR, Glick, 2005).

Bitter rot and leaf spot are common apple diseases that occur in countries where apple production has increased in recent years, especially in regions where the incidence of rainfall is high. They are major diseases of apple trees and are associated with yield losses up to 50% (González *et al.*, 2006). Under favorable conditions, for example, leaf spot disease can cause 75% defoliation and also weaken the trees (Bogo *et al.*, 2012). Three fungi, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, and *Glomerella cingulata*, have been identified as the causal agents of these diseases (González *et al.*, 2006). However, according to Bernstein *et al.* (1995), *C. gloeosporioides* and *G. cingulata* are the asexual and sexual stages of the same fungus, respectively, and the asexual isolates

of this fungus (*C. gloeosporioides*) are the causal agent of leaf spot disease on apple trees.

Because little is known about the interactions between beneficial microorganisms and their host plants that may induce systemic resistance against phytopathogenic fungi (Kürkcüoğlu *et al.*, 2007) and how soil management affects the occurrence and distribution of the plant growth-promoting (PGP) bacteria that infect apple trees, the objectives of this study were (1) to assess the diversity of cultivable PGPR isolated from rhizospheric soil and the roots of apple trees cultivated under different crop management systems, (2) to compare these bacterial communities with a bacterial community isolated from an area never used for agriculture, (3) to evaluate several PGP activities of the bacterial isolates, (4) to evaluate the effect of soil management on the occurrence and activity of each PGP trait, (5) to select microbial strains with the potential to stimulate plant growth and confer some resistance against *C. gloeosporioides*, and (6) to test their PGP characteristics and their ability to induce resistance against *C. gloeosporioides* in a greenhouse assay using apple trees. The results of these studies allowed us to infer how anthropogenic activity affects the soil bacterial communities associated with apple tree crop systems and to obtain an isolate that is able to delay the emergence of an important disease for this cultivar.

Material and methods

Sampling and sample preparation

The following study sites were selected on the basis of their differences in soil management: Organic Orchard (OO), Conventional Orchard (CO), and Native Field (NF). The sites were situated in the locality of São Joaquim (28°17'36"S, 49°56'1"W), Santa Catarina State, at an altitude of 1,360 m above sea level. The climate of the region is humid mesothermic (Cfb) according to the Köppen classification. Higher precipitation occurs from October to March and during this period, the average monthly rainfall is around 166 mm.

In the OO installation the soil acidity was adjusted to raise the pH to 6.0 using 50% of calcitic and 50% of dolomitic limestones. Rock phosphate and wood ashes (that contain 1.9 g kg⁻¹ of N, 0.51 g kg⁻¹ of P, 1.7 g kg⁻¹ of K, 0.6 g kg⁻¹ of Ca, and 0.6 g kg⁻¹ of Mg) were applied before liming for correcting the levels of P and K, respectively. Before the plants start to produce (in growth fertilization) poultry litter (containing 21 g kg⁻¹ of N, 12 g kg⁻¹ of P, 21 g kg⁻¹ of K, 38 g kg⁻¹, and 9 g kg⁻¹ of Mg) was applied on the soil surface. Fifteen tons ha⁻¹ of wood ashes plus 3.5 tons ha⁻¹ of poultry litter were

applied in the OO installation. When production started only poultry litter (2 tons ha⁻¹ year⁻¹) was used as maintenance fertilization.

In the CO installation the soil acidity was adjusted to raise the pH to 6.5 using 50% of calcitic and 50% of dolomitic limestones. Levels of P, K, B, and Zn were corrected before seedlings planting. Phosphorus was added as triple superphosphate (700 kg ha⁻¹ of P₂O₅) and lime to correct soil P levels; potassium was added as potassium chloride (300 kg ha⁻¹ of K₂O); boron was added as borax (40 kg ha⁻¹); and zinc was added as zinc sulphate (15 kg ha⁻¹). Until the plants start to produce (growth fertilization) only nitrogen (as urea) was applied as nitrogen supply. When the plants start to produce (maintenance fertilization) nitrogen (as urea) was applied in amounts ranging from 40 to 80 kg ha⁻¹ ano⁻¹, according to orchard age; 1.5 kg of potassium per ton of apple produced (as potassium chloride) was also added in this period. In addition, annually were performed eight foliar calcium sprays every two weeks as calcium chloride (0.4%) and one boron spray as boric acid (0.2%), during full bloom time.

From the OO and CO sites, 12 apple trees (*Malus domestica* Borkhausen, Gala variety grafted over rootstock of Marubakaido variety) at least 2 m apart from each other were randomly selected and rhizospheric soil and root samples of each tree were collected. Sub-samples (500 g each) of rhizospheric soils from each tree were mixed to obtain a composite sample and were analyzed for clay, P, K, organic matter (OM), exchangeable Al, Ca, and Mg contents, and pH values using standard methods (Sparks *et al.*, 1996; Table 1). At the NF sites, 500 g of 12 random soil samples down to a depth of 15 cm were collected, mixed and analyzed. The samples were collected on April 5th, 2011, when each tree was 11 years old. In both orchards and in the native field the cover crop was composed mainly by native grasses.

Bacterial isolation

To isolate root-associated bacteria, apple root samples were first sterilized by surface disinfection by washing the roots in running tap water, followed by a 70% ethanol wash for 1 min, a sodium hypochlorite solution (4%) wash for 2 min, and five serial rinses in sterilized distilled water. After disinfection, 10 g of roots from each sampling site was sliced with a sterile scalpel and placed into 250 ml Erlenmeyer flasks containing 90 ml of sterile saline solution (0.85% NaCl).

Soil (for NF site) or rhizospheric soil (for OO and CO sites) bacteria were isolated from 10 g of soil from each sample which were placed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 90 ml of sterile saline solution. The soils and the sliced root samples

were incubated at 4°C with agitation (125 rpm) for 4-6 h. Triplicate aliquots of 0.1 ml of three-fold serial dilutions were inoculated into vials containing 4 ml of semi-solid N-free medium (NFb, LGI or LGI-P) according to the procedures recommended by Döbereiner *et al.* (1998). After seven days of incubation at 28°C, vials showing a veil-like pellicle near the surface of the medium were used to inoculate fresh vials containing the same semi-solid N-free medium previously utilized. The cultures from the veil-like pellicles were further purified by streaking them onto specific agar plates containing 20 mg l⁻¹ of yeast extract and incubating them at 28°C for 3 days. Immediately after incubation, one colony from each plate was randomly selected and grown in liquid Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook and Russel, 2001) at 28°C with agitation (125 rpm). From the OO and CO sampled sites, 60 colonies of root-associated bacteria and 60 colonies of rhizospheric soil bacteria were isolated. From the NF sampled site 60 colonies of soil bacteria were isolated. All bacterial isolates were randomly selected from the plates. These bacterial isolates (300 in total) were individually analyzed by Gram-staining and immediately stored in sterile glycerol solution (40%) at -20°C.

Extraction of bacterial DNA, PCR amplification, RFLP analysis and partial sequencing of the bacterial 16S rRNA gene

To extract DNA, 2 ml of each bacterial culture was grown in LB medium, after which the cultures were centrifuged for 5 min at 12,000 x g. The bacterial pellet was rinsed with 700 µl of TES buffer (10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA, 150 mM NaCl), re-centrifuged and suspended in 500 µl of TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA). Cells were lysed at 37°C with 20 mg ml⁻¹ lysozyme, 4% sodium dodecyl sulfate and 20 mg ml⁻¹ proteinase K. The samples were homogenized for 30 s and incubated at 56°C for 15 min. To precipitate cellular waste, 600 µl of ammonium acetate (8 M pH 8.0) was added, and the samples were kept on ice for 30 min and subsequently centrifuged for 20 min at 12,000 x g. Phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation were performed as described by Sambrook and Russel (2001). The quality and integrity of the DNA were determined by electrophoresis in 0.8% agarose gels containing ethidium bromide and visualized by UV light.

Partial sequences of the 16S rRNA gene (roughly 450 bp) from each isolate were amplified using the primers U968 (AACGCGAAGAACCTTAC) and L1401 (CGGTGTGTACAAGACCC) (Felske *et al.*, 1997), which cover the region between nucleotides 968 and 1401 of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene. Extracted DNA (50 ng) was used as a template in 25 µl reactions containing 20 µM of each deoxynucleoside

triphosphate, 0.3 μ M of each primer, 2 mM MgCl₂ and 2 U of Taq polymerase (Invitrogen®) in 1X Taq buffer. The reactions were performed using the PCR Express Temperature Cycling System (Thermo Hybrid) under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 30 cycles at 94°C for 45 s, 52°C for 45 s, 72°C for 45 s and one cycle at 72°C for 10 min for final elongation. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under UV light.

Aliquots (5 μ l) of each PCR product were directly used for restriction enzyme cleavage (HaeIII and MspI) and incubated at 37°C for 16 h to ensure the complete digestion of the PCR product. RFLP analysis was performed by electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel stained with silver nitrate (Sambrook and Russel, 2001). The gels were run for 3 h at 200 V in 1 X Tris-borate-EDTA buffer and stained for 30 min in silver nitrate. This procedure was repeated at least twice for each sample to verify the consistency of the patterns. The complete restriction profiles obtained after restriction enzyme cleavage were used to distinguish each isolate. The RFLP banding profile was transformed into a two-dimensional binary matrix, where 1 was assigned for the presence and 0 for the absence of a band. The data were subjected to diversity analysis using the PAST software (Hammer *et al.*, 2001; available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) and by the UPGMA algorithm and Jaccard coefficient. One dendrogram showing the genetic relationships among the isolates was constructed for each sampling site studied. One representative bacteria belonging to each cluster obtained with the 16S rDNA-PCR-RFLP was chosen for partial sequencing of the 16S rRNA gene. Sequencing was performed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems) in the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, Brazil) using forward and reverse primers, as described by the manufacturer. Sequence analyses were performed with BioEdit version 7.0.9.0 software (Hall, 1999) in order to verify their quality and to check for possible chimeric origins. DNA sequences (approximately 450 bp) were compared with sequences from EzTaxon Server version 2.1 (Chun *et al.*, 2007; available on <http://www.eztaxon.org/>) and GenBank database using BLASTN software (Altshul *et al.*, 1997; available on <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The nucleotide sequences of the 105 partial 16S rRNA gene segments determined in this study have been deposited in GenBank (accession numbers KF447963 to KF448068).

Diversity index calculation and analysis

The diversity index (H' ; Shannon and Weaver, 1949) was estimated based on dendrograms for each sampled site by counting the number of clusters at the 70% similarity level and the number of taxa within each cluster (Borges *et al.*, 2003; Kaschuk *et al.*, 2006). Principal component analysis (PCA) was used to verify correlations between soil properties and the bacterial diversity index (Rico *et al.*, 2004). The variables were normalized by division by their standard deviation, and the eigenvalues and eigenvectors of the correlation matrix were calculated, as well as the percentages of variance for each component. H' and PCA were computed using PAST software (Hammer *et al.*, 2001).

Evaluation of the characteristics that promote plant growth

The PGP capacity of the bacterial isolates was evaluated by *in vitro* tests. Bacterial suspensions ($10 \mu\text{l}$ of 10^8 CFU ml^{-1}) of each isolate grown in LB medium at 28°C with agitation (125 rpm) for 48 h were used as inocula for the PGP experiments. The production of indolic compounds (ICs) and siderophores and the ability to solubilize tricalcium phosphate were evaluated for all (300) bacterial isolates and were determined as described by Ambrosini *et al.* (2012). For each assay the distance (in mm) from the colony until the end of the halo was recorded with the aid of a digital fixed ruler (each plate was photographed with a digital camera). This measurement allowed us to infer how strong each isolate displayed each of the PGP ability evaluated.

The nitrogen-fixing ability of the five bacterial isolates selected for *in vivo* experiments was tested using the acetylene reduction assay (ARA) as described by Boddey (1987) and Ambrosini *et al.* (2012).

Antagonist effect against *C. gloeosporioides*

All bacterial isolates (300) were evaluated for their antagonistic activity against *C. gloeosporioides*. The fungal strain utilized was SJ197 that was isolated from apple trees (Gala variety) and was obtained from Epagri (São Joaquim Experimental Station, SC, Brazil). The assay was conducted in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA; Fiddaman and Rossall, 1993) medium. Each plate received in its center a small disc of culture medium containing the fungal mycelium previously grown in PDA plates in an environmental chamber at 28°C for 7 days. Four isolates were also inoculated into four sectors of the plate with the aid of a platinum loop. Each isolate was tested in triplicate. The antagonistic activities of the bacterial isolates were evaluated after 7 days

of incubation at 28°C. Bacterial strains were classified based on their abilities to suppress fungal growth: Level 0: the mycelium grew over the bacterial colony; Level 1: the mycelium grew up to the bacterial colony; Level 2: the distance between the mycelium and the bacterial colony was from 0 to 10 mm; and Level 3: the distance between the mycelium and the bacterial colony was larger than 10 mm.

Greenhouse experiment on plant growth-promotion and antagonistic activity against *C. gloeosporioides* by native PGPB isolates

A greenhouse experiment was carried out using grafted apple seedlings. The grafting was performed as conducted by apple growers in the region of São Joaquim and consisted of seedlings of the apple Gala variety grafted over rootstock seedlings of a one-year old apple Marubakaido variety. After six months of growth in a greenhouse, the shoot lengths of the seedlings were approximately 50 cm. Grafted seedlings were then transferred to 1.7 l pots filled with non-sterile soil as a substrate. The soil was composed of a mix of an Inceptisol soil, a Nitosol soil and 1/15 composted poultry litter. Grafted seedlings were fertilized with half of the recommended dose of NPK for apple cultivation one month before the beginning of the experiment. All plants were watered to capacity without soaking the substrate every 2 days, keeping the soil moist. Five bacterial isolates were chosen for investigating PGP abilities: 75 (*Burkholderia* sp.), 89 (*Burkholderia* sp.), 108 (*Pseudomonas* sp.), 187 (*Burkholderia* sp.), and 208 (*Burkholderia* sp.). The bacterial isolates were grown in LB medium with agitation (125 rpm) for 48 h at 28°C. Pure bacterial cultures were centrifuged and diluted to a final concentration of 10^8 CFU ml⁻¹ in sterile saline solution. Apple seedlings were directly inoculated on the roots with 5 ml aliquots of the bacterial suspensions. An extra bacterial inoculation was performed for those plants that received the fungal inoculums in the same day of fungal spraying. Fungal inoculums (*C. gloeosporioides* strain SJ197) were previously prepared in PD liquid medium in an environmental chamber at 28°C for 7 days and were diluted to a concentration of 10^6 conidia ml⁻¹. The leaves of the plants were sprayed with a fungal culture and left in a moist chamber for 48 h at 28°C. After this period, the infected plants were placed in the greenhouse with the plants that had not received the fungus, and all pots were distributed in a completely randomized design distant at least 30 cm from each other to avoid fungal or bacterial contamination. The experiment had one plant per pot and consisted of the following treatments: (1) plant without inoculation of bacterial isolate and without inoculation of the fungus (control); (2) plant inoculated with a bacterial isolate and without the inoculation of

fungus; (3) plant inoculated with a bacterial isolate plus inoculation with fungus; and (4) plant without the inoculation of a bacterial isolate and inoculated with fungus. The experiment consisted of seven replicates per treatment. The plants were irrigated every 2 days with running water without micro- or macronutrients. The experiment was maintained for 30 days, after which several parameters were evaluated. The plants were harvested and length data were recorded. Shoots and roots were dried at 65°C to constant weight to evaluate dry matter. All shoot dry matter from each treatment was combined for elemental analysis. Shoot nutrient content was determined by the Kjeldahl method (detection limit 0.01%) for N and nitric-perchloric wet digestion/ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry; detection limit 0.01%) for P and K. The nutrient content of the plants was estimated for each treatment by the uptake per gram of plant tissue multiplied by total yield per treatment [(yield) X (percent nutrient per gram of plant tissue)] (Adesemoye and Kloepper, 2009).

Incidence and severity of fungal symptoms were evaluated in eight leaves per tree, totaling 56 leaves for each treatment, in the second and sixth days after fungal spraying. The incidence and severity were quantified by a specific diagrammatic scale (Kowata *et al.*, 2010). The data were used to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC) by trapezoidal integration value of incidence and severity (Campbell and Madden, 1990).

Statistical analysis

The occurrence of PGP traits and genera in the different soil management conditions was tested by Chi-Square exact p value and adjusted residual analysis. The phenotype of PGP traits (halo sizes and ICs production) between isolates from different soil types and genera was compared with one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test, after logarithmic transformation. Comparisons between rhizospheric and root-associated bacteria of the main genera in different soil management conditions were performed with factorial two-way ANOVA, except for phosphate solubilization, where we used a Student's Test since only strains belonging to *Rhanella* genus presented phosphate solubilization activity on both niches. Student's Test was also used to individually compare the phenotype of PGP traits from rhizospheric and root-associated bacteria of the different orchards. A correlation between siderophores production and antagonism was verified with Pearson's test.

Data from greenhouse growth experiment were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's HSD test. Greenhouse biocontrol experiment was evaluated with a unilateral Student's Test with log transformation, comparing to control.

All statistical assumptions for ANOVA, Student's and Pearson's tests were verified, using log transformation or Student's test for unequal variances when needed. Due to violation of assumptions in ICs comparison among the most important genera, we performed a Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney pair-wise comparisons with the Bonferroni correction. Differences were considered significant if $p < 0.05$. Statistical analyses were undertaken using IBM SPSS Statistics version 19 (SPSS, 2010) and Past Version 2.09.

Results

Isolation, identification, and diversity of putative diazotrophic roots and rhizospheric bacteria

A total of 300 bacterial strains were selectively isolated from the rhizospheric soil or roots of apple trees or from soil of a native field based on their growth in one of three semi-selective semi-solid media without nitrogen; i.e., NFb, LGI or LGI-P. These N-free media were used as part of a strategy to select putative nitrogen-fixing and plant growth-promoting bacteria. Root, rhizospheric and soil bacteria belonging to different species were discriminated by PCR-RFLP of the 16S rRNA gene using two restriction enzymes, HaeIII and MspI. The RFLP patterns were used to construct a dendrogram for each site (Figure S1), and a representative strain from each cluster was chosen for the 16S rRNA partial gene sequence analysis. The community composition according the occurrence of each bacterial genus in each condition is shown in Figure 1.

Twenty-seven different bacterial genera were identified. While bacteria from the *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Burkholderia* genera were present in all sampling sites, the proportions were strikingly different (Fig. 1). Strains belonging to *Enterobacter* and *Burkholderia* were overrepresented in NF, while strains belonging to the *Pseudomonas* genus were more abundant in the CO condition. The OO condition was marked with a very low occurrence of *Burkholderia* strains. Bacteria belonging to *Cedecia*, *Leclercia* and *Stenotrophomonas* occurred at both orchards, with the first two genera associated with CO and the latter associated with OO. The other two abundant bacterial genera identified were *Ewingella* and *Rahnella*, which were clearly associated with CO and OO, respectively. These eight genera – which accounted for approximately 30% of the

total taxonomical diversity - contained 85% of the isolates, suggesting that they dominate the soil population in the analyzed conditions.

Principal coordinate analysis (PCA) was used to investigate the relationship between bacterial diversity (H') and abiotic soil parameters (Fig. 2). Principal component (PC) 1 accounted for 62.19 % of the total variation and separated exchangeable Al and clay, on the left side, from all other variables. PC2 represented 37.81 % of the total variation and separated P, pH, H' , OMC and exchangeable Al from the other variables on the upper side of the plot. This analysis shows that the soil clay content was more closely related to CO, while exchangeable Al was more closely related to NF; the other variables (including OMC) were more related to OO. The bacterial diversity index of CO was higher ($H'= 2.04$) than for OO ($H'= 1.98$) and NF ($H'=1.55$).

PGP traits of bacterial isolates

Table 2 shows the occurrence of PGP traits of each sampling site by niche. Fig. 3 shows the effect of soil management on the occurrence and activity of each PGP traits by sampling site.

To study the effects of soil management on PGP traits, we evaluated the occurrence of the traits per condition using chi-square, and then evaluated the phenotype of positive isolates with ANOVA-Tukey. According to our results, OO condition stimulated the occurrence of siderophore producers (Table 2), but their halo sizes were smaller than in the other conditions. This system was also associated with a sharp increase of good indolic compounds producers (Fig. 3). CO condition was associated with a decrease in the number of siderophore producers but an increase in the number of phosphate solubilizers and ICs producers. CO condition also showed a higher number of phosphate solubilizers with bigger halo sizes; in this system the halo size displayed by the isolates for the antagonism assay was smaller than the isolates from NF. The NF condition presented a reduced number of phosphate solubilizers and ICs producers, but the isolates from NF condition presented the largest halo sizes for siderophore production and antagonism assays.

We also carried out several comparisons between rhizospheric soil and root-associated isolates with the same statistical approach. We found that only the phosphate solubilization ability was different between rhizospheric soil and root-associated isolates from OO and CO conditions, at both occurrence and expression. There were more phosphate solubilizers on CO soils than on CO root tissues, and the halo sizes

displayed by phosphate solubilizers isolated from OO soils were larger than those from OO root tissues (Figure S2).

With the most abundant genera in the community identified (Fig. 1), we compared their specific PGP traits. Fig. 4 shows the PGP traits of the eight most abundant genera found in both rhizospheric soil and root samples. All PGP traits were different among the main genera, and no single genera presented high scores for all PGP traits evaluated. Strains belonging to *Burkholderia* sp. presented the best results for siderophores production, antagonistic action against the fungus *C. gloeosporioides* and phosphate solubilization ability. Production of indolic compounds was higher in strains belonging to the *Rahnella* and *Enterobacter* genera.

We also analyzed interaction effects between the PGP traits of ubiquitous bacteria and soil management. There were no significant interaction effects, suggesting that soil management did not significantly change the PGP traits of strains belonging to *Burkholderia*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* genera (data not shown). Finally, we compared root-associated and rhizospheric soil isolates of the same genera and observed that strains belonging to the *Rahnella* genus had a significant niche effect on phosphate solubilization ability, with the largest halo sizes found in the isolates from rhizospheric soil samples (Figure S3A). Strains belonging to the *Burkholderia* genus also seem to have a niche effect on siderophores production ability, with the largest halo sizes identified in the isolates from rhizospheric soil samples (Figure S3B).

Based on their taxonomic identification and their PGP traits (non-pathogenic bacterium, high antagonistic activity against pathogenic fungus, and presence of some PGP traits), five isolates were selected for inoculating apple tree seedlings in a greenhouse experiment. The isolates chosen were 75, 89, 108, 187, and 208. Their identifications and PGP abilities are shown in Table 3. The selected isolates were all able to produce siderophores, but only one of them was a tricalcium phosphate solubilizer (isolate 208). Nevertheless, the isolates were also chosen according to their high antagonistic activity against *C. gloeosporioides* and their ability to fix nitrogen.

Plant assay

The inoculation of apple seedlings with the five isolates did not result in significant effects on the length, shoot and root dry matter, which is most likely due to the short period of evaluation (Table S1). However, the inoculation of apple seedlings with isolates 75 and 208 resulted in different effects on phosphorus (P) uptake of the plants compared to control plants (Table 4).

When apple seedlings were submitted to bacterial plus fungal inoculation, no significant effects were observed on the length, shoot and root dry matter (Table S1). Analysis of the uptake of nitrogen (N), P and K by the treated apple seedlings revealed that the uptake of P (Table 5) in plants inoculated with isolate 208 corroborated the results obtained with this isolate when plants were submitted to bacterial inoculation without fungi.

To evaluate the potential of the five bacterial isolates to induce systemic resistance against the phytopathogenic fungus, apple seedlings were also analyzed according disease development after fungal inoculation. Five days after fungal spraying, the percentage of necrotic leaf area was evaluated for each plant inoculated with bacterial isolates and *C. gloeosporioides* conidia. The plants inoculated with isolate 89 (*Burkholderia* sp.) had a significant lower AUDPC (86 ± 13) than control (154 ± 30) (Fig. 5). This result indicates that isolate 89 conferred some resistance to leaf spot disease in apple seedlings, slowing its progression. This isolate could be of high agronomic potential because it would give to the producer time to remove branches with leaves affected by fungal attack, or even to scarify the entire tree, preventing the disease spreading to other plants.

Discussion

According to Farina *et al.* (2012), the distribution of bacteria in the rhizospheric soil and roots of plants are influenced by many factors, including the host plant, the stage of plant growth and cropping practices (such as tillage and crop rotation). Plant breeding programs are oriented to select plants with resistance to disease and efficient nutrient assimilation to retain productivity, while improving quality and safety by reducing pesticide and fertilizer inputs (Bosco *et al.*, 2006). The resistance of plants to root diseases as well as efficient nutrient assimilation is profoundly influenced by the presence and activity of beneficial microorganisms in the soil. However, plant breeding programs and a low input of organic fertilizers take longer to demonstrate effectiveness because this strategy depends on the capacity of plants to interact with their own rhizospheric microflora (Picard *et al.*, 2005).

In this study, cultivable bacteria associated with rhizospheric soil and roots of apple trees (*M. domestica* Borkhausen) cultivated under different soil management systems were isolated based on their growth on three selective semi-solid media without nitrogen. The 300 bacterial isolates identified were used to verify whether possible changes in the microbial communities were associated with different apple orchard

management systems compared to a native field. Twenty-seven different bacterial genera were identified. To date, few studies have been conducted to study the bacterial diversity associated with the rhizosphere of apple trees. St. Laurent *et al.* (2008) showed that the composition of the bacterial community of the apple tree rhizosphere was not dominated by any particular group of bacteria. In our work, no dominant group of bacteria was identified, although some genera were more abundant. Strains belonging to *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Cedecia*, *Leclercia*, *Stenotrophomonas*, *Rhanella* and *Ewingella* genera were the most abundant among all the bacterial genera identified in all the sampling sites, representing 84.31% of the total isolates identified. Isolates belonging to *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Burkholderia* genera were present in all soil conditions, representing 43.67% of the total bacterial isolates. Bacteria belonging to these three genera and displaying some PGP ability have been isolated from the rhizosphere of apple trees in previous studies (Karakurt and Aslantas, 2010). Our results indicated that bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family were the most abundant in association with the roots of apple trees. Strains belonging to the Enterobacteriaceae family have also been found to be associated with a large number of plant species, such as citrus (Araújo *et al.*, 2001), maize (Hinton and Bacon, 1995; McInroy and Kloepper, 1995), rice (Engelhard *et al.*, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2001; Rosenblueth *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2004), sweet potato (Asis and Adachi, 2003; Reiter *et al.*, 2003), soybean (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004), and wheat (Iniguez *et al.*, 2005).

Microorganisms can contribute to the nutrition of plants through a number of mechanisms, including direct effects on the availability of nutrients or plant growth-promoting substances, which are synthesized by the bacterium, or by facilitating the absorption of certain nutrients from the environment. Soil microorganisms may affect the growth of plants using any one or more of these mechanisms (Ahmad *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2012). In the present study, 214 isolates (71.33%) were able to produce siderophores. Similar numbers of siderophore-producing bacteria have been documented by other studies (Adesina *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2009). Ambrosini *et al.* (2012) evaluated the diversity of cultivable siderophore-producing bacteria in association with the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere and found that 78.26% of the 299 isolates examined produced siderophores in Fe-limited media. The results obtained in the present work could be associated to the fact that in the soil of the conventional orchard there are low amount of available nutrients and organic matter resulting in a less favorable environment to the growth of many plants and for many

species of microorganisms. This situation could favor the selection of microorganisms more adapted to this limiting condition, such as, for example, those able to produce siderophores, which bind to the available form of iron (Fe^{3+}) in the rhizosphere, thus making it unavailable to the phytopathogens and protecting plant health. On the other hand, only 36 (12%) of the isolates analyzed in this work were able to solubilize tricalcium phosphate. Similarly low numbers of phosphate-solubilizing bacteria have been documented by Beneduzi *et al.* (2008), who studied PGPR associated with rice, and Ambrosini *et al.* (2012), who studied sunflowers. Those authors found that only 7.43% and 19.73%, respectively, of all PGPR characterized presented this ability.

Another important feature that can influence plant growth is the production of indolic compounds (phytohormones). These compounds stimulate root growth and increase root length, resulting in a larger root surface area that enables the plant to access more nutrients from the soil (Karakurt and Aslantas, 2010; Souza *et al.*, 2013). Almost all of the isolates in this study (94.33%) displayed the ability to produce indolic compounds at some level. Similar data were also reported by Farina *et al.* (2012) and Souza *et al.* (2013), who reported that 98% and 97.95% of PGPR isolated from canola and rice, respectively, displayed this ability. In the present work, the soil derived from the organic orchard contained the largest number of isolates producing high levels of indolic compounds. This result suggests that soils with a relatively high amount of organic matter (8.8%) favored the occurrence of microorganisms that promote plant growth through the production of phytohormones. On the other hand, in the soil derived from the conventional orchard, where the organic matter content (3.8%) and the amount of soluble phosphorus (8.9 mg d^{-3}) were lower than in the soil derived from the organic orchard, an increased halo size for phosphate solubilization was noted. This observation suggests that in this situation of low concentration of organic matter and low amount of soluble phosphorus in soil, bacteria able to solubilize phosphates may contribute to a better adaptation of the host plant to the environment. For the soil obtained from the native field, which contained a lower amount of nutrients such as Ca, P, K, and Mg, and a higher concentration of Al, more bacterial isolates with the greatest ability to produce siderophores and that more efficiently produce antagonistic substances against the fungus *C. gloeosporioides* were present. This result suggests that in this environmental condition, there is a strong competition for metal nutrients between the microbial species and that some of them are able to produce molecules with antagonistic action against the growth of other microorganisms. Alternatively, the siderophores in this sampling site could be acting on Al toxicity alleviation. The effect of the relief of Al

toxicity and increased productivity was observed in cowpea using *Streptomyces* sp. (Dimkpa *et al.*, 2009).

Although no significant effect was observed in the growth of apple seedlings with the five selected isolates, the plants inoculated with isolate 208 had higher levels of phosphorus uptake either in the absence or in the presence of fungal inoculation. Isolate 208 was identified as *Burkholderia* sp. and it was the only isolate that displayed the ability to solubilize tricalcium phosphate in the *in vitro* assay. Many studies have shown that bacterial inoculation can increase the availability of insoluble nutrients (Cole *et al.*, 1978). Freitas *et al.* (1997), for example, showed that canola plants inoculated with phosphate-solubilizing bacteria had significantly enhanced growth when fertilized with rock phosphate. Similar effects were observed in maize (Laheuerte and Bertellin, 1988), sugarcane (Sundara *et al.*, 2002) and barley (Belimov *et al.*, 1995). Sixty-nine (23%) of the 300 bacterial strains isolated in this work had antagonistic activity against *C. gloeosporioides*, the pathogen responsible for apple leaf spot disease. In the *in vivo* assay, plants inoculated with isolate 89 (also identified as another strains belonging to the *Burkholderia* genus.) had a delayed appearance of disease symptoms. Ramamoorthy *et al.* (2001) showed that some PGPR induce systemic resistance by strengthening the physical and mechanical strength of the cell wall, as well as altering the biochemical and physiological reaction of the host plant that leads to the synthesis of chemical defense against the pathogen. Moreover, it is well documented in the literature that *Burkholderia* species are able to synthesize a remarkable array of metabolites, including siderophores, antibiotics, and phytohormones (Vial *et al.*, 2007), and many strains belonging to this genus exhibit activities involved in bioremediation or biological control *in vitro* (Caballero-Mellado *et al.*, 2007). Strains belonging to this genus are also known for the ability to improve plant growth, for example in maize (Ciccillo *et al.*, 2002), onion (Sessitsch *et al.*, 2005), rice (Ait Barka *et al.*, 2006), tomato (Caballero-Mellado *et al.*, 2007) and sunflower (Ambrosini *et al.*, 2012). Some of these features may explain the observed antifungal behavior of the strain of *Burkholderia* isolated in the present work (isolate 89) both in *in vitro* and *in vivo* tests. It will be important to identify isolate 89 at species level and determine which substance is produced by this isolate that inhibits fungal growth to improve its biotechnological potential.

Conclusion

The results presented here suggest the presence of a diverse population of plant growth-promoting bacteria associated with apple trees. Whenever a genus was present

in more than one management type, it was also significantly associated with one of the soil management types. This observation suggests that the “core” microbial community from these conditions is plastic, either able to adapt to particular differences within the analyzed soils or is easily manipulated by the host plants. We also described which PGP trait could shift according to soil management type, niche and bacterial genera. This suggests that the phenotype of parts of the PGPR community may change according to micro and macro environmental conditions at different scales. One isolate (89, identified as *Burkholderia* sp.) proved to be very efficient in the induction of resistance of apple trees against the effects of the plant pathogenic fungus *C. gloeosporioides*, delaying the appearance of disease symptoms. This strain could be useful in the formulation of new inoculants, improving the cropping systems into which it can be most profitably applied.

Acknowledgments

This work was financed by a grant and fellowship from Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/Brazil) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Fixação Biológica do Nitrogênio (INCT-FBN/Brazil).

References

- Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A and Smalla K (2007) Screening of bacterial isolates from various European soils for *in vitro* antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: Site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biol Biochem* 39:2818–2828.
- Adesemoye AO and Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1–12.
- Ahmad F, Ahmad I and Khan MS (2006) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181.
- Ait Barka E, Nowak J and Clement C (2006) Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 72:7246–7252.
- Altschul SF, Madden TL, Schaeffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Ac Res* 25:3389-3402.

- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK and Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356:245-264.
- Antoun H and Prévost, D. (2006) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, in: Siddiqui, ZA (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, The Netherlands, pp.1-38.
- Araujo WL, Maccheroni WJr, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PAV, Saridakis HO and Azevedo JL (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can J Microbiol* 47:229–236.
- Asis CA and Adachi K (2003) Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Lett Appl Microbiol* 38:19–23.
- Belimov AA, Kojemiakov AP and Chuvarliyev CV (1995) Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil* 173:29-37.
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP (2008) 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.
- Bernstein B, Zehr EI and Dean RA (1995) Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and others hosts. *Plant Dis* 79:478-482.
- Boddey RM (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Crit Rev Plant Sci* 6:209–266.
- Bogo A, Casa RT, Rufato L and Gonçalves MJ (2012) The effect of hail protection nets on Glomerella leaf spot in ‘royal Gala’ apple. *Crop Protection* 31:40-44.
- Borges LGA, Dalla Vechia V and Corção G (2003) Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiol Ecol* 45:173-180.
- Bosco M, Baruffa E and Picard C (2006) Organic breeding should select for plant genotypes able to efficiently exploit indigenous probiotic rhizobacteria. *Proc Eur Joint Org Cong* pp. 376-377.
- Brown S (2012) Apple: In Badenes ML and Byrne DH (eds.), *Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding*, Springer Science Business Media.
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P and Martínez-Aguilar L (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing

- Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 73:5308–5319.
- Campbell CL and Madden LV (1990) *Introduction to Plant Disease Epidemiology*, First ed. Wiley, New York. 532 p.
- Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK and Lim YW (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259-2261.
- Ciccillo F, Fiore A, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S and Chiarini L (2002) Effect of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacteria diversity. *Environ Microbiol* 4:238–245.
- Cole CV, Elliott ET, Hunt HW and Coleman DC (1978) Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. V. Phosphorus transformations. *Micr Ecol* 4:381-387.
- Conrath U, Pieterse CMJ and Mauch-Mani B (2002) Priming in plant–pathogen interactions. *Trend Plant Sci* 7:210–216.
- Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Büchel G and Kothe E (2009) Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol Biochem* 41:154–162.
- Döbereiner J (1988) Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110, 207–212.
- Engelhard, M., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ Microbiol* 2:131–141.
- Farina R, Beneduzi A, Ambrosini A, Campos SB, Lisboa BB, Wendisch V, Vargas LK and Passaglia LMP (2012) Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Appl Soil Ecol* 55:44–52.
- Felske A, Rheims H, Wokerink A, Stackebrandt E, Akkermans DL (1997) Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grasslands soils. *Microbiol* 143:2983-2989.
- Fiddaman PJ and Rossal S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J Appl Bact* 74:119-126.
- Freitas JR, Banerjee MR and Germida JJ (1997) Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils* 24:358–364.

- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1–7.
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B and Ladha JK (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 183:2634–2645.
- González E, Sutton TB and Correll JC (2006) Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. *Phytopath* 96:982–992.
- Gozzo F (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to chemical approach. *J Agric Food Chem* 51:4487–4503.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Hamme, O, Harper DAT and Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis version 2.09. *Palaeontol Electro.* 4:9.
- Hinton DM and Bacon CW (1995) *Enterobacter cloacae* an endophytic symbiont of corn. *Mycopath* 129:117–125.
- Iniguez AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM and Triplett EW (2005) Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:169–178.
- Karakurt H and Aslantas R (2010) Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains on plant growth and leaf nutrient content of apple. *J Fruit Ornam Plant Res* 18:101–110.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS and Campo RJ (2006) Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* 32:210–220.
- Kowata LS, Strapasson M, Challiol MA and May-De Mio LL (2010) *Glomerella* leaf spot in apple: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides. *Ciência Rural* 40:1502–1508.
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA and Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6:1244–1251.
- Kürkcüoğlu S, Degenhardt J, Lensing J, Al-Masri AN and Gau AE (2007) Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. *J Exp Bot* 58:733–741.

- Laheurte F and Berthelin J (1988) Effect of a phosphate-solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. *Plant Soil* 105:11–17.
- McInroy JA and Kloepper JW (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342.
- Picardi C, Frascaroli E and Bosco M (2005) Recent knowledge on the ecology of plant-growth-promoting rhizobacteria helps to develop new concepts for organic plant breeding. *Proc Int Sem Environ Friendly Food Prod System: Requirement for Plant Breeding and Seed Production*, pp. 39-42. Belicka I (Ed.), State Stende Plant Breeding Station, Talsi, Latvia. (ISBN 998497524X).
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Hoffland E, Van Pelt JA and Van Loon LC (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8:1225-1237.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ and Van Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1571-80.
- Pieterse CMJ, Ton J and Van Loon LC (2001) Cross-talk between plant defense signaling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* 3:1-8.
- 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 Protect* 20:1-11.
- Reiter B, Bürgmann H, Burg K and Sessitsch A (2003) Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Can J Microbiol* 49:549–555.
- Rico A, Ortiz-Barredo A, Ritter E and Murillo J (2004) Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* 96:302–310.
- Rodríguez H and Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech Adv* 17:319–339.
- Rosenblueth M, Martinez L, Silva J and Martinez-Romero E (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol* 27:27–35.
- Sambrook J and Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.

- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Ait Barka E, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, Wang-Pruski G and Nowak J (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microb* 55:1187–1192.
- Shannon CE and Weaver W (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Siddiqui ZA (2006) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, The Netherlands, p. 1-318.
- Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R and Passaglia LMP (2012) 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.
- Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT and Sumner ME (1996) *Methods of soil analysis. Part 3 - Chemical methods*. pp. XXI + 1390 pp. ISBN: 0-89118-825-8
- St. Laurent A, Merwin IA and Thies JE (2008) Long-term orchard groundcover management systems affect soil microbial communities and apple replant disease severity. *Plant Soil* 304:209–225.
- Sundara B, Natarajan V, Hari K (2002) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Res* 77:43-49.
- Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L and Du B (2009) Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz J Microb* 40:276-284.
- Van Loon LC (1997) Induced Resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol* 103:753-765.
- Van Loon LC, Bakker PAHM and Pieterse CMJ (1998) Systemic Resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann Rev Phytopathol* 36:453-83.
- Verma SC, Singh A, Chowdhury SP and Tripathi AK (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnol Lett* 26:425–429.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586.
- Vial L, Groleau MC, Dekimpe V and Déziel E (2007) *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol* 17:1407–1429.

Tables

Table 1 - Abiotic soil characteristics of the sampling sites

Sampling sites	Clay (%)	pH (H ₂ O)	P (mg d ⁻³)	K (mg d ⁻³)	OMC (%)	Al _{exc} (cmol _c dm ⁻³)	Ca _{exc} (cmol _c dm ⁻³)	Mg _{exc} (cmol _c dm ⁻³)
Organic Orchard	13	6.5	> 100	> 400	8.8	0.0	19.1	8.2
Conventional Orchard	> 60	5.3	8.9	331	3.8	0.2	9.7	4.4
Native Field	17	4.9	4.2	196	7.4	5.6	1.3	0.6

OMC - Organic Matter Content
exc – exchangeable

Table 2 Occurrence of siderophore and indolic compound (ICs) production, phosphate solubilization, and antagonistic activity of bacterial isolates by sampling site and niche.

Sampling sites	Source	Number of isolates	Siderophore producers	Phosphate solubilizers	Antagonistic activity	ICs producers
Native Field	Soil	60	42	0	12	49
Conventional Orchard	Roots	60	30	0	11	60
Conventional Orchard	Rhizospheric soil	60	38	21	21	60
Organic Orchard	Roots	60	52	5	13	59
Organic Orchard	Rhizospheric soil	60	52	10	12	55
Total		300	214	36	69	283

Table 3. Identification and PGP abilities of the selected isolates

Isolates ^a	16S rRNA sequence	Siderophore production	Phosphate solubilization	ICs production (µg ml ⁻¹)	Antagonistic activity (mm)	ARA (nmol C ₂ H ₄ mg protein h ⁻¹)
75	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	7.23	20	15.6 ± 15.7 a
89	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	15.56	21	4.9 ± 1.1 a
108	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	28.77	19	8.5 ± 6.7 a
187	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	6.46	21	25.2 ± 13.8 a
208	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+	10.39	23	16.7 ± 4.5 a

ICs (Indolic compounds); ARA (Acetylene Reduction Assay)

^aBacterial strains isolated: 75 and 89 from soil/native field sample; 108 from rhizospheric soil/organic orchard sample; 187 and 208 from rhizospheric soil/conventional orchard sample.

Table 4. The effect of the inoculation of native PGPR on the uptake of N, P and K by apple seedlings in the greenhouse assay

Treatment	Nutrient uptake		
	N (%)	P (%)	K (%)
Control ^a	1.59 ±0.45 a	0.20 ±0.05 b	1.59 ±0.27 ab
75 ^b	1.38 ±0.51 a	0.29 ±0.03 a	1.63 ±0.09 a
89	1.43 ±0.60 a	0.27 ±0.06 ab	1.63 ±0.46 a
108	1.48 ±0.46 a	0.25 ±0.03 ab	1.21 ±0.10 b
187	1.53 ±0.23 a	0.23 ±0.06 ab	1.29 ±0.13 ab
208	1.33 ±0.37 a	0.30 ±0.05 a	1.52 ±0.22 ab

^a Plants without bacterium inoculation.

^b Plants with bacterium inoculation.

The data represent the means of seven plots per treatment in the greenhouse assay followed by the standard deviation. Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at $p > 0.05$ (Tukey's test).

Table 5. The effect of the inoculation of native PGPR plus the pathogenic fungus on the uptake of N, P and K by apple seedlings in the greenhouse assay.

Treatment	Nutrient uptake		
	N (%)	P (%)	K (%)
Fungus ^a	1.93 ±0.37 a	0.20 ±0.04 b	1.38 ±0.31 a
75 + F ^b	1.61 ±0.86 a	0.29 ±0.11 ab	1.54 ±0.57 a
89 + F	1.67 ±0.54 a	0.23 ±0.04 ab	1.39 ±0.34 a
108 + F	1.73 ±0.57 a	0.30 ±0.04 ab	1.66 ±0.23 a
187 + F	1.79 ±0.24 a	0.31 ±0.08 ab	1.47 ±0.23 a
208 + F	1.86 ±0.52 a	0.32 ±0.07 a	1.80 ±0.30 a

^a Plants without bacterium inoculation and with fungus (*C. gloeosporioides*) inoculation

^b Plants with bacterium plus fungus inoculation

The data represent the means of seven plots per treatment in the greenhouse assay followed by the standard deviation. Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at $p > 0.05$ (Tukey's test).

Figures

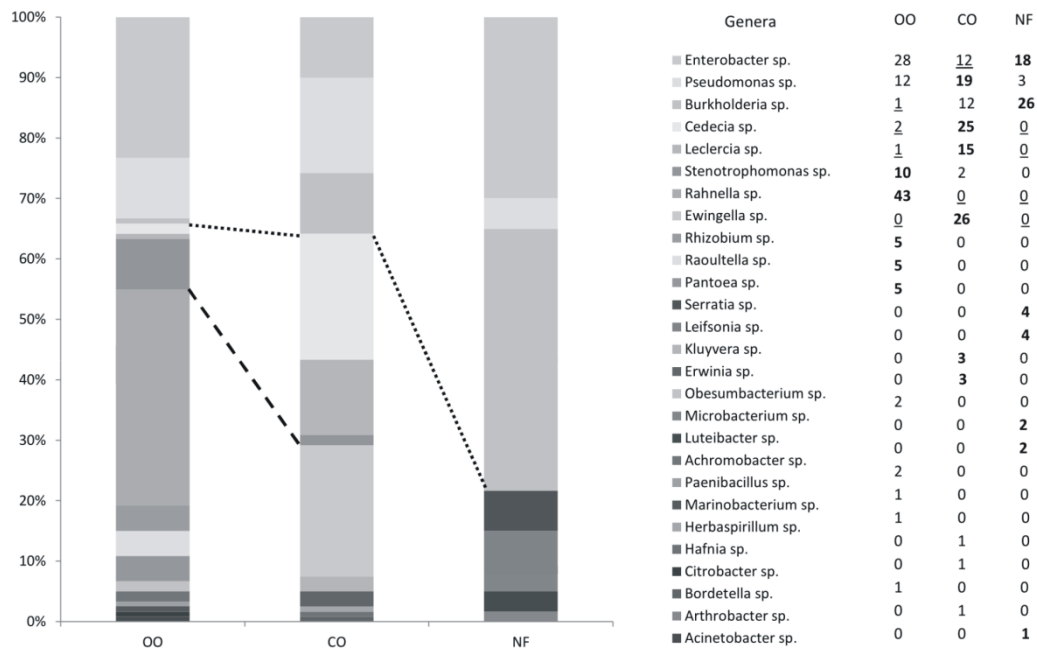


Figure 1. Bacterial community composition from soil under different management conditions. Different colors represent the dominance of each genus in each soil condition (represented by bars). Genera above the dotted line were ubiquitous, and genera between the dotted and dashed lines occurred under both orchards. **Bold** = excessive number of bacteria occurring in that condition; Underline = lack of bacteria occurring in that condition. NF= Native field, CO= Conventional Orchard, OO = Organic Orchard.

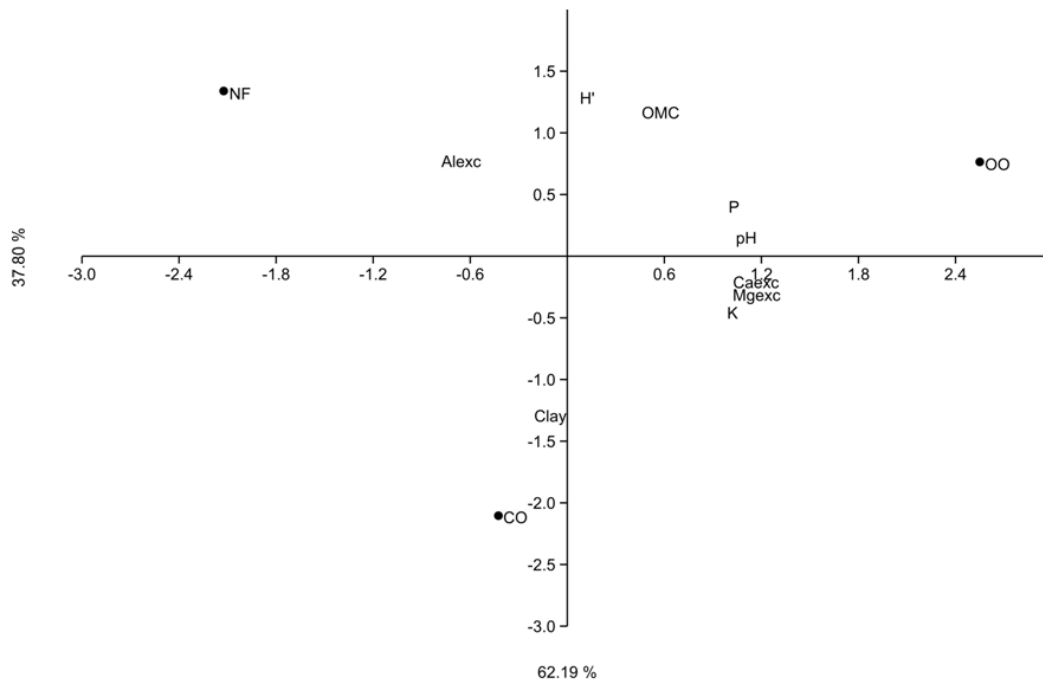


Figure 2. Principal component analysis (PCA) of the diversity indexes (H') and soil properties [clay, organic matter content (OMC), pH, P, K, Mg_{exc}, Ca_{exc}, and Al_{exc}] of the three sampling sites. Principal component 1 and 2 accounted for 62.19% and 37.81% of the total variation, respectively. NF = Native Field; CO = Conventional Orchard; OO= Organic Orchard.

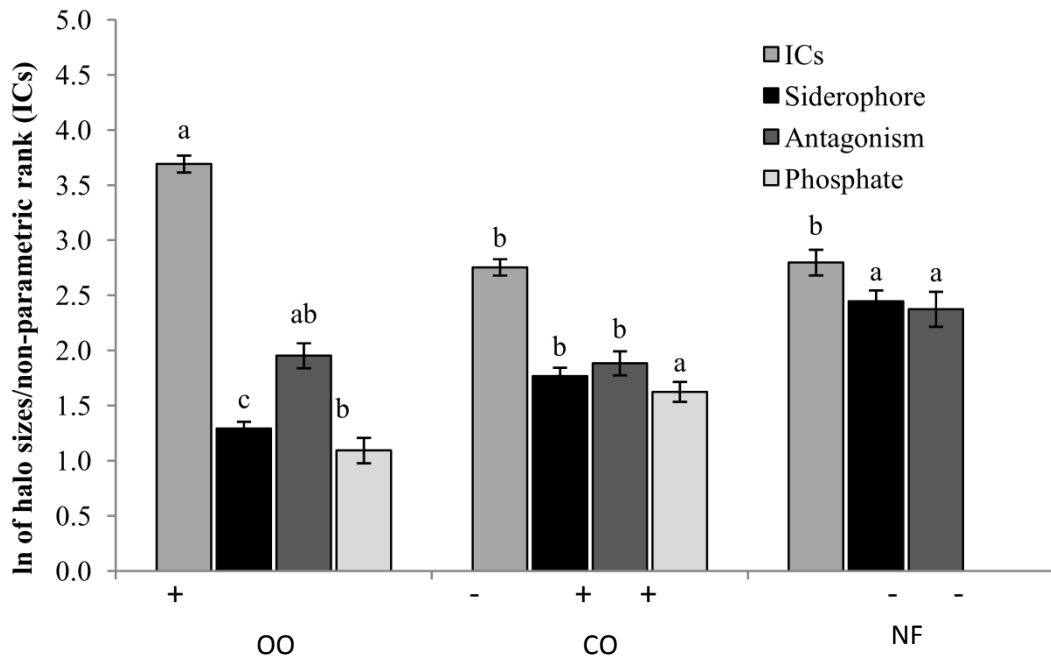


Figure 3. Occurrence and activity of PGP traits of bacterial isolates from different management conditions. ANOVA-Tukey comparisons were made across each single PGP trait independently, so each statistical analysis compares bars with the same color. Bars show the activity of positive isolates for each PGP trait; different letters show significant differences. +, /, and - signs below the bars show the association between the soil management and the occurrence of the characteristic, as per adjusted residue analysis: + = excessive number of bacteria displaying that characteristic in that condition; - = lack of bacteria displaying that characteristic in that condition; / = number of isolates displaying that characteristic in that condition falls within expected range. OO = Organic Orchard, CO= Conventional Orchard, NF= Native Field. The scale is the natural log value of original values (in mm) for siderophores production, phosphate solubilization and antagonism assays. ICs production is in mg ml^{-1} .

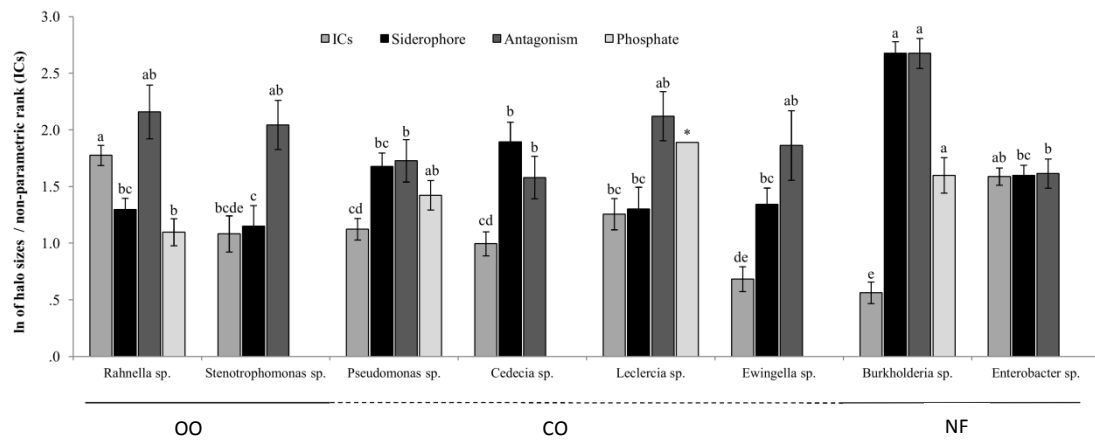


Figure 4. PGP traits of the genera composing the core of the microbial communities (average \pm SE). Comparisons were made across each single PGP trait independently, so each statistical analysis compares bars with the same color. Siderophores, antagonism against *C. gloeosporioides* and phosphate solubilization abilities were compared according to halo size. ICs production ability was compared by non-parametric ranking and scaled down 100 times for graphical display. The genera are arranged according with the type of soil management to which they were positively associated. *= phosphate solubilization for strains belonging to *Leclercia* genus were removed from the statistical analysis because only one isolate presented this trait, so the standard deviation could not be calculated for this genus.

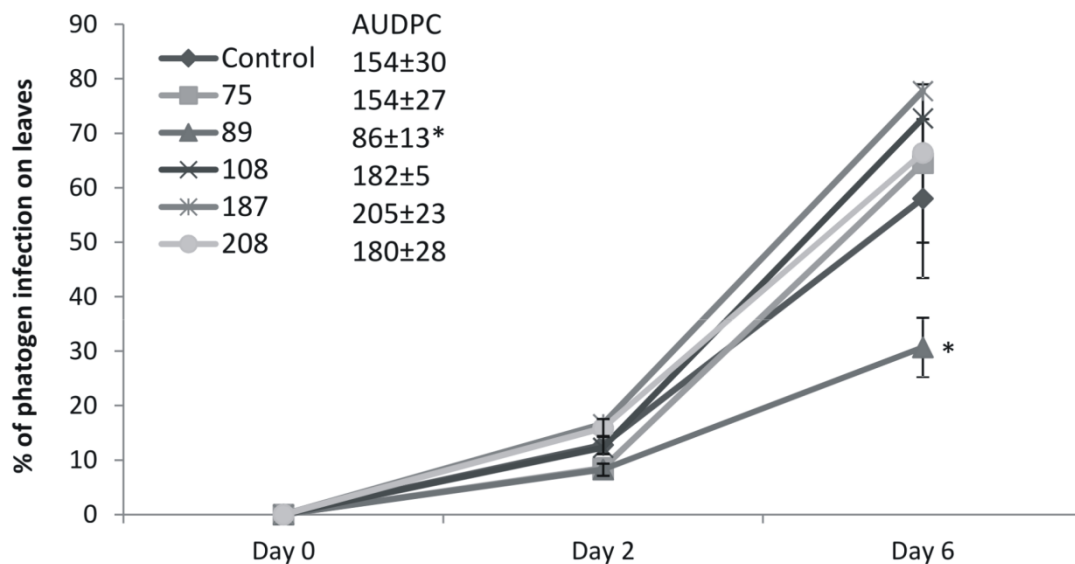


Figure 5. Percentage of pathogen infection (average \pm SE) and area under the disease progress curve (AUDPC) in the leaves of apple tree seedlings inoculated with bacterial isolates (75, 89, 108, 187 and 208) plus *C. gloeosporioides* conidia. * = significant difference compared to control.

Supplementary material

The following online material is available for this article:

Table S1. Effect of inoculation of various isolates on root and shoot length and dry matter of apple seedlings 30 d after inoculation with *C. gloeosporioides*.

Treatment	Shoot Length (cm)	Shoot Weight (g)			Root Length (cm)	Root Weight (g)		
		fresh	dry	humidity		fresh	dry	humidity
Control ^a	43.14	28.23	5.58	22.65	40.21	16.20	5.11	11.09
Fungus ^b	47.93	23.67	4.87	18.80	48.07	22.27	6.34	15.93
75 ^c	45.5	31.61	9.24	22.38	38.86	24.72	7.28	17.44
75 + F ^d	44.00	26.49	8.13	18.35	49.86	24.41	6.66	17.75
89	45.71	29.61	7.83	21.79	45.50	17.70	6.15	11.55
89 + F	46.14	24.71	6.13	18.59	41.50	20.96	5.98	14.97
108	52.71	28.11	7.83	20.28	43.43	20.41	6.38	14.03
108 + F	43.57	22.89	4.32	18.57	47.29	18.36	4.70	13.65
187	43.64	30.63	7.57	23.06	37.86	23.44	8.15	15.29
187 + F	43.07	22.39	4.02	18.36	41.29	19.91	5.26	14.66
208	49.57	31.61	9.11	22.50	40.21	19.51	6.77	12.75
208 + F	44.64	22.97	4.84	18.13	48.07	18.50	4.90	13.60

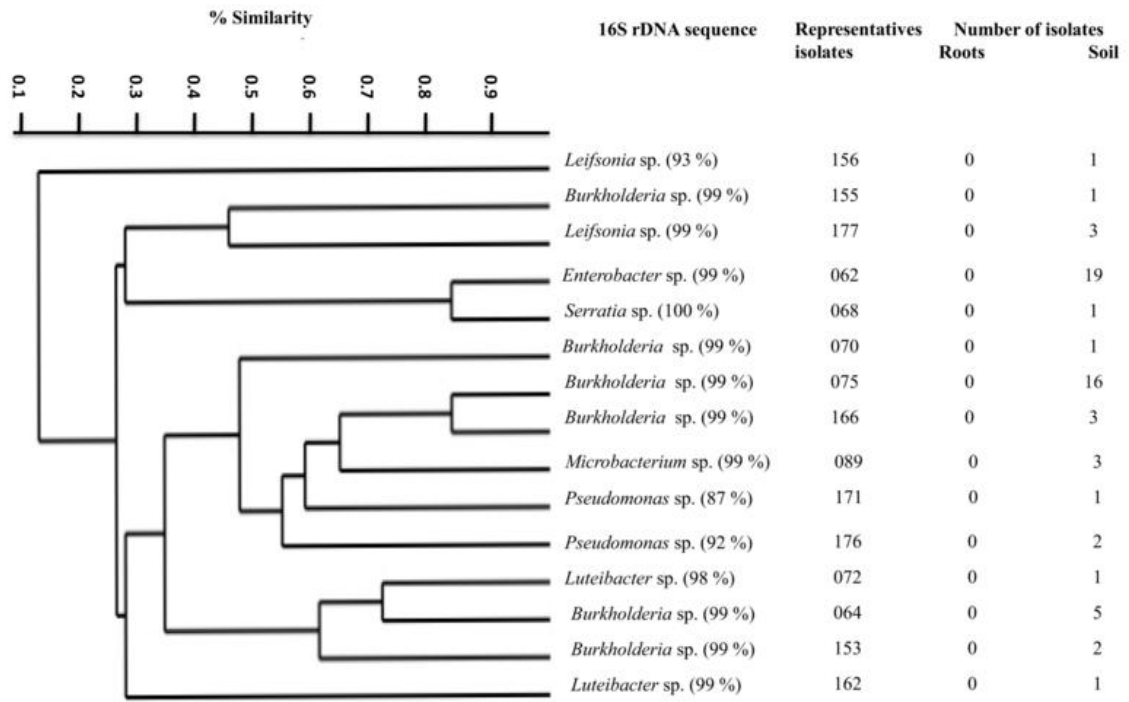
^aPlants without bacterium and fungus inoculation

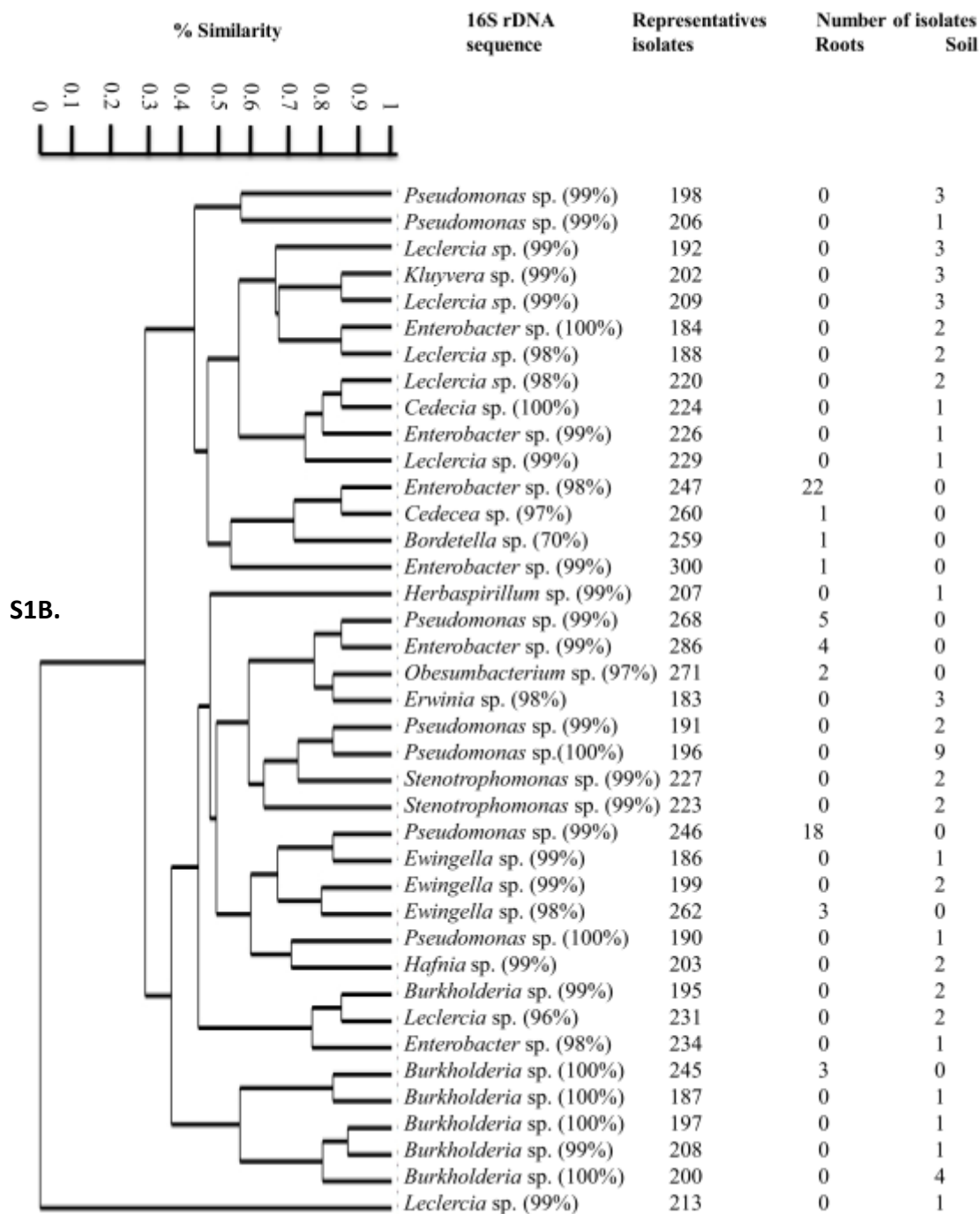
^bPlants without bacterium inoculation and with fungus (*C. gloeosporioides*) inoculation

^cPlants with bacterium inoculation

^dPlants with bacterium plus fungus inoculation

S1A





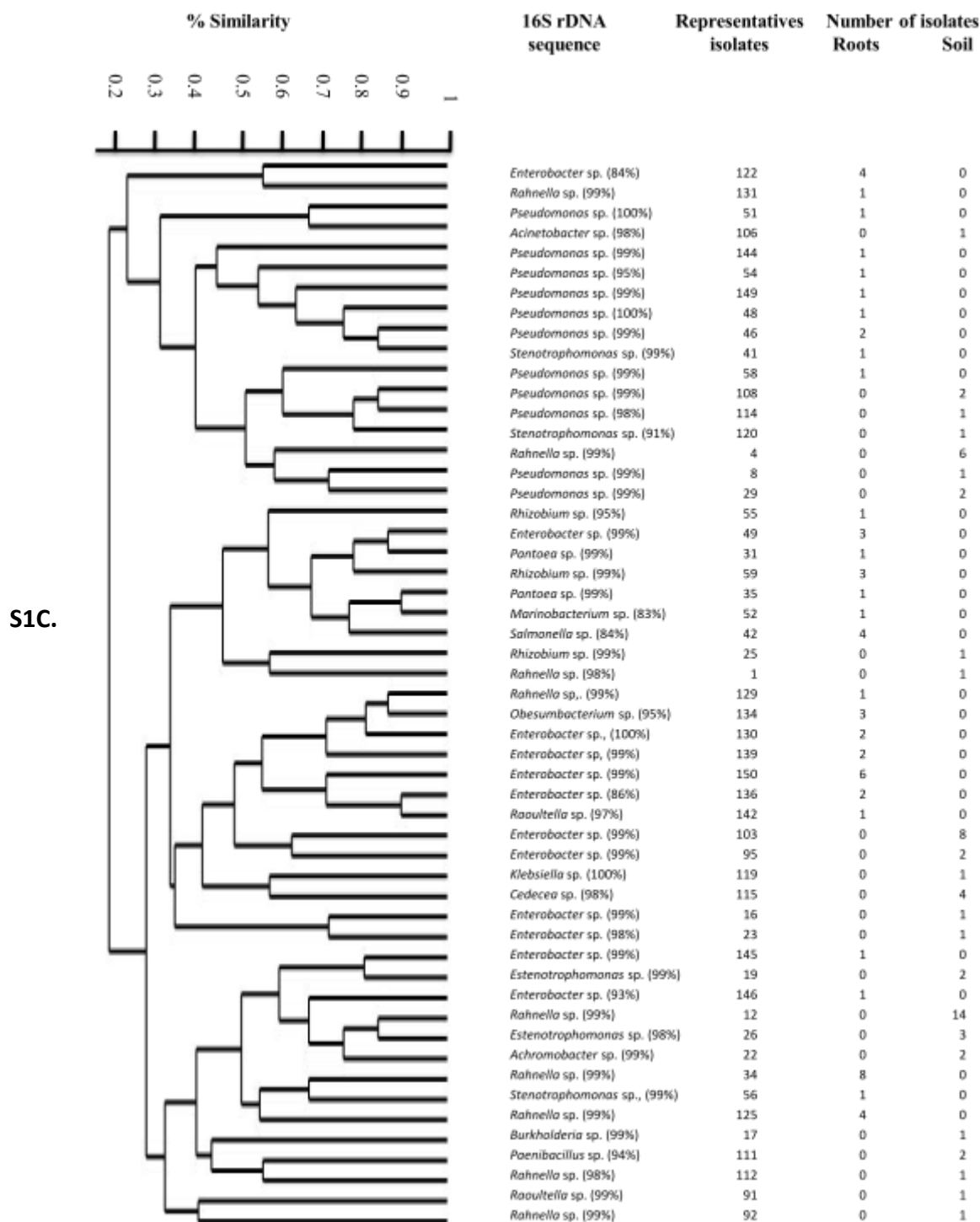


Figure S1. Dendrograms based on UPGMA cluster analysis (PAST software 2.09) using the 16S rDNA PCR-RFLP data obtained from isolates of each sampled site: A. Native Field, B. Conventional Orchard, C. Organic Orchard. Each dendrogram was summed, and only one isolate from each cluster (the representative isolate) is represented. Each isolate is denoted according to the site at which it was sampled (NF: Native Field, CO: Conventional Orchard, and OO: Organic Orchard) and the source of sampling (i.e., roots or rhizosphere). The percentages identities (in parenthesis) are based upon comparisons with the Genbank database using the BLASTN program. These representative isolates had their 16S rRNA gene partially sequenced and were grouped according to their identification at the genus level.

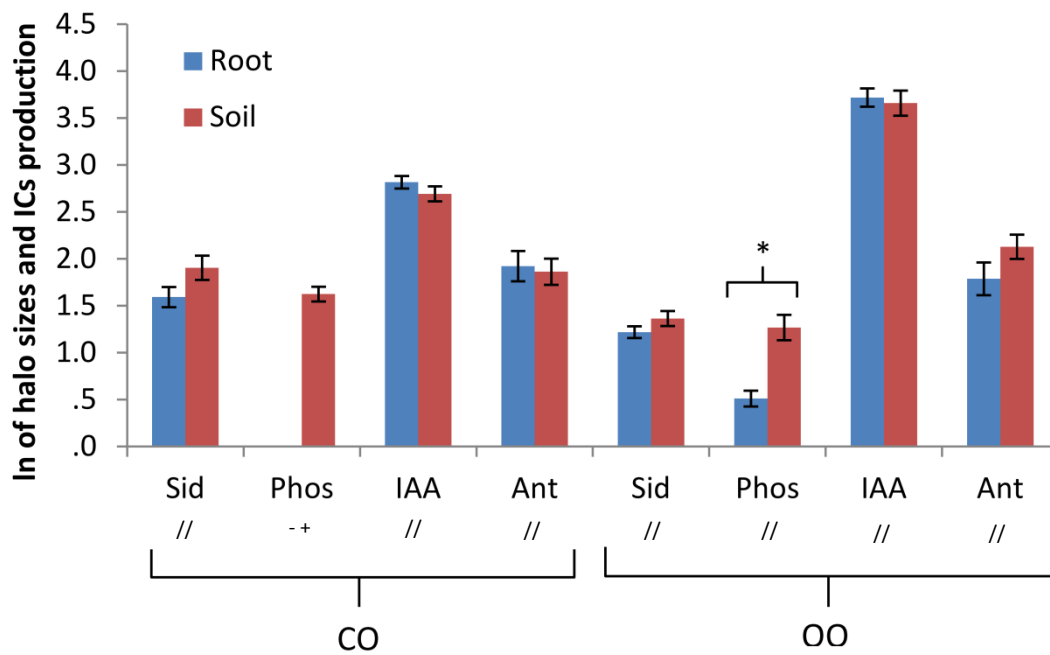


Figure S2 - Differences of PGP traits between root and rhizospheric soil isolates in each orchard (Independent samples T-test or T'-tests, depending on homogeneity of variances, average \pm SE). Only phosphate solubilization halo sizes in bacteria from organic orchards were different between root and rhizospheric soil isolates. * = significant difference ($p < 0.05$). All data were log-transformed. OO = Organic Orchard, CO= Conventional Orchard. +, /, and - signs below the bars show the association between the soil management system and the occurrence of the characteristic: + = excessive number of bacteria displaying that characteristic in that condition; - = lack of bacteria displaying that characteristic in that condition; / = number of isolates displaying that characteristic in that condition falls within expected range.

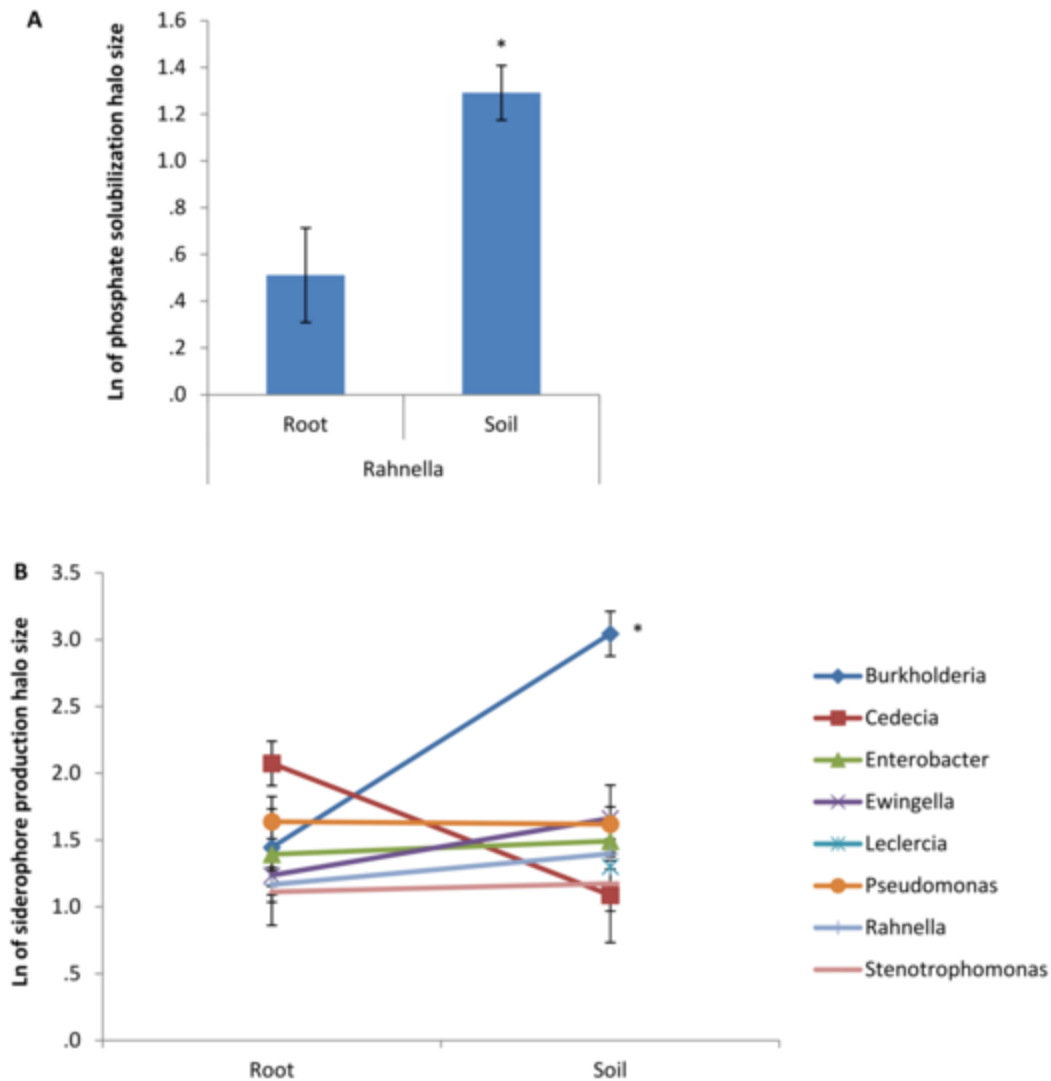


Figure S3. A. Phosphate solubilization halo size comparison between niche and bacterial genera (Independent samples T-test, average \pm SE). Only strains belonging to *Rahnella* genus had phosphate solubilizers on both niches, so the other main genera could not be analyzed. Like the interaction analysis of Figure S2, these data show that phosphate solubilization halo sizes of *Rahnella* strains are niche-dependent. * = significance at $p < 0.05$. All data were log-transformed. B. Interaction effects of siderophores production halo sizes between niche and bacterial genera (Two-way ANOVA, average \pm SE). Significant interaction effect ($p < 0.05$) shows that siderophores halo sizes of different genera depended on the niche from which bacteria were isolated. Confidence interval analysis shows that *Burkholderia* strains isolated from rhizospheric soils presented halo sizes in siderophores *in vitro* assay larger than those presented by isolates from root tissue. While strains belonging to *Cedecia* genus also presented a sharp change in siderophores halo sizes, the confidence intervals overlapped. * = significant difference between root and rhizospheric soil isolates of the same genera. All data were log-transformed.

CAPÍTULO II:
**Prospecção de clones metagenômicos indutores de Resistência Sistêmica Induzida
em macieira**

Prospecção de clones metagenômicos indutores de Resistência Sistêmica Induzida em macieira

Resumo

Este estudo teve como objetivo realizar a prospecção de clones metagenômicos capazes de induzir resistência sistêmica em macieiras contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da doença da mancha foliar. Amostras de solo rizosférico de macieiras cultivadas em pomares orgânicos e convencionais no município de São Joaquim/SC foram coletadas e o DNA metagenômico foi extraído. Para a confecção das bibliotecas metagenômicas foi utilizado o kit *CopyControl™ HTP Fosmid Library Production* (EPICENTRE). Até o momento, 160 clones foram testados quanto à atividade antagônica contra o fungo *C. gloeosporioides* em ensaios *in vitro*. Entretanto, nenhum destes 160 clones foi capaz de inibir o crescimento do micélio fúngico. As bibliotecas metagenômicas foram estocadas em glicerol e novos clones serão paulatinamente obtidos e testados para a presença de atividade antagônica ao fungo fitopatogênico. Uma vez identificado um clone contendo genes que codifiquem um produto que exerça efeito antagônico ao fungo, esse clone terá seu inserto sequenciado, visando a identificação e caracterização dos genes presentes e da substância produzida. O fosmídeo contendo o fragmento caracterizado será, posteriormente, transferido para uma linhagem bacteriana capaz de penetrar nos tecidos da planta e será verificada a capacidade desse fosmídeo de induzir resistência sistêmica contra o agente causal da mancha foliar em plantas de macieira. Como as mudas de macieiras usadas em cultivos comerciais são o resultado de enxertos de uma variedade em outra, que tais enxertos necessitam de pelo menos 18 meses para ficarem prontos e devido ao fato da macieira ser uma planta perene, necessitando de 10 a 11 anos para atingir sua maturidade, os experimentos em casa de vegetação exigirão de um período maior de tempo para serem finalizados e os resultados avaliados.

Palavras chave: Metagenoma, Macieira, Prospecção, Resistência Sistêmica Induzida, Bactéria promotora de crescimento vegetal

Introdução

Conceitos, hipóteses, imagens e palavras a respeito de micro-organismos precisaram ser revistos quando se tornou evidente de que eles foram baseados na premissa de que os micro-organismos não existiam a não ser que eles pudessem ser cultivados (Handelsmann, 2004). Além disso, a morfologia e as características fisiológicas da maioria dos micróbios, apesar de fornecer algumas pistas para a sua identificação, são muitas vezes ambíguas. O profissional que trabalha com microbiologia ficava, em geral, impedido por estas restrições, uma vez que muitos organismos resistem ao cultivo *in vitro*, que é essencial para a caracterização no laboratório (Handelsmann, 2004; Pace *et al.*, 1986). Todos esses entraves provocaram a necessidade da utilização de técnicas não convencionais e sem a necessidade do cultivo para se entender o mundo microbiano.

A diversidade bacteriana do solo e seu potencial biotecnológico são pouco explorados e a biotecnologia moderna tem uma demanda crescente de novos biocatalisadores. Essas necessidades fez com que novas abordagens experimentais fossem desenvolvidas para encontrar e identificar genes codificadores desses produtos (Rondon *et al.*, 2000). Apenas a partir das duas últimas décadas é que foram iniciados trabalhos envolvendo a metagenômica, que representa os genomas de todos os micro-organismos cultiváveis ou não, como uma fonte rica para o isolamento de inúmeros novos genes. (Rondon *et al.*, 2000). Um grama de solo pode conter até 4.000 espécies diferentes de micro-organismos (Torsvik e Ovreas, 2002). Porém, estudos indicam que menos de 1% destes organismos são prontamente cultiváveis com técnicas de cultivo conhecidas (Amann *et al.*, 1995), o que pode resultar na perda de grandes porções das comunidades microbianas devido aos diferentes requisitos de crescimento de cada um deles (Caldwell *et al.*, 1997). Este problema pode ser resolvido através do isolamento e clonagem direta de DNA metagenômico. Assim, a metagenômica tornou possível o acesso à vasta diversidade genética existente no solo, permitindo a análise direta do DNA de uma comunidade bacteriana e levando à descoberta de novos biocatalisadores (Faoro, 2010).

Nesse trabalho são descritas a construção de bibliotecas metagenômicas a partir de amostras de solo de dois pomares de macieira, cultivados pelo manejo convencional e pelo manejo orgânico, e a prospecção por clones produtores de biomoléculas com a característica de serem antagonistas ao agente causal da mancha foliar em macieira (*Colletotrichum gloeosporioides*).

Material e Métodos

Coleta das amostras de solo

Os seguintes locais de estudo foram selecionados com base em suas diferenças de manejo do solo: Pomar Orgânico (PO) e Pomar Convencional (PC). Onde o sistema de produção de pomar convencional (PC) é caracterizado por possuir um manejo de solo (aração e gradagem) intenso, grande uso de agroquímicos para controle de doenças e pragas, e também na pós-colheita, para uma maior durabilidade do fruto além do uso de alta dose de adubação química para garantir alta produtividade do pomar. Já no sistema de produção de pomar orgânico (PO) é caracterizado por possuir um manejo de solo (aração e gradagem) mínimo, uso de produtos naturais para controle de doenças e pragas e uso de adubos orgânicos para manter a produtividade do pomar (Glover et al. 2000; Conacher & Conacher, 1998; Guanapala & Scow, 1998; Andrews et al. 2001; Duarte et al. 2012; Amarante et al. 2008).

No PO, antes da implantação das mudas, a acidez do solo foi corrigida para elevar o pH em água do mesmo para 6,0, utilizando-se 50% calcário calcítico e 50% de calcário dolomítico. Também foram corrigidos os teores de P e K antes do plantio das mudas, utilizando fosfato natural antes da calagem para fins de correção dos teores de P do solo e cinzas de madeira para fins de correção dos teores de K do solo. Após a implantação do PO até o início da produção do mesmo, realizou-se uma adubação de crescimento para as mudas, utilizando esterco de aves nas adubações. Quando a produção iniciou, realizou-se uma adubação de manutenção do pomar, utilizando esterco de aves e cinzas nas adubações que foram realizadas na superfície do solo.

Já no PC, na instalação do pomar a acidez do solo foi corrigida para se elevar o pH em água do mesmo para 6,5, utilizando-se 50% de calcário calcítico e 50% de calcário dolomítico. Corrigiu-se também os teores de P, K, B e Zn antes do plantio das mudas, utilizando superfosfato triplo (700kg/ha), juntamente com a calagem para fins de correção dos teores de P do solo. Usou-se 300kg/ha de cloreto de potássio para fins de correção dos teores de K do solo; 40kg/ha de bórax para fins de correção dos teores de B do solo e 15kg/ha de sulfato de zinco para fins de correção de Zn do solo. Após o PC implantado até o início da produção, realizou-se uma adubação de crescimento, utilizando uréia para fins de suprimento de nitrogênio. Quando teve início a produção realizou-se uma adubação de manutenção, utilizando doses de nitrogênio na forma de uréia, variando de 40 a 80kg/ha/ano, conforme idade do pomar. Aplicou-se 1,5kg de K/ton de maçã produzida, na forma de cloreto de potássio. Anualmente, também, foram

realizadas 8 pulverizações de cálcio foliar (na forma de cloreto de cálcio 0,4%). Nas florações foi realizada anualmente uma adubação foliar com boro (ácido bórico 0,2%).

Os sítios situam-se na localidade de São Joaquim (28 ° 17'36 "S, 49 ° 56'1" W), estado de Santa Catarina, a uma altitude de 1.360 m acima do nível do mar. O clima da região é mesotérmico úmido (Cfb) de acordo com a classificação de Köppen. Alta precipitação ocorre entre os meses de outubro a março e durante este período, a precipitação média mensal é de 166 mm.

De cada local amostrado foram coletadas seis árvores de forma aleatória. As macieiras (*Malus domestica* Borkhausen) pertenciam à variedade Gala enxertada sobre um porta-enxertos da variedade Marubakaido. Quinhentos gramas de solo rizosférico (solo aderido às raízes) de cada árvore também foram coletados. Estes solos foram misturados para formar uma amostra complexa e dessa, 10 g de solo de cada local amostrado (PO ou PC) foram utilizadas para a extração de DNA. Depois da coleta de cada árvore, as ferramentas eram lavadas em água corrente e desinfetadas com álcool 70% para evitar contaminações de um solo para outro. Amostras de solo também foram analisadas para a determinação do conteúdo de argila, P, K, matéria orgânica (MO), Al, Ca, Mg e valores de pH, utilizando métodos padrão (Sparks et al 1996; Tedesco et al., 1995; Tabela 1).



Figura 1. Macieira derrubada para coleta de solo rizosférico.

Extração de DNA das amostras de solo

A purificação de DNA das amostras de solo de PO e PC foram realizadas utilizando o kit *Power Max Soil DNA Isolation* (Mo Bio Laboratories, Inc.), a partir de 10 g de solo, seguindo-se as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi checado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador de luz UV e quantificado utilizando-se o sistema Nanodrop. A concentração do DNA da amostra do PO foi de 2.100 ng μl^{-1} e da amostra do PC foi de 91,5 ng μl^{-1} . A amostra de DNA proveniente do PC foi concentrada, através de precipitação com acetato de sódio 3M e etanol absoluto. A amostra de PC após esse procedimento apresentou a concentração de 2.425 ng μl^{-1} , medida em Nanodrop.

Construção das bibliotecas metagenômicas

As bibliotecas metagenômicas foram construídas em vetor fosmídeo específico utilizando o kit *CopyControl™ HTP Fosmid Library Production* (EPICENTRE) segundo recomendações do fabricante. As bibliotecas foram construídas em 4 etapas: 1º- Reparação e seleção dos fragmentos de DNA ambiental entre 40 e 50 kb, 2º- Ligação dos fragmentos de DNA no vetor específico e empacotamento dos fosmídeos em fago lambda, 3º- Transformação de *E. coli* EPI300 por infecção com fago lambda e 4º- Coleta e armazenagem dos clones transformantes.

Em torno de 20 μg do DNA total extraído de cada amostra de solo rizosférico de macieiras foram submetidas, de modo individual, a uma reação de reparação e fosforilação das extremidades dos fragmentos com *End Repair Mix Enzyme* (EPICENTRE) durante 45 minutos a 30°C. Depois desse procedimento, as enzimas foram inativadas por calor durante 20 minutos a 80°C. O produto dessa reação foi, então, aplicado em um gel de agarose de baixo ponto de fusão e submetido por 26 horas a 30 V em tampão TAE (Tris acetato 40 mM e EDTA 1 mM). A faixa do gel correspondente ao marcador de peso molecular 5 kb (Gibco) foi recortada e corada com brometo de etídeo. A posição da banda de 40 kb do marcador de peso molecular foi identificada por exposição da faixa corada à luz UV e marcada. Essa faixa de gel correspondente ao marcador foi posicionada ao lado do gel contendo o DNA metagenômico e serviu como guia para a seleção dos fragmentos de interesse entre 40 e 50 kb.

A purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose foi realizada utilizando fenol. A fatia de gel contendo os fragmentos de DNA de tamanho desejado foi fundida em banho de água quente a 65°C e o volume de banda foi ajustado para 500 μl com

água ultrapura. Nesse volume foi adicionado NaCl, Tris-HCl pH 8,0 e EDTA pH 8,0 para as concentrações finais de 250 mM, 100 mM e 1 mM, respectivamente. Após essa etapa foi adicionado um (1) volume de fenol puro equilibrado e a solução foi misturada cuidadosamente por inversão para evitar a quebra mecânica do DNA. Esta solução foi centrifugada por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado para um novo tubo. O DNA foi, então, precipitado com 1 volume de isopropanol, lavado com etanol 80%, seco em estufa a 37°C e dissolvido em água ultrapura.

Após a etapa de preparação dos fragmentos, estes foram ligados no fosmídeo pCCFOS2 linearizado (EPICENTRE) e empacotados em extratos de fago lambda. A linhagem de *E. coli* EPI300 foi transformada por infecção com fago lambda e as bactérias contendo os clones recombinantes foram coletadas e armazenadas em placas de 96 poços contendo 150 µl de meio líquido Terrific Broth acrescido de 12,5 µg ml⁻¹ de cloranfenicol e incubadas em estufa a 37°C durante a noite. Nas culturas que foram multiplicadas foram adicionados 150 µl de glicerol 50% (m/v). As placas foram, então, seladas com adesivos plásticos, agitadas em aparelho tipo vórtex e armazenadas a -80°C.

Teste de antagonismo

Os clones metagenômicos obtidos foram, então, submetidos a teste de antagonismo *in vitro* (inibição de crescimento) contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (agente causal da mancha foliar em macieira). O micélio do fungo, cultivado por dez dias em câmara de crescimento (BOD) com iluminação por 12 horas a 28 °C sem agitação, foi utilizado como controle (C). Um cilindro de 3 cm de diâmetro contendo parte do micélio do fungo foi colocado no centro de placas de Petri contendo o meio ágar-batata (MPA) e, em seguida, 1 µl de cada cultura bacteriana pura, previamente multiplicada em meio LB suplementado com cloranfenicol por 16 h a 37°C, foi inoculado ao redor do micélio do fungo. As placas foram incubadas por dez dias a 25°C. A inibição do crescimento do micélio foi calculada como $I = [(C - T) / C] \times 100$, onde I = porcentagem de inibição de crescimento do micélio, C = diâmetro do micélio na placa controle (sem bactéria) e T = diâmetro do micélio nas placas inoculadas com as bactérias (Forchetti *et al.*, 2007).

Construção de sub-bibliotecas e sequenciamento dos fragmentos clonados (etapa ainda não realizada)

Os clones que apresentarem capacidade de inibição de crescimento do micélio serão submetidos a um processo de subclonagem com o objetivo de reduzir o tamanho do DNA inserido possibilitando, assim, o sequenciamento integral do inserto de DNA ambiental clonado no fósforo.

Para tanto, após a extração de DNA fosmidial será realizada uma nebulização para a obtenção de fragmentos de DNA de tamanhos entre 10 e 3 kb. O DNA nebulizado será, então, submetido a uma reação de reparação e fosforilação das extremidades dos fragmentos criando, assim, fragmentos com extremidades cegas fosforiladas na ponta 5' possibilitando a ocorrência de ligação do DNA a um vetor de clonagem. Esse DNA, produto de uma reação de reparação será aplicado em um gel de agarose 0,8% e submetido à eletroforese por 14 horas a 12 V em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato e 1 mM de EDTA) para serem purificados.

Os fragmentos de DNA purificados da agarose serão clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega) e essas construções serão utilizadas na transformação por eletroporação de *Escherichia coli* XL1-Blue competentes. Os plasmídeos recombinantes serão sequenciados em sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e as sequências obtidas serão comparadas com as sequências disponíveis nos bancos de dados, a fim de identificarmos os genes responsáveis pelo efeito de inibição de crescimento do fungo e, por conseguinte, o modo de ação da resistência.

Avaliação da indução de ISR em macieira pelas linhagens bacterianas contendo o(s) clone(s) metagenômicos selecionados

As linhagens de *E. coli* (ou alternativamente uma bactéria endofítica da macieira previamente isolada) contendo o(s) clone(s) metagenômico(s) que demonstraram capacidade de inibir o crescimento do fungo *C. gloeosporioides* serão testadas em experimento de inoculação de macieiras em casa de vegetação. Após a instalação da interação bactéria-planta será inoculado o fungo *C. gloeosporioides* para a avaliação de uma possível indução de ISR pelas linhagens bacterianas contendo os clones previamente selecionados. O experimento contará com cinco repetições de cada tratamento e mais cinco repetições da testemunha sem a presença do agente patogênico, espalhados aleatoriamente em vasos com 2 kg de solo com umidade e temperatura controladas. O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso. As mudas de macieira micropropagadas serão mantidas por até 3 meses e, após esse

período, serão avaliados os parâmetros: velocidade de emergência, tamanho das raízes, tamanho das plantas, peso de matéria seca e período de aparecimento da doença.

Avaliação da indução de ISR em macieira, pelas linhagens bacterianas contendo o(s) clone(s) metagenômicos selecionados, em experimentos a campo

As linhagens bacterianas contendo diferentes clones metagenômicos serão testadas em experimentos a campo (EPAGRI, município de São Joaquim, SC), conforme procedimentos descritos no protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE). O solo da região experimental será analisado quanto a características edáficas, como pH, matéria orgânica e níveis de ferro, fósforo e de alumínio. As mudas de macieira micropropagadas, depois de inoculadas ou não (tratamento controle), serão plantadas de forma manual. As parcelas experimentais deverão ter no mínimo 8,0 x 2,0 m (16 m²) e serão distanciadas em, pelo menos, 4,0 m uma da outra. O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, três repetições. O experimento de campo deverá conter as linhagens a serem testadas e os controles negativo (ausência de linhagens bacterianas contendo os clones metagenômicos). Todas as plantas serão adubadas com as doses de fertilizante e adubos sintéticos normalmente utilizados nos pomares. Assim como nos experimentos em casa de vegetação, serão avaliadas velocidade de emergência das plantas, altura das plantas, produção de massa seca, o comprimento das raízes e período de aparecimento da doença. Será utilizado o teste de Tukey para as análises estatísticas.

Resultados

Com a utilização do kit *Power Max Soil, DNA isolation kit* foram obtidas as seguintes concentrações de DNA das amostras de solo rizosférico de raízes de macieira: Pomar orgânico: 2.100 ng µl⁻¹ e pomar convencional: 2.425 ng µl⁻¹. Esses DNAs foram utilizados na construção de bibliotecas metagenômicas no fósforo pCCFOS2.

Utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\frac{[(n^\circ \text{ de colônias}) * (\text{fator de diluição}) * (1,000 \mu\text{l/ml})]}{[\text{volume do fago diluído} (\mu\text{l})]}$$

foi possível estimar o número potencial de clones em cada biblioteca metagenômica construída. Assim, por exemplo, como a reação de empacotamento da amostra referente

ao PC tinha um volume de 925 µl (extrato empacotado + tampão de diluição do fago) e usou-se 10 µl para infectar a bactéria hospedeira seria possível, então, obter aproximadamente 5.827 clones metagenômicos. Dessa forma, a partir da biblioteca construída com a amostra de PC será possível se obter em torno de 6×10^6 ufc ml⁻¹.

Até o momento, 160 clones metagenômicos foram testados quanto a sua capacidade de inibir o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*. Entretanto, nenhum clone apresentou a capacidade de inibir o crescimento do micélio fúngico.

Discussão

Com o aumento mundial do consumo por frutos mais saudáveis e por um sistema de produção mais sustentável, produtores de maçã de todo planeta estão direcionando seus sistemas produtivos para um sistema que vem crescendo mundialmente: o sistema de produção orgânico nos pomares de macieiras (Peck *et al.*, 2006). A agricultura orgânica no Brasil vem em uma crescente de 40 a 50% ao ano (Maluche-Baretta *et al.*, 2007; Tagliari, 2001) principalmente em função da agregação de valor do produto orgânico, redução dos custos de produção, além de benefícios para a preservação da qualidade do solo e menor impacto ambiental, quando comparada com o sistema de agricultura convencional (Maluche-baretta *et al.*, 2007; Glover *et al.*, 2000). Weibel e colaboradores (2000) demonstraram que maçãs produzidas em pomares de sistema orgânico apresentaram maiores quantidades de polifenóis do que frutas produzidas em pomares com sistema de produção convencional. Estudos de substâncias antioxidantes em outras culturas frutícolas perenes, comparando os sistemas de produção orgânico, integrado e convencional, demonstraram maiores concentrações de polifenóis, outros antioxidantes e vitaminas nos frutos provenientes de pomares com sistema orgânico como, por exemplo, em pera (*Pyrus communis* L.) e pêssigo (*Prunus persica* L.) (Peck *et al.*, 2006; Carbonaro *et al.*, 2002).

Sabe-se hoje que a biosfera é dominada por micro-organismos e que a maior parte destes (~90%) não se conhece por não terem sido cultivados em condições de laboratório (Rondon *et al.*, 2000). As recentes pesquisas em ecologia molecular microbiana fornecem convincentes evidências para a existência de novos tipos de micro-organismos no ambiente em números e variedades quando comparados aos poucos existentes que são cultiváveis em condições de laboratório (Rondon *et al.*, 2000). Os genomas da microbiota total da natureza, que foi chamado de metagenoma (Handelsmann *et al.*, 1998), contém uma vasta quantidade de informação genética se comparada à informação existente sobre os micro-organismos hoje cultivados em

laboratório. Em frente à grande importância dos micro-organismos em todos os sistemas biológicos, métodos para acessar essa riqueza de informação na metagenoma, fazem-se necessário em trabalhos de biotecnologia (Rondon *et al.* 2000). A clonagem de grandes fragmentos de DNA isolados diretamente de micro-organismos no seu ambiente natural fornece uma maneira de acessar o DNA metagenômico do solo (Rondon *et al.* 2000).

Diversos trabalhos já foram publicados com a utilização da metagenômica, com a descoberta de novos genes codificadores de enzimas ainda não descritos na literatura. Voget *et al.* (2003) encontraram genes codificadores de biocatalisadores, incluindo genes que codificam amidase estereosseletiva (*amiA*), duas celulases (*gnuB* e *uvs080*), uma α -amilase (*amyA*), uma ramificação da enzima 1,4- α -glucano (*amyB*) e duas liases de pectato (*pelA* e *uvs119*). Faoro (2010) em seu trabalho de doutorado estudando solos da mata atlântica paranaense identificou clones com atividades esterase/lipase, tricaprilina, tributirina, amilase e protease. No trabalho de Melo, em 2012, dos 1.152 clones metagenômicos testados, quatro apresentaram atividade de emulsificação de querosene; 14% destes clones confirmaram a atividade de biodegradação de hidrocarbonetos.

Na área de indução de resistência em plantas, trabalhos com clones metagenômicos vêm demonstrando resultados positivos na busca de novas moléculas de interesse biotecnológico. Mirete *et al.* (2007), trabalhando com a comunidade bacteriana da rizosfera de *Erica andevalensis*, planta endêmica de áreas com alto nível de metal pesado (níquel) no sudoeste da Espanha, construíram cinco bibliotecas de clones metagenômicos, totalizando 726.500 clones. Destes, 2.481 (0,3%) apresentaram capacidade de induzir resistência ao níquel às plantas inoculadas. Chung *et al.* (2008) usando dois solos de florestas construiu duas bibliotecas de fosmídeos, totalizando 113.700 clones, dos quais um clone, oriundo de uma amostra de solo rizosférico de pinheiro da variedade Yuseong, demonstrou atividade inibitória ao crescimento do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Desta biblioteca, oito ORFs (*Open Reading Frames*) indicaram atividade antifúngica em *Escherichia coli*.

Conclusões

- Até o momento, dos 160 clones metagenômicos analisados nenhum foi capaz de inibir o crescimento do micélio fúngico em condições *in vitro*;
- A prospecção dos aproximadamente 6.000 possíveis clones metagenômicos, provenientes da amostra de PC, será executada em sua totalidade, a fim de identificarmos um clone produtor de algum metabólito secundário que seja

capaz de inibir o crescimento do micélio de *C. gloeosporioides*. Esses experimentos serão realizados nas unidades experimentais da Epagri/SC.

Agradecimentos

À Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira, da Fepagro/RS, pela colaboração nos testes com os clones metagenômicos;

Ao Dr. Helisson Faoro, da UFPR/PR pela colaboração nos experimentos metagenômicos.

Referências

- AMANN, R. I.; LUDWIG, W. and SCHLEIFER, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143–169.
- AMARANTE, C. V. T.; STEFFENS, C. A.; MAFRA, A. L. and ALBUQUERQUE, J. A. 2008. Yield and fruit quality of apple from conventional and organic production systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 333-340.
- ANDREWS, P. K.; GLOVER, J. D. and REGANOLD, J. P. 2001. Horticultural performance, soil quality, and orchard profitability of integrated, organic, and conventional apple production systems. *Integrated Fruit Production IOBC/wprs Bulletin*, 24: 393 – 400.
- CALDWELL, D. E.; KORBER, W. G. and LAWRENCE, J. R. 1997. Cultivation of microbial consortia and communities, p. 79–90. In J. H. Hurst, Knudsen, G. R., McInnery, M. J., Stezenbach, L. D. and Walter, M. V. (ed.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, D.C.
- CARBONARO, M.; MATTERA, M.; NICOLI, S.; BERGAMO, P. and CAPPELLONI, M. 2002. Modulation of antioxidant compounds in organic vs. conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5458-5462. DOI: 10.1021/jf0202584.
- CHUNG, E. J.; LIM, H. K.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; PARK, E. J.; LEE, M. H.; CHUNG, Y. R. and LEE, S. –W. 2008. Forest Soil Metagenome Gene Cluster Involved in Antifungal Activity Expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 723–730. DOI: 10.1128/AEM.01911-07.
- CONACHER, J. and CONACHER, A. 1998. Organic farming and the environment, with particular reference to Australia: a review. *Biological and Agricultural Horticulturae*, 16: 145-171. DOI: 10.1080/01448765.1998.9755229.

- DUARTE, R. T.; GALLI, J. C.; PAZINI, W. C. e CALORE, R. A. 2012. Dinâmica populacional de *Triozioida limbata*, *Costalimaita ferruginea* e inimigos naturais em pomar orgânico e convencional de goiaba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34: 727-733. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000300011>.
- FAORO, H. 2010. Prospecção metagenômica de biocatalisadores da microbiota de solos da floresta atlântica paranaense. Curitiba: Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 215f.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:1145-1152. DOI 10.1007/s00253-007-1077-7.
- GLOVER, J. D.; REGANOLD, J. P. and ANDREWS, P. K. 2000. Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 80:29-45. PII: S0167-8809(00)00131-6.
- GUANAPALA, N. and SCOW, K. M. 1998. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 805-816. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00162-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00162-4).
- HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:669-685. DOI: 10.1128/MBR.68.4.669-685.2004
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J. and GOODMAN, R. M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5:245-249. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9).
- MALUCHE-BARETTA, C. R. D.; KLAUBERG-FILHO, O.; AMARANTE, C. V. T.; RIBEIRO, G. M. e ALMEIDA D. 2007. Atributos microbianos e químicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçãs no estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31:655-665.
- MELO, A. J. 2012. Metagenômica: busca de novos genes envolvidos com biodegradação de hidrocarbonetos. Natal: Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 66f.

- MIRETE, S.; FIGUERAS, C. G. and PASTOR, J. E. G.- 2007. Novel Nickel Resistance Genes from the Rhizosphere Metagenome of Plants Adapted to Acid Mine Drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6001–6011. DOI:10.1128/AEM.00048-07.
- PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J. and OLSEN, G. J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbiol Ecology*, 9:1–55. DOI: 10.1007/978-1-4757-0611-6_1.
- PECK, G. M.; ANDREWS, P. K.; REGANOLD, J. P. AND FELLMAN, J. K. 2006. Apple orchard productivity and Fruit quality under organic, conventional and integrated management. *HortScience*, 41:99-107.
- RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. and GOODMAN, R. M. 2000. Cloning the soil metagenome: A Strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied And Environmental Microbiology*, 66:2541-2547. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000.
- SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T. and SUMNER, M. E. 1996. *Methods of soil analysis. Part 3 - Chemical methods.* pp. XXI + 1390 pp. ISBN: 0-89118-825-8
- TAGLIARI, P. S. 2001. Agricultores familiares produzem a maçã agroecológica. *Agropecuária Catarinense*, 14:26-31. ISSN 0103-0779.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. and VOLKWEISS, S. J. 1995. *Análises de solo, plantas e outros materiais.* 2 ed. Revisada e ampliada – Porto Alegre: Departamento do solos, UFRGS. 174p.
- TORSVIK, V., and OVREAS, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5:240–245.
- VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K. -E. and STREIT, W. R. 2003. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:6235–6242. DOI: 10.1128/AEM.69.10.6235-6242.2003.
- WEIBEL, F. P.; BICKEL, R.; LEUTHOLD, S. and ALFÖLDI, T. 2000. Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using

conventional and alternative methods to measure fruit quality. *Acta Horticulturae*, 517:417-426.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade microbiana em ecossistemas do solo excede, de longe, a de organismos eucarióticos, onde um grama de solo pode abrigar até 10 bilhões de micro-organismos de, possivelmente, milhares de espécies diferentes (Torsvik & Øvreas, 2002). Como menos de 1% dos micro-organismos observados sob o microscópio são cultivados e caracterizados, os ecossistemas do solo são, em grande parte, não mapeados. A diversidade microbiana possui certa complexidade e variabilidade em diferentes níveis de organização biológica (Torsvik & Øvreas, 2002). Os micro-organismos estão envolvidos nos ciclos biogeoquímicos de nutrientes e têm, portanto, um papel crucial na biosfera (Bertin et al., 2011) e o ecossistema microbiano constitui o maior reservatório da biodiversidade do nosso planeta (Bertin et al., 2011). Diferentes gêneros bacterianos são componentes vitais no solo, estando envolvidos em diversas atividades bióticas do ecossistema solo tornando-o mais dinâmico na captura de nutrientes e deixando a produção de culturas mais sustentável (Ahemad & Kibret, 2014). O estudo das estruturas genéticas das populações microbianas é importante não somente para o entendimento do seu papel ecológico no ambiente natural, mas também para qualquer aplicação biotecnológica, em que é necessário prever o destino dos micro-organismos geneticamente modificados libertados para o ambiente e para identificar a fonte de surtos epidêmicos de bactérias patogênicas (Di Cello et al., 1997). Os micro-organismos benéficos do solo estimulam o crescimento das plantas através da mobilização de nutrientes no solo, produzindo vários reguladores de crescimento de plantas, protegendo as plantas de fitopatógenos, controlando ou inibindo-os, melhorando a estrutura do solo e biorremediando os solos poluídos por sequestro de espécies de metal pesado tóxico e degradando componentes xenobióticos, como os pesticidas (Ahemad & Kibret, 2014).

O interesse em micro-organismos do solo vem aumentando ao longo dos anos, por eles serem o fator chave da ciclagem de nutrientes e manutenção da fertilidade do solo. Assim como as rizobactérias que estabelecem interações positivas com as raízes das plantas, bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) desempenham um papel fundamental em ambientes agrícolas e são promissores para seu uso potencial na agricultura sustentável (Di Cello et al., 1997). As PGPBs podem estimular o crescimento das plantas de forma indireta (prevenindo efeitos deletérios de micro-organismos fitopatogênicos) ou direta (sintetizando substâncias que favorecem o crescimento das plantas ou capturando determinados nutrientes). Sendo assim, bactérias que possuem uma ou mais dessas características são reais candidatas a serem

utilizadas como ferramenta de biotecnologia, na formulação de inoculantes comerciais com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas agrícolas.

O sistema de manejo do solo (aração, gradagem, inundação, drenagem, irrigação, remoção da camada arável – por erosão ou trabalhos de engenharia, desidratação, solarização, fumigação, esterilização do solo, entre outros), como também o uso de insumos agrícolas, como os fertilizantes minerais e orgânicos (adição de carbônico orgânico na forma de esterco, adubo verde, composto, restos animais, etc) e os agrotóxicos, promovem modificações diversas na microbiota, através de seus efeitos diretos e indiretos sobre os fatores relacionados ao solo e à planta (Siqueira & Franco, 1988). Esses efeitos podem resultar em mudanças qualitativas e quantitativas na densidade total ou atividades específicas, podendo favorecer ou diminuir a proliferação de grupos, espécies minoritárias ou espécies novas, levando a comunidade a um novo equilíbrio, que pode favorecer ou afetar negativamente o crescimento das plantas e a produtividade do solo (Siqueira & Franco, 1988).

Nos últimos anos os estudos sobre a caracterização das comunidades microbianas vêm avançando, especialmente no desenvolvimento de novas tecnologias como a metagenoma e o sequenciamento em massa, que dispensam o cultivo de micro-organismos. A constatação de que a maioria dos micro-organismos não pode ser cultivada facilmente em cultura pura forçou os microbiologistas a questionarem as suas crenças de que o mundo microbiano havia sido conquistado (Handelsman, 2004). Pesquisadores, em geral, foram forçados a substituir esta crença por um reconhecimento da extensão da nossa ignorância sobre a gama de diversidade metabólica e organismos. No centro desta revolução estava a demonstração convincente de que o mundo microbiano, desconhecido e invisível, poderia ser estudado (Handelsman, 2004). Em meados da década de 1980, os microbiologistas desenvolveram novas metodologias para trabalhar com micro-organismos que não eram cultiváveis em meios normais de laboratório (Handelsman, 2004). Os recentes crescimentos na área de genômica têm dado uma oportunidade sem precedentes de obter informações sobre a estrutura e o funcionamento das comunidades microbianas (Bertin, et al., 2011). A genômica ambiental ampliou sua análise para além dos estudos taxonômicos, permitindo a caracterização de todo o conjunto de genes de uma comunidade e sua expressão (Bertin et al., 2011). Essas abordagens dão uma visão integrada dos ecossistemas, e são de grande interesse para interpretar os metabolismos presentes em nichos ecológicos considerados como extremos, incluindo aqueles afetados pelas atividades humanas (Bertin, et al., 2011).

Embora se tenha alguns trabalhos que relatam o isolamento de PGPBs de cultura da maçã e/ou que relatam a diversidade diferente das colônias encontradas nos pomares dessa cultura (Bonaterra, et al., 2003; Mehta et al., 2013a; Mehta et al., 2013b; Thakur, et al., 2013; Kurek et al., 2013), pouco se conhece sobre essa interação planta-bactéria em pomares do sul do Brasil.

A região sul do Brasil é responsável por mais de 95% da produção nacional de maçãs (IBGE – LSPA, agosto de 2013) e, desta produção (1.226.555 t), o estado de Santa Catarina, no ano safra 2012/2013, foi responsável por 45%, ocupando o segundo lugar como maior produtor nacional, ficando atrás somente do estado do Rio Grande do Sul. Um dos objetivos principais desse trabalho foi isolar e identificar bactérias cultiváveis associadas à rizosfera e a raízes de macieira. Foram também avaliadas as capacidades de promoção de crescimento vegetal de isolados bacterianos, onde alguns selecionados foram testados em planta, a fim de direcionar o isolamento de possíveis PGPBs que despertem interesse para a produção de inoculantes. Em sequência a esse trabalho foi realizada uma seleção de clones metagenômicos que induzissem a resistência sistêmica em macieira contra o ataque do fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides*, a fim de que, em se encontrando um clone positivo para o controle da doença em macieira, possa-se com isso despertar interesse também na produção de inoculantes baseados nesse clone, que ajudem no controle biológico contra agentes fitopatógenos.

Para alcançar os primeiros objetivos propostos no trabalho foram coletados solo e raízes de pomares de macieiras, de dois sistemas de produção diferentes, convencional e orgânico, além de solo de uma área de campo nativo que nunca foi utilizada para a produção agrícola, com o intuito de se ter um comparativo da diversidade microbiana em solo sem a interferência do homem com os já manejados. Bactérias diazotróficas foram, então, isoladas e caracterizadas em nível de gênero. Avaliaram-se as características de promoção de crescimento vegetal de cada isolado obtido, tais como: produção de sideróforo, solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos, além da característica de efeito antagonista contra o fungo *C. gloeosporioides*. Cinco destes isolados, contendo pelo menos três das características promotoras de crescimento vegetal supra-citadas foram escolhidos e testados em experimento com planta sob condições de casa de vegetação. Os resultados obtidos indicaram a presença de diferentes populações de PGPBs, tanto na rizosfera como dentro das raízes da macieira, nos dois sistemas produtivos de maçã, assim como em solo nativo. *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Cedecia*, *Leclercia*, *Stenotrophomonas*, *Rhanella* e

Ewingella foram os gêneros bacterianos predominantes entre todos os identificados. Dentre todos os isolados obtidos, cinco apresentaram as características de promoção de crescimento testadas, além da ação antagônica contra o fungo *C. gloeosporioides*. Vinte e quatro destes isolados bacterianos apresentaram três características de promoção de crescimento (solubilização de fosfato, produção de sideróforo e produção de compostos indólicos). A grande maioria dos isolados bacterianos (250 isolados – 83,33% do total obtido) apresentou pelo menos duas destas características em conjunto. Além disso, um isolado testado em planta, sob condições de casa de vegetação, foi o que apresentou o melhor resultado na diminuição da progressão da doença (mancha foliar em macieira), causada pelo fungo *C. gloeosporioides*. Cinco dias após a inoculação dos esporos fúngicos, as plantas com esse isolado apresentaram, em média com 30% de sua área foliar necrosada, enquanto que nos demais tratamentos as plantas apresentaram de 60 a 70% de área foliar necrosada.

Como perspectiva, o isolado que apresentou a significativa diminuição da doença em planta será caracterizado em nível de espécie e testado em experimento em campo, para posterior desenvolvimento de um inoculante para as culturas de macieira do sul do Brasil.

Para auxiliar na busca de linhagens bacterianas que possam ser utilizadas na composição de produtos inoculantes, foi utilizada a técnica de metagenoma, em uma tentativa de encontrar, dentre os micro-organismos ainda desconhecidos na natureza e que ainda não são possíveis de serem multiplicados em laboratório, fragmentos de DNA que possuam a característica de serem transcritos e, então, traduzidos em biomoléculas (proteínas, enzimas) que possam ter características de interesse biotecnológico, como indução de resistência contra patógenos em geral e produção de hormônios de crescimento vegetal. Apesar de os testes realizados com clones metagenômicos não terem apresentados resultados positivos para o objetivo de controlar a ação do fungo *C. gloeosporioides*, trabalhos utilizando essa técnica foram eficientes em encontrar resultados positivos para diversas moléculas de interesse biotecnológico, agrícola, veterinário, medicinal e farmacológico (Owen et al., 2013; Belák et al., 2013; McCallin et al., 2013; Kouzuma et al., 2013;).

Após todos os testes realizados, resultados preliminares importantes de interesse agrônomo foram obtidos nesse trabalho. Porém pouco ainda se sabe sobre bactérias diazotróficas cultiváveis conhecidas da cultura da macieira. No entanto, com o advento da metagenômica, micro-organismos não cultiváveis do solo poderão ter seu DNA e/ou parte dele desvendado, e, assim, obter uma gama imensurável para ser usada com fins

biotecnológicos na cultura da maçã. Dessa forma, as informações adquiridas com a metagenômica, associada com as informações já existentes de PGPBs, poderão trazer mais resultados positivos de associações bacterianas que visam à promoção do crescimento vegetal, bem como o efeito bacteriano antagonista no controle de agentes fitopatogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEMAD, M. and KIBRET, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26:1–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- ALTIERI, M. A. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74:19-31. PII: S0167-8809(99)00028-6.
- AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F. G.; VARGAS, L. K. and PASSAGLIA, L. M. P. 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.
- BARETTA, C. R. D. M.-; KLAUBERG-FILHO, O.; AMARANTE, C. V. T.; RIBEIRO, G. M. and ALMEIDA, D. 2007. Atributos microbianos e químicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçãs no estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 655-665.
- BARKA, E. A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J. and AUDRAN, J. -C. 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 186:91-95. PII: S 0 3 7 8 - 1 0 9 7 (0 0) 0 0 1 2 3 – 3.
- BARKA, E. A.; GOGNIES, S.; NOWAK, J.; AUDRAN, J. –C. and BELARBI, A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24:135-142. PII: S1 0 4 9 -9 6 4 4 (0 2)0 0 0 3 4-8.
- BELÁK, S.; KARLSSON, O. E.; BLOMSTRÖM, A. –L.; BERG, M. and GRANBERG, F. 2013. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Veterinary Microbiology*, 165: 95–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.022>.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; ZANETTINI, M. H. B. and PASSAGLIA, L. M. P. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39:311–320. DOI:10.1016/j.apsoil.2008.01.006.
- BENHAMOU, N.; BELANGER R. R.; and PAULITZ, T. C. 1996. Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 86:114–178. ISSN: 0031-949X CODEN : PHYTAJ.

- BERTIN, P. N.; SALMERON, A. H.-; PELLETIER, E.; CHOLLET, F. G.; PLOETZE, F. A.-; GALLIEN, S.; LAUGA, B.; CASIOT, C.; CALTEAU, A.; VALLENET, D.; BONNEFOY, V.; BRUNEEL, O.; MING, B. C.- W.-; ARNOLD, J. C.-; DURAN, R.; POULICHET, F. E.-; FONKNECHTEN, N.; GILOTEAUX, L.; HALTER, D.; KOECHLER, S.; MARCHAL, M.; MORNICO, D.; SCHAEFFER, C.; SMITH, A. A. T.; DORSSELAER, A. V.; WEISSENBACH, J.; MÉDIGUE, C. and PASLIER, D. L. 2011. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *The ISME Journal*, 5:1735–1747. DOI:10.1038/ismej.2011.51.
- BLOEMBERG, G. V. and LUGTENBERG, B. J. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:343–350. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7).
- BONATERRA, A.; RUZ, L.; BADOSA, E.; PINOCHET, J. and MONTESINOS, E. 2003. Growth promotion of *Prunus* rootstocks by root treatment with specific bacterial strains. *Plant and Soil*, 255:555–569. DOI: 10.1023/A:1026033115984.
- BOUKHALFA, H. and CRUMBLISS, A. L. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals*, 15:325–339. DOI: 10.1023/A:1020218608266.
- BRAGA, H. J.; SILVA JR., V. P.; PANDOLFO, C. and PEREIRA, E. S. 2001. Zoneamento de riscos climáticos da cultura da maçã no estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 9:439-445. ISSN 0104-1347.
- BROWN, M. E. 1974. Seed and root bacterization. *Annual Review Phytopathology* 12, 181–197. DOI: 10.1146/annurev.py.12.090174.001145.
- CAMILO, A. P. 1989. Genetic resistance in *Malus* to *Glomerella cingulata* (Stoneman) Paulding & Von Schrenk: Sources of resistance, leaf infection, progeny evaluation, and pathogenicity. 116f. Tese, Cornell University, Ithaca.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C. and BARKA, E. A. 2005a. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:4951–4959. DOI: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.
- COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C. and BARKA, E. A. 2005b. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1685–1693. DOI: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005.

- DALE, S. E.; KIRBY, A. D.-; LAJOIE, G. and HEINRICH, D. E. 2004. Role of Siderophore Biosynthesis in Virulence of *Staphylococcus aureus*: Identification and Characterization of Genes Involved in Production of a Siderophore. *Infection And Immunity*, 72:29-37. DOI: 10.1128/IAI.72.1.29–37.2004.d
- DANIEL, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature reviews | Microbiology*, 3:470-478. DOI: 10.1038/nrmicro1160.
- DENARDI, F.; BERTON, O. and SPENGLER, M. M. 2003. Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 494-497.
- DI CELLO, F.; BEVIVINO, L.; CHIARINI, R.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; and DALMASTRI, C. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4485-4493.
- DIXON, R. and KAHN, D. 2004. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Nature Reviews | Microbiology*, 2: 621-631. DOI: 10.1038/nrmicro954.
- DONG, Y. -H.; ZHANG, X. -F.; XU, J. -L. and ZHANG, L. -H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silence *Erwinia carotovora* Virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:954-960. DOI: 10.1128/AEM.70.2.954–960.2004.
- DORAN, J. W. and ZEISS, M. R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15: 3-11. PII: S0929-1393(00)00067-6.
- FAORO, H. 2010. Prospecção metagenômica de biocatalisadores da microbiota de solos da floresta atlântica paranaense. Curitiba: Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 215f.
- FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S. B.; LISBOA, B. B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L. K. and PASSAGLIA, L. M. P. 2012. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Applied Soil Ecology*, 55: 44-52. DOI:10.1016/j.apsoil.2011.12.011.
- GLICK, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109-117. DOI: 10.1139/m95-015.
- GLOVER, J. D.; REGANOLD, J. P. and ANDREWS, P. K. 2000. Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 80: 29-45. PII: S0167-8809(00)00131-6.

- GRAY, E. J. and SMITH, D. L. 2005. Intracellular and extracellular PGPB: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*, 37:395–412. DOI:10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
- HAAS, D. and DÉFAGO, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews | Microbiology*, 1-13. DOI:10.1038/nrmicro1129.
- HALBLEIB CM and LUDDEN PW. 2000. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *JN The Journal of Nutrition*, 130: 1081–1084.
- HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:669-685. DOI: 10.1128/MBR.68.4.669–685.2004.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J. and GOODMAN, R. M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5:245-249. ISSN: 1074-5521.
- JEON, J. H.; KIM, J. T.; KIM, Y. J.; KIM, H. K.; LEE, H. S.; KANG, S. G.; KIM, S. – J. and LEE, J. H. 2009. Cloning and characterization of new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 81: 865-874. DOI: 10.1007/s00253-008-1656-2.
- KOUZUMA, A.; KASAI, T.; NAKAGAWA, G.; YAMAMURO, A.; ABE, T. and WATANABE, K. 2013. Comparative Metagenomics of Anode-Associated Microbiomes Developed in Rice Paddy-Field Microbial Fuel Cells. *Plos one*, 8:1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0077443.
- KUREK, E.; OZIMEK, E.; SOBICZEWSKI, P.; SLOMKA, A. and SCISEL, J. J. 2013. Effect of *Pseudomonas luteola* on mobilization of phosphorus and growth of young apple trees (Ligol)—Pot experiment. *Scientia Horticulturae*, 164:270–276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.012>.
- Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA): pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil / Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). - (agosto, 2013) - Rio de Janeiro v.26 n.8 p.1-84: IBGE. 2013. ISSN: 0103-443X.
- MASSINI, K. C. 2009. Bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA metagenômico de solo de mata atlântica. Tese (Doutorado em Ciências-Microbiologia). Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo. 114f.

- McCALLIN, S.; SARKER, S. A.; BARRETTO, C.; SULTANA, S.; BERGER, B.; HUQ, S.; KRAUSE, L.; BIBILONI, R.; SCHMITT, B.; REUTELER, G. and BRÜSSOW, H. 2013. Safety analysis of a Russian phage cocktail: From MetaGenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology*, 443:187–196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.022>.
- MEHTA, P.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; KULSHRESTHA, S. and SHIRKOT, C. K. 2013a. Phosphate solubilisation and plant growth promoting potential by stress tolerant *Bacillus* sp. isolated from rhizosphere of apple orchards in transHimalayan region of Himachal Pradesh. *Annals of Applied Biology*, 163:430–443. doi:10.1111/aab.12077.
- MEHTA, P.; WALIA, A.; CHAUHAN, A. and SHIRKOT, C. K. 2013b. Plant growth promoting traits of phosphate-solubilizing rhizobacteria isolated from apple trees in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Archives of Microbiology*, 195:357–369. DOI: 10.1007/s00203-013-0881-y.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P. and MALIK, K. A. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant and Soil*, 237:47–54. DOI: 10.1023/A:1013388619231.
- MORINOTO, S. and FUJI, T. 2009. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83:389-396. DOI: 10.1007/s00253-009-1992-x.
- M'PIGA, P.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T. C. and BENHAMOU, N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:301-320. <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.1997.0088>.
- OWEN, J. G.; REDDY, B. V. B.; TERNEI, M. A.; POWERS, Z. C.-; CALLE, P. Y.; KIM, J. H. and BRADY, S. F. 2013. Mapping gene clusters within arrayed metagenomic libraries to expand the structural diversity of biomedically relevant natural products. *PNAS*, 110: 11797-11802. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1222159110.
- PATTEN, C. L. and GLICK, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795–3801. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3795–3801.2002.

- PEREIRA, L. B.; SIMIONI, F. J. and CARIO, S. A. F. 2006. Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: Novas estratégias em busca da competitividade. p. 1-25.
- PETERS, J. W.; FISCHER, K. and DEAN, D. R. 1995. Nitrogenase structure and function: A biochemical-genetic perspective. *Annual Review of Microbiology*, 49: 335-366. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.002003.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J. and VAN LOON, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10:1571-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.10.9.1571>.
- RAJKUMAR, M.; NAGENDRAN, R.; LEE, K. J.; LEE, W. H. and KIM, S. Z. 2006. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* 62: 741–748. DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.04.117.
- RODRÍGUEZ, H. and FRAGA, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319–339. PII: S0734-9750(99)00014-2.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T. and BASHAN, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287:15–21. DOI: 10.1007/s11104-006-9056-9.
- RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. and GOODMAN, R. M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2541-2547. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000.
- SCHLOSS, P. D. and HANDELSMAN, J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 303-310. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00067-3
- SCHLÜTER, A.; BEKEL, T.; DIAZ, N. N., DONDRUP, M.; EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K-H.; KRAHN, I.; KRAUSE, L.; KRÖMEKE, H.; KRUSE, O.; MUSSGUG, J. H.; NEUWEGER, H.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A.; RUNTE, K. J.; SZCZEPANOWSKI, R.; TAUCH, A.; TILKER, A.; VIEHÖVER, P. and GOESMANN, A. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-

- pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology*, 136: 77-90. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.05.008.
- SHAH, J.; TSUI, F. and KLESSIG, D. F. 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai 1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA – induce expression of the *tms2* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 69-78. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.69>.
- SHARMA, V. K. and NOWAK, J. 1998. Enhancement of Verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedling with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 528-536. DOI: 10.1139/w98-017.
- SIDDIQUI, Z. A. 2006. PGPB: Biocontrol and Biofertilization, ed. Springer, Netherlands, p.1-318.
- SIQUEIRA, J. O. E FRANCO, A. A. 1988. *Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 236p.
- SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P. B.; MEYER, J.; VARGAS, L. K.; SCHOENFELD, R. and PASSAGLIA, L. M. P. 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. DOI:10.1007/s11104-012-1430-1.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. 2013. *Fisiologia vegetal*. 5 ed. – Porto Alegre: Artmed. 918p.
- TEIXEIRA, D. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; MAFFIA, L. A. e FERREIRA, E. M. 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 350-356. (INPI) PI 0101400-5; 001409.
- THAKUR, D.; KAUR, M. and SHYAM, V. 2013. Management of replant problem by the production of plant growth regulators and phosphate solubilising potential of fluorescent pseudomonas spp. isolated from the normal and replant sites of apple and pear. *Indian Streams Research Journal*, 3: 1-11. ISSN:-2230-7850.
- TORSVIK, V. and ØVREAS, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240–245.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. and CASE, C. L. 2012. *Microbiologia*. 10^a ed., Porto Alegre: Artmed, 934p. ISBN 978-85-363-2606-1.
- VAN LON, L. C. 1997. Induced Resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 753-765.

- VAN LOON, L. C.; Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic Resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews Phytopathology*, 36: 453-83. DOI: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453.
- VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; CORTES, A. L.- and BASHAN, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30:460–468.
- VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKONCH, C.; ROGERS, Y-H. and SMITH, H. O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. *Science*, 304: 66-74. DOI: 10.1126/science.1093857.
- VISWANATHAN, R. and SAMIYAPPAN, R. 1999. Induction of Systemic Resistance by Plant Growth Promoting Rhizobacteria against Red Rot Disease in Sugarcane. *SUGAR TECH*, 1: 67-76.
- VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K. –E. and STREIT, W. R. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6235-6242. DOI: 10.1128/AEM.69.10.6235-6242.2003.
- WERNER, M.R. 1997. Soil quality characteristics during conversion to organic orchard. *Applied Soil Ecology*, 5: 151-167. PII S0929- 1 393(96)001 39-4.