



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

***Burkholderia contaminans*: genômica, antagonismo a fitopatógenos e
promoção de crescimento de soja (*Glycine max* L. Merr.).**

JULIETH PAOLA CARVAJAL JAIMES

Brasília-DF

2025

JULIETH PAOLA CARVAJAL JAIMES

***Burkholderia contaminans*: genômica, antagonismo a fitopatógenos e promoção de crescimento de soja (*Glycine max* L. Merr.).**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientadora

Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira

Brasília-DF

Distrito Federal-Brasil

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Jaimes, J.P.C. ***Burkholderia contaminans*: genômica, antagonismo a fitopatógenos e promoção de crescimento de soja (*Glycine max* L. Merr.)** / Julieth Paola Carvajal Jaimes
Brasília-DF, 2025

Número de páginas. 100

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília – UnB.

1. Complexo *Burkholderia cepacia*, Biocontrole, PGPB, *Rhizoctonia solani*
 - I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.
 - II. *Burkholderia contaminans*: genômica, antagonismo a fitopatógenos e promoção de crescimento de soja

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira com apoio da CAPES/ MEC.

***Burkholderia contaminans*: genômica, antagonismo a fitopatógenos e promoção de crescimento de soja (*Glycine max* L. Merr.)**

JULIETH PAOLA CARVAJAL JAIMES

DISSERTAÇÃO APROVADA em ____/____/____ por:

Professor, Doutor Eder Marques (Universidade Federal de Goiás)

Examinador Externo

Professor, Doutor Helson Mário Martins do Vale (Universidade de Brasília)

Examinador Interno

Professora, Doutora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira

(Presidente)

Professor, Doutor Danilo Batista Pinho

(Suplente)

Brasília-DF
Distrito Federal-Brasil
2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, orientação e perseverança que me concedeu ao longo dessa jornada

À minha família: meus pais, Gloria e Gustavo; meus irmãos, Lendy, Johan e Daniel; minha madrinha, Ludy; e minha sobrinha Mariana, pelo apoio constante, incentivo e amor incondicionais, que me motivam a seguir em busca dos meus sonhos.

A meu namorado, Cesar, pelo apoio incondicional mesmo à distância, por estar sempre presente com palavras de incentivo nos momentos de decisões difíceis e por me motivar a seguir em frente. À professora Zamira Delgado, pelo suporte essencial durante o processo de inscrição no mestrado.

Agradeço aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília pelos ensinamentos e pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos, tornando possível a realização de um sonho: o Mestrado em Fitopatologia.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, e ao professor Maurício pela colaboração, paciência, suporte, dedicação, disposição, compreensão e, acima de tudo, pela motivação e confiança durante a realização do projeto, especialmente nos momentos de dificuldade e fraqueza.

Ao Dr. Danilo Batista Pinho, pela colaboração e pela disponibilização dos isolados de culturas fúngicas utilizados neste estudo, pertencentes à coleção de trabalho de Micologia Vegetal PPG-FIT da Universidade de Brasília.

Aos meus colegas e amigos do PPG-FIT: Angélica, Luciellen, Leila, Erivaldo, Ian, Alice, José, Jefferson, Clemildo, Laura, Thaís e Abner, pela solidariedade, ajuda durante o desenvolvimento deste projeto e pela amizade, que foi tão importante, especialmente quando cheguei ao Brasil sem conhecer ninguém. Ao Gabriel, que me ajudou com as análises estatísticas e na elaboração dos gráficos.

Agradeço à Capes pela concessão da bolsa e pelo financiamento deste projeto, e à Universidade de Brasília pela oportunidade de realizar meu mestrado no Brasil.

SUMARIO

RESUMO GERAL	11
GENERAL ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	15
1. O gênero <i>Burkholderia</i>	15
1.1 História.....	15
1.2 Taxonomia.....	15
1.3 Potencial patogênico	16
1.4 Potencial benéfico	17
1.5 Metabólitos secundários produzidos por <i>Burkholderia</i> spp.	19
1.6 Características morfológicas e bioquímicas de <i>Burkholderia</i> spp.	20
2. O complexo <i>Burkholderia cepacia</i> (CBC)	20
3. <i>Burkholderia contaminans</i> (Bco)	21
3.1 Descoberta e classificação.....	21
3.2 Características morfológicas e bioquímicas	21
3.3 Características do genoma.....	22
3.4 Associação com plantas	22
3.5 Papel de Bco no biocontrole.....	23
3.6 Papel de Bco na promoção de crescimento de plantas	24
4. Justificativa e Objetivos	25
4.1 Objetivo geral.....	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. Referências Bibliográficas	26
INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1 Isolamento e caracterização da bactéria.....	40
2.2 Extração de DNA.....	40

2.3	Sequenciamento do genoma	41
2.4	Identificação da espécie bacteriana por Identidade Média de Nucleotídeos (ANI).....	42
2.5	Características genômicas da espécie	44
2.6	Identificação de genes.....	45
2.6.1	Genes de resistência a antibióticos	45
2.6.2	Genes de virulência e patogenicidade	45
2.6.3	Genes de metabólitos secundários.....	45
2.6.4	Genes de promoção de crescimento	45
2.7	Seleção de regiões genômicas exclusivas para Bco e desenho de <i>primers</i> para PCR	46
2.8	Ensaio <i>in vitro</i> dos testes de antagonismo, compostos voláteis, sideróforos e de resistência a antibióticos	47
2.8.1	Microrganismos e condições de crescimento para teste de antagonismo.....	47
2.8.2	Ensaio <i>in vitro</i> de dupla cultura (fungos e oomicetos)	48
2.8.3	Ensaio <i>in vitro</i> em dupla camada (bactérias).....	49
2.8.4	Compostos voláteis.....	49
2.8.5	Ensaio de sideróforos.....	50
2.8.6	Teste de resistência a antibióticos	51
2.9	Potencial de Bco UnB1430 como antagonista e promotor de crescimento de plântulas	52
2.9.1	Material vegetal e microbiolização das sementes.....	52
2.9.2	Experimento 1: Potencial de biocontrole de UnB1430 contra <i>Rhizoctonia solani</i> .	53
2.9.3	Experimento 2: Avaliação de <i>Burkholderia contaminans</i> UnB1430 como promotora de crescimento.....	55
2.10	Análises estatísticas	56
3.	RESULTADOS	57
4	DISCUSSÃO.....	82
5	REFERÊNCIAS	88
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	ANEXOS	97
	MATERIAL SUPLEMENTAR	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies, isolados e acessos de <i>Burkholderia</i> e <i>Paraburkholderia</i> extraídas do GenBank para as análises filogenéticas e o desenho dos <i>primers</i>	42
Tabela 2. Espécies bacterianas utilizadas para os testes de especificidade dos <i>primers</i>	47
Tabela 3. Isolados de fungos, oomicetos e bactérias utilizados neste estudo para os testes <i>in vitro</i> de antagonismo	47
Tabela 4. Grupos e respectivos nomes dos antibióticos testados e concentrações para avaliar a reação da cepa UnB1430 de <i>Burkholderia contaminans</i>	51
Tabela 5. Descrição dos tratamentos implementados nos experimentos para avaliação do potencial antagonista de UnB1430 contra <i>Rhizoctonia solani</i> em plântulas de soja	54
Tabela 6. Descrição dos tratamentos implementados nos experimentos para avaliação do potencial de promoção de crescimento de soja pela cepa UnB1430	55
Tabela 7. Características gerais do genoma da cepa UnB1430 de <i>Burkholderia contaminans</i>	58
Tabela 8. Principais fatores de virulência de <i>Burkholderia</i> e genes identificados no genoma da cepa UnB1430	60
Tabela 9. Cluster de genes biossintéticos (BGCs) identificados no genoma de <i>B. contaminans</i> UnB1430 pelo antiSMASH	61
Tabela 10. Lista dos <i>primers</i> desenhados com base no genoma de <i>B. contaminans</i> e seus respectivos amplicons.	64
Tabela 11. Avaliação da atividade antifúngica de <i>Burkholderia contaminans</i> UnB1430 contra fungos fitopatogênicos por dois diferentes métodos	67
Tabela 12. Avaliação da atividade de antibiose de <i>Burkholderia contaminans</i> UnB1430 contra bactérias fitopatogênicas	70
Tabela 13. Inibição do crescimento de três fungos fitopatogênicos da soja por efeito da produção de compostos voláteis da bactéria <i>Burkholderia contaminans</i> UnB1430	72
Tabela 14. Sensibilidade e resistência da bactéria UnB1430 a diferentes classes de antibióticos	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A.** Folhas de gerânio com manchas necróticas das quais foi feito o isolamento de *B. contaminans* UnB1430 **B.** Características culturais da bactéria isolada, cultivada em meio 523 a 28°C por 48 horas57
- Figura 2.** Distribuição percentual das funções associadas aos genes associados a promoção de crescimento identificados no genoma de UnB1430, por médio da PLaBAs63
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose dos amplicons gerados por PCR com três pares de *primers*: BurkC, F1/R1, F4/R4 e F3/R3, utilizando DNA de dois isolados de *B. contaminans* (UnB1430 e 1431). As reações foram realizadas com temperatura de anelamento de 57,5°C para F1/R1 (fragmento de 205 pb), 59,3°C para F3/R3 (fragmento de 126 pb), e 60,1°C para F4/R4 (fragmento de 82 pb). M-marcador 1 Kb Kasvi. N-controle negativo (água)..65
- Figura 4.** Eletroforese do *primer*, BurkCF1/R1 com diversos isolados de bactérias fitopatogênicas da coleção de bacteriologia da UnB (tabela 2), com temperatura de anelamento de 57,5°C. M-marcador 1 Kb Kasvi. N-controle negativo.65
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose dos amplicons gerados por PCR com o par de *primers*, BurkCF3/R3 com diversos isolados de bactérias fitopatogênicas (Tabela 2), com temperatura de anelamento de 59,3°C. Tamanho do fragmento esperado: 126 pb. M-marcador 1 Kb Kasvi. N-controle negativo..66
- Figura 6.** Ensaios de cultura dupla para inibição do crescimento fúngico pelo efeito antagônico de *Burkholderia contaminans* UnB1430 a 25 °C, utilizando duas metodologias. As medições foram realizadas aos 8 dias após a inoculação (dpi) para *Diaporthe* sp. (D), *Bipolaris maydis*. (BM), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Macrophomina phaseolina* (MP); aos 10 dpi para *Fusarium graminearum* (FG) e *Alternaria alternata* (AA), e aos 15 dpi para *Colletotrichum karsti* (CK), *C. pluviorum* (CP), *Corynespora cassiicola* (CS), *F. solani* (FS), *Phytophthora palmivora* (PP), *P. theobromae* (PT) e *P. sojae* (PS).69
- Figura 7.** Ensaios de dupla camada para testar a antibiose de *Burkholderia contaminans* UnB1430 contra três gêneros de fitobactérias: *Ralstonia solanacearum* (CNPH-RS 607; CNPH-RS 507; CNPH-RS 702 e CNPH-RS 672); *Xanthomonas. phaseoli* pv. *manihotis* (EMBRAPA; UnB315; UnB17); *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (EH 2017-12 e EH 2017-27); *Pseudomonas syringae* (AM4-F-2021-55).71
- Figura 8.** Produção de sideróforos e compostos voláteis por *Burkholderia contaminans* UnB 1430
A. Mudança de cor para amarelo-laranja, indicando a produção de sideróforos pelo isolado UnB1430. CN- controle negativo; Bco com suplementação de ferro; Bco sem ferro. **B.** inibição do crescimento de *Macrophomina phaseolina* (MP), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Phytophthora sojae* (PS), no ensaio de compostos voláteis, evidenciando diferenças no crescimento dos fungos em

comparação ao controle. C. Halo de sensibilidade em resposta ao antibiótico testado, do grupo de tetraciclina (Minociclina-MIN, Doxiciclina-DOX e Tetraciclina-TET), fluoroquinolonas (Ciprofloxacina-CIP, Levofloxacina-LVX e Norfloxacina-NOR), macrolídeos (Azitromicina-AZI) e aminoglicosídeos (Aminocacina-AMI, Gentamicina-GEN, Estreptomicina-EST, Tobramicina-TOB, e Neomicina-NEO).....73

Figura 9. Potencial de *Burkholderia contaminans* UnB1430 para o biocontrole da podridão radicular da soja causada por *Rhizoctonia solani* em condições de casa de vegetação. (A) e (B): Avaliação em pré-emergência. (C) e (D): Avaliação em pós-emergência. Severidade= % Índice de severidade. Tratamentos Rs (apenas *R. solani*), Bco + Rs (plântulas tratadas com UnB1430 e *R. solani*), Bco (apenas UnB430) e o controle absoluto (plantas não inoculadas) (A) e (C): gráfico referente ao primeiro ensaio. (B) e (D): Gráfico referente à repetição do ensaio em um período posterior no tempo. ns= não significativo, * = significativo, ****= altamente significativo..76

Figura 10. Avaliação da promoção de crescimento por *Burkholderia contaminans* UnB1430 em plântulas de soja, considerando os seguintes parâmetros: (A) e (B) altura da planta; (C) e (D) comprimento da raiz; (E) e (F): peso fresco total da plântula. As avaliações foram realizadas aos 25 dias após a emergência (A, C e E) e aos 45 dias após a emergência (B, D e F). Valores médios com a mesma letra em cada avaliação não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$), conforme o teste Tukey.79

Figura 11. Efeito de *Burkholderia contaminans* UnB1430 na promoção de crescimento em plântulas de soja, considerando os parâmetros: (A) e (B) peso fresco da raiz. (C) e (D) peso seco total da plântula, (E) e (F) peso seco da raiz. As avaliações foram realizadas aos 25 dias após a emergência (A, C e E) e aos 45 dias após a emergência (B, D e F). Valores médios com a mesma letra em cada avaliação não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$), conforme o teste Tukey80

Figura 12. Efeito de *Burkholderia contaminans* UnB1430 na promoção de crescimento em plântulas de soja via inoculação nas sementes ou em suspensão nas plântulas, em duas concentrações da bactéria. A: avaliação aos 25 dias. B: avaliação aos 45 dias após emergência. 81

RESUMO GERAL

Jaimes, J.P.C. ***Burkholderia contaminans*: genômica, antagonismo a fitopatógenos e promoção de crescimento de soja (*Glycine max* L. Merr.)**. 2025. 100 p. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O gênero *Burkholderia*, inclui cepas amplamente distribuídas em solo, água e ambientes hospitalares, reconhecidas por sua relevância ambiental, industrial, biotecnológica e clínica. Espécies deste gênero produzem metabólitos secundários e sideróforos com ação fungicida e bactericida. *Burkholderia contaminans* (Bco) destaca-se pela capacidade de promover o crescimento vegetal, pela atividade antagônica contra fitopatógenos e por atuar na biorremediação. Neste estudo, o isolado Un1430, obtido de folhas de gerânio, foi identificado como *B. contaminans* (Bco) por meio de sequenciamento total do genoma utilizando a tecnologia Oxford Nanopore PromethION. A identidade nucleotídica média (ANI) superior a 95%, determinada com o programa fastANI, foi o critério utilizado para confirmação de sua classificação no nível de espécie. O isolado UnB1430 foi avaliado *in vitro* quanto à sua capacidade de antagonismo, antibiose, produção de sideróforos, compostos voláteis e resistência a antibióticos. Houve inibição significativa do crescimento de todos os fungos e bactérias avaliados (total de 23 espécies), com variações na atividade inibitória entre as espécies. O isolado também foi avaliado em condições de casa de vegetação quanto ao seu potencial para o biocontrole da podridão-radicular da soja causada por *Rhizoctonia solani*, em pré e pós-emergência, assim como pelo seu efeito como promotor de crescimento em plântulas de soja. Os resultados indicaram que UnB1430 reduziu visivelmente a severidade da doença em plântulas de soja, embora sem diferença significativa em relação às plântulas inoculadas apenas com *R. solani*. Por outro lado, as plântulas inoculadas com Bco nas sementes, em concentração de 10^8 UFC/mL, apresentaram maior peso seco em comparação com as não tratadas. A análise do genoma para identificar genes relacionados à produção de metabólitos secundários, promoção de crescimento, virulência e resistência a antibióticos, foi realizada utilizando as bases de dados antiSMASH, PLaBase, VFDB e CARD, e mostrou que Bco UnB1430 apresenta clusters de genes biossintéticos (BGCs) com mais de 50% de similaridade com clusters conhecidos, associados à biossíntese de N-aciloxiacil glutamina, pioquelina, ornibactina C4/C6/C8, pirrolnitrina e occidiofungina. Detectou-se a presença de genes relacionados à promoção de crescimento, associados a funções na assimilação de nutrientes, produção de fitohormônios e sideróforos. Já os genes de resistência a antibióticos (ARGs) estão relacionados a mecanismos mediados por bombas de efluxo, pertencentes às famílias de resistência, nodulação e divisão celular (RND) e resistência a múltiplas drogas (SMR). Além disso, o genoma exibiu ausência de sistemas de secreção associados à virulência, bem como de genes essenciais para adesão e motilidade invasiva, o que reforça o perfil não patogênico do isolado. Com base nas sequências genômicas, foram desenhados três pares de *primers* e um deles, BurkCF3/R3 mostrou-se específico para Bco, frente às demais bactérias testadas. Os resultados deste trabalho corroboram estudos anteriores e destacam o potencial de Bco como antagonista e promotor de crescimento de plantas.

Palavras-chave: Complexo *Burkholderia cepacia*, Biocontrole, PGPB, *Rhizoctonia solani*

Orientadora – Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira– Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

Jaimes, J.P.C. *Burkholderia contaminans*: genomics, antagonism to phytopathogens and growth promotion of soybean (*Glycine max* L. Merr.). 2025. 100 p. Master's Dissertation in Phytopathology - University of Brasília, Brasília, DF.

The genus *Burkholderia* includes strains widely distributed in soil, water and hospital environments, recognized for their environmental, industrial, biotechnological and clinical relevance. Species of this genus produce secondary metabolites and siderophores with fungicidal and bactericidal action. *Burkholderia contaminans* (Bco) stands out for its ability to promote plant growth, its antagonistic activity against phytopathogens and its role in bioremediation. In this study, the isolate UnB1430, obtained from geranium leaves, was identified as *B. contaminans* (Bco) through whole genome sequencing using Oxford Nanopore PromethION technology. The average nucleotide identity (ANI) greater than 95%, determined by the fastANI program, was the criterion used to confirm its classification at the species level. The isolate UnB1430 was evaluated in vitro for its antagonism, antibiosis, production of siderophores, volatile compounds and antibiotic resistance. There was significant growth inhibition of all fungi and bacteria evaluated (total of 23 species), with variations in inhibitory activity among species. The isolate was also evaluated under greenhouse conditions for its potential for biocontrol of soybean root rot caused by *Rhizoctonia solani*, in pre- and post-emergence, as well as for its effect as a growth promoter in soybean seedlings. The results indicated that UnB1430 visibly reduced the severity of the disease in soybean seedlings, although without significant difference, in relation to seedlings inoculated only with *R. solani*. On the other hand, seedlings inoculated with Bco in the seeds, at a concentration of 10^8 CFU/mL, presented greater dry weight compared to the untreated ones. Genome analysis to identify genes related to secondary metabolite production, growth promotion, virulence and antibiotic resistance was performed using the antiSMASH, PLaBase, VFDB and CARD databases, and showed that Bco UnB1430 presents biosynthetic gene clusters (BGCs) with more than 50% similarity to known clusters, associated with the biosynthesis of N-acyloxyacyl glutamine, pyochelin, ornibactin C4/C6/C8, pyrrolnitrin and occidiofungin. The presence of genes related to growth promotion, associated with functions in nutrient assimilation, phytohormone and siderophore production, was detected. On the other hand, antibiotic resistance genes (ARGs) are related to mechanisms mediated by efflux pumps, belonging to the resistance, nodulation and cell division (RND) and multidrug resistance (SMR) families. Furthermore, the genome exhibited the absence of secretion systems associated with virulence, as well as genes essential for adhesion and invasive motility, which reinforces the non-pathogenic profile of the isolate. Based on the genomic sequences, three pairs of primers were designed and one of them, BurkCF3/R3, was specific for Bco, compared to the other bacteria tested. The results of this work corroborate previous studies and highlight the potential of Bco as an antagonist and plant growth promoter.

Keywords: *Burkholderia cepacia*, complex, Biocontrol, PGPB, *Rhizoctonia solani*

Supervisor – Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira– University of Brasilia

INTRODUÇÃO GERAL

Diferentes tipos de interações podem ocorrer entre plantas e bactérias, variando de associações benéficas (sinérgicas), prejudiciais (patogênicas) além de interações neutras (comensalismo) (Vishwakarma et al. 2020). Dentre as benéficas, destacam-se as bactérias endofíticas que vivem dentro dos tecidos vegetais sem causar doenças, fornecendo nutrientes ou atuando como agentes de proteção contra patógenos (Pal et al. 2022). Essas bactérias podem ser provenientes das sementes ou de solo (Verma et al. 2019; Taulé et al. 2021), colonizando espaços intercelulares em um tecido específico ou colonizando a planta sistemicamente através dos vasos do xilema (Compant et al. 2010)

Neste estudo foi isolada uma bactéria endofítica (UnB1430) das folhas do gerânio (*Pelargonium graveolens*) provenientes de uma área de produção de óleo essencial em Brasília–DF. As folhas apresentavam manchas necróticas com um halo amarelo, inicialmente suspeitando-se da presença da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*. No entanto, essa hipótese foi descartada após o resultado negativo na PCR para a região conservada no gênero que codifica a síntese da goma xantana. Em seguida, testes de infiltração em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e tomate Santa Cruz (*Solanum lycopersicum*) revelaram uma reação de hipersensibilidade (HR), sugerindo um possível potencial fitopatogênico. Várias tentativas de inoculação foram realizadas para comprovação da patogenicidade, empregando-se várias técnicas e em condições de umidade e temperatura altas, mas não foi possível reproduzir os sintomas iniciais. Além disso, detectou-se a presença de dois fungos nas plantas inoculadas que foram identificados como *Bipolaris maydis* e *Colletotrichum krasti*. Embora sem sintomas visíveis com características aos originais nas folhas, a bactéria foi reisolada.

Para garantir que a bactéria reisolada era a mesma que havia sido inoculada, foi realizada uma análise por BOX-PCR, que revelou um padrão de bandas idêntico, confirmando a identidade da bactéria. Com base nesses resultados, a bactéria (isolado UnB 1430) foi sequenciada e mediante análises filogenéticas, foi identificada como *Burkholderia contaminans*, levantando várias questões importantes, que conduziram ao presente estudo.

B. contaminans é uma bactéria endofítica envolvida em associações benéficas, especialmente como antagonista de vários fitopatógenos (Heo et al. 2022). Além disso, essa espécie apresenta vários

mecanismos de ação, como a produção de metabólitos secundários como a occidiofungina, um potente antifúngico (Lu et al. 2009), e a produção de sideróforos (Zaman et al. 2021), além de outras substâncias com potencial de uso biotecnológico e agrícola (Kunakom e Eustáquiok 2019).

B. contaminans é membro de um grupo bastante diverso dentro do gênero *Burkholderia*, o complexo *Burkholderia cepacia*, que inclui espécies com potencial benéfico quanto patogênico em plantas e humanos (Elshafie e Camele 2021), e que podem também estar associadas às infecções graves em pacientes com fibrose cística (Matos et al. 2024).

Dada a relevância dessa espécie, este estudo foi realizado para caracterizar o genoma do isolado UnB1430 e avaliar seu potencial como agente antagonista de fungos e bactérias fitopatogênicos, e como promotor de crescimento de plantas, usando a soja como modelo.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1. O gênero *Burkholderia*

1.1 História

Em 1942, Burkholder descreveu a primeira espécie do gênero *Burkholderia*, *Phytomonas caryophylli*, agente de murcha e podridão radicular dos cravos no estado de Washington, nos EUA, que foi mais tarde reclassificada como *Pseudomonas caryophylli*. Posteriormente, em 1950, o mesmo autor relatou uma nova espécie que causava podridão em bulbos de cebola, mais tarde classificada como *Pseudomonas cepacia*. Assim, durante muitos anos, novas espécies foram descritas, mas classificadas no gênero *Pseudomonas* devido à sua amplitude fenotípica (Compant et al. 2008).

O gênero *Burkholderia* foi proposto e nomeado em 1992, inicialmente incluindo sete cepas patogênicas que afetavam humanos, animais e plantas. Essas espécies correspondiam ao grupo II que incluía as espécies *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. gladioli*, *Trinickia caryophylli*, *Ralstonia pickettii*, e *R. solanacearum*. Esse grupo foi estabelecido com base na homologia de DNA (Palleroni et al. 1973; Yabuuchi et al. 1992). Três anos depois, o gênero foi alterado, três espécies novas foram incluídas e propôs-se a remoção de duas espécies *R. pickettii* e *R. solanacearum* (Gillis et al. 1995).

No gênero *Burkholderia*, foram descritas e estudadas numerosas espécies, especialmente aquelas com associações relevantes com plantas, o que levou a uma reclassificação significativa e à criação de novos gêneros. A primeira divisão resultou na criação do gênero *Paraburkholderia*, que abrangeu 45 espécies previamente classificadas em *Burkholderia*, baseando-se em sequências concatenadas de 21 proteínas conservadas. Nesse estudo, o clado II, composto principalmente por espécies ambientais, foi transferido para esse novo gênero (Sawana et al. 2014). Subsequentemente, outros gêneros, como *Caballeronia*, *Robbsia* e *Trinickia*, também foram estabelecidos, refletindo a complexidade e diversidade dentro deste grupo bacteriano (Kaur et al. 2017; Lopes-Santos et al. 2017; Estrada-de los Santos et al. 2018). Atualmente, o gênero *Burkholderia* continua em processo de mudança e expansão, acompanhando as descobertas e estudos taxonômicos mais recentes.

1.2 Taxonomia

De acordo com LPSN (2024), o gênero *Burkholderia* pertence à família *Burkholderiaceae* da

ordem *Burkholderiales*, na classe *Betaproteobacteria*, do filo *Pseudomonadota*, com 36 espécies válidas, a saber: *B. aenigmatica*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. arboris*, *B. catarinensis*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. diffusa*, *B. dolosa*, *B. gladioli*, *B. glumae*, *B. guangdongensis*, *B. humptydooensis*, *B. lata*, *B. latens*, *B. mallei*, *B. mayonis*, *B. metallica*, *B. multivorans*, *B. oklahomensis*, *B. orbicola*, *B. plantarii*, *B. pseudomallei*, *B. pseudomultivorans*, *B. puraquae*, *B. pyrocinia*, *B. savannae*, *B. seminalis*, *B. singularis*, *B. stabilis*, *B. stagnalis*, *B. territorii*, *B. thailandensis*, e *B. ubonensis*.

De acordo com as limitações na identificação das espécies do gênero *Burkholderia*, os métodos convencionais como sequenciamento dos genes 16S rRNA, e MLSA (*multilocus sequence analysis*), amplamente utilizados na sistemática bacteriana, são insuficientes para diferenciar espécies intimamente relacionadas. Propõe-se, portanto, que a aplicação da filogenia central baseada em genes ortólogos de cópia única, como o agrupamento dDDH/ANI (Hibridização DNA-DNA digital/identidade média de nucleotídeos) baseado em pangenoma, forneceria uma estrutura mais eficaz para demarcar espécies estreitamente relacionadas. O limite de 96,48% de ANI, que corresponde a 70% de dDDH, é sugerido devido à dificuldade em distinguir algumas espécies intimamente relacionadas que requerem um valor de ANI acima do limite de 95%. Além disso, observou-se que a análise de dDDH é mais discriminatória para a delimitação de espécies de *Burkholderia* do que o ANI. Por exemplo, *B. lata*, *Burkholderia* sp. cepa 170816 e as cepas do cluster *B. contaminans* compartilharam valores de ANI de 94,9–95,9%, próximos ao limiar comumente utilizado (Jin et al. 2020; Bach et al. 2022a).

1.3 Potencial patogênico

O gênero *Burkholderia* apresenta ampla distribuição ocupando diversos nichos ecológicos, incluindo solo, água, rizosfera das plantas e ambientes hospitalares. Algumas dessas espécies têm potencial patogênico para plantas, animais e humanos (Elshafie e Camele 2021).

Entre as espécies fitopatogênicas, destacam-se *B. cepacia* e *B. gladioli*, que causam podridão em cebola e alho, doença conhecida na cultura da cebola como podridão da escama da cebola (Oliveira et al. 2019; Abachi et al. 2024). Além dessas espécies, *B. cenocepacia* e *B. pyrocinia* também infectam a cebola galesa (Tsuji et al. 2023). Embora três espécies, *B. glumae*, *B. plantarii*, e *B. gladioli* causem a doença bacteriana da panícula (BPB) do arroz (Nandakumar et al. 2009), *B. glumae* é conhecida como a principal causa de BPB, sendo a mais prevalente e virulenta (Ortega

and Rojas 2021; Ngalimat et al. 2023).

Por outro lado, temos as espécies patogênicas oportunistas de animais e humanos, como *B. mallei*, causadora do mormo, e *B. pseudomallei*, causadora da melioidose (Paauw et al. 2023). O mormo é uma doença endêmica no sudeste Asiático e no norte da Austrália, mas ocasionalmente encontrada em outros países. Afeta principalmente cavalos, burros e mulas, mas também pode ser transmitida aos seres humanos por contato direto com animais infectados ou através de aerossóis, sendo considerada rara em humanos atualmente (Verma et al. 2014). Embora *B. pseudomallei* seja um saprófito que pode ser isolado do solo, lama e águas superficiais em regiões endêmicas, a infecção muitas vezes é grave e fatal quando não é tratada (Paksanont et al. 2018; Jayasinghearachchi et al. 2023).

Além disso, há o grande grupo de espécies patogênicas a humanos que constitui o complexo *B. cepacia* (CBC) associada a infecções graves em pacientes com fibrose cística (FC) e imunocomprometidos (Bochkareva et al. 2018). *B. multivorans* e *B. cenocepacia* são as espécies do CBC mais prevalentes e perigosas entre os pacientes com FC em todo o mundo, associadas a um declínio mais rápido da função pulmonar e mortalidade após o transplante (Devanga Ragupathi e Veeraraghavan 2019; Gauvreau et al. 2023).

1.4 Potencial benéfico

Várias espécies do gênero *Burkholderia* apresentam potencial benéfico em processos agrícolas, ambientais, industriais e farmacêuticos. Na área agrícola, essas espécies estabelecem interações benéficas com as plantas após a colonização, resultando em uma série de efeitos positivos, incluindo maior tolerância a fitopatógenos, resistência a estresses ambientais como seca e salinidade, redução do estresse oxidativo e estímulo ao crescimento vegetal. Além disso, essas bactérias melhoram a eficiência da fotossíntese e facilitam a absorção de nutrientes (Pal et al. 2022). De acordo com as interações benéficas com as plantas mencionadas anteriormente, destaca-se o potencial de *Burkholderia* spp. na agricultura. Atualmente, muitos estudos têm sido conduzidos nesse tema, principalmente avaliando o potencial dessas bactérias como promotoras de crescimento e como biocontroladoras de diversas doenças de plantas. Espécies desse gênero que têm sido descritas com esses potenciais, são: *B. contaminans*, *B. arboris*, *B. pseudomultivorans*, *B. pyrocinia*, *B. seminalis*, *B. gladioli*, *B. ambifaria*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* e *B. cenocepacia*. Essas espécies demonstraram potencial inibindo o crescimento de fitopatógenos, como fungos,

bactérias e nematoides, em várias culturas de importância econômica, como tabaco, tomate, milho, soja, algodão, entre outras (Tagele et al. 2019; Aba-Regis et al. 2021; Hwang et al. 2021; Peng et al. 2021; Shantharaj et al. 2021; An et al. 2022; Heo et al. 2022; Zhang et al. 2022; Meng et al. 2023; Wang et al. 2023).

Resultados desses estudos têm sido promissores, sugerindo que *Burkholderia* spp. apresenta atividade antimicrobiana. Estudo realizado por Heo et al. (2022), relatou que a cepa de *B. contaminans* AY001, testada contra seis diferentes patógenos fúngicos, foi capaz de inibir o crescimento de todos eles em diferentes percentuais, apresentando uma atividade antagonista de 45% contra *Fusarium avenaceum* e menor atividade contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Por outro lado *B. gladioli* C101 foi utilizada como biocontrole da mancha bacteriana em tomate causada por *Xanthomonas perforans*, resultando em uma redução significativa na severidade da doença (Shantharaj et al. 2021).

Em relação ao potencial de biocontrole de nematoides, a cepa de *Burkholderia arboris* J211 apresentou um forte efeito como nematicida, reduzindo significativamente a infestação de *Meloidogyne incognita* em experimentos em vasos e campo na cultura de tabaco, além de aumentar o rendimento das plantas (Zhang et al. 2022).

Diversas espécies de *Burkholderia* têm demonstrado potencial como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) em diferentes culturas, entre elas, *B. pyrrocinia*, *B. anthina*, *B. seminalis*, *B. contaminans*, *B. vietnamiensis* e *B. ambifaria* (Malviya et al. 2020; Han et al. 2021; Hwang et al. 2021; Wang et al. 2024; Mpinda et al. 2024). Um exemplo é o isolado P10 da espécie *B. pyrrocinia*, que foi testado na cultura do amendoim, melhorando o crescimento das plantas, como aumento na altura da planta, no peso fresco, no comprimento da raiz e no teor de clorofila, mesmo sob condições de estresse salino (Han et al. 2021).

Outras espécies também possuem um grande potencial na biorremediação de contaminantes ambientais. De acordo com Morya et al. (2020), esse potencial é frequentemente subestimado devido à falta de informações sobre outras bactérias degradadoras, ainda assim este gênero tem um potencial significativo em aplicações de biorremediação e bioconversão, pois abriga uma vasta diversidade de enzimas catabólicas capazes de degradar poluentes recalcitrantes em diversas condições ambientais. Lin et al. 2024 demonstraram que as espécies *B. difusa* e *B. aenigmatica* apresentam uma boa perspectiva na degradação de plásticos.

O gênero *Burkholderia* apresenta vários potenciais, e com isso, tem atraído muito interesse para a

pesquisa básica e aplicada. Além dos já mencionado, destaca-se também a capacidade de biossintetizar compostos farmacêuticos bioativos de interesse médico e industrial. Esses benefícios são amplamente atribuídos à produção de metabólitos secundários e enzimas por espécies do gênero (Kunakom e Eustáquio 2019).

1.5 Metabólitos secundários produzidos por *Burkholderia* spp.

O gênero *Burkholderia* produz uma ampla variedade de produtos naturais, diversos em termos de classe e estrutura biossintética. Esses compostos, em sua maioria são benéficos para adaptação e sobrevivência das espécies, estabelecendo interações com seus hospedeiros e podendo ser aplicados para fins terapêuticos e biotecnológicos (Kunakom e Eustáquio 2019).

Muitos desses compostos têm propriedades antimicrobianas com modos de ação distintos e eficazes contra patógenos multirresistentes. Esses compostos se destacam tanto pela variedade de moléculas sintetizadas quanto pela diversidade de alvos, como bactérias, fungos, células cancerígenas, tumorais e processos inflamatórios (Mahenthiralingam et al. 2011; Bach et al. 2022b Rodríguez-Cisneros et al. 2023). Eles pertencem a uma ampla gama de classes químicas incluindo heterociclos contendo nitrogênio, compostos orgânicos voláteis, polienos, poliinas, sideróforos, macrolídeos, bacteriocinas, quinolonas, peptídeos não ribossômicos (NPR), policetídeos (PK) e outros compostos ainda não classificados, como sinapigladiosídeos, cepaciamida A, altericidinas e ramnolipídios. Além disso, há compostos que podem ter tanto efeitos benéficos quanto tóxicos, como as burkholdinas e o tropolone (Rodríguez-Cisneros et al. 2023).

Entre os compostos NPR-PK destaca-se a occidiofungina A-D, sintetizada por *B. contaminans* MS14. São glicopeptídeos que inibem uma ampla gama de fungos, incluindo *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Macrophomina*, *Microsporum*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Trichophyton* e várias espécies de *Candida* (Lu et al. 2009; Ravichandran et al. 2019). A occidiofungina tem como alvo os filamentos de actina, interrompendo as atividades celulares e induzindo a apoptose (Emrick et al. 2013). Também é produzida em *B. pyrrocinia* Lyc2 (Wang et al. 2016)

Espécies como *B. cepacia*, *B. pyrrocinia*, *B. ambifaria* e *B. lata* são conhecidas por produzir uma molécula pigmentada amarela, a pirrolnitrina, um heterociclo contendo nitrogênio e halometabólito microbiano. A pirrolnitrina também é encontrada em espécies de *Pseudomonas* e *Serratia* (Arima et al. 1964; Schmidt et al. 2009; Pawar et al. 2019). Essa molécula interfere na cadeia respiratória

dos fungos, desacoplando o fluxo normal de elétrons. Regulada por quorum sensing (QS), a pirrolnitrina possui atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora capsici* (Jung et al. 2018).

1.6 Características morfológicas e bioquímicas de *Burkholderia* spp.

Bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam células gram-negativas que podem ser retas ou ligeiramente curvas, com motilidade mediada por um ou mais flagelos polares, com exceção *B. mallei* que não possui flagelos, sendo imóvel (Sawana et al. 2014). A maioria das espécies é capaz de acumular e utilizar poli-β-hidroxibutirato (PHB) para o crescimento. As espécies são principalmente quimiorganotróficas, aeróbicas, mas algumas espécies são capazes de respiração anaeróbia usando nitrato como aceptor de elétrons terminais, apresentam reação positiva para catalase e urease, não formam esporos e não fermentam lactose.

1.7 Características do genoma

Burkholderia tem a capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, uma característica atribuída aos seus grandes e complexos genomas (Kunakom and Eustáquio 2019). Os genomas das espécies de *Burkholderia* apresentam características únicas, com um tamanho variando entre 5,2 Mb a 9,7 Mb, sendo dos maiores entre as bactérias. O genoma, geralmente chamado de multicromossômico, é composto por três grandes cromossomos com alto teor de GC, variando de 65,7 a 68,5% (Bochkareva et al. 2018; Kim et al. 2024). Dois cromossomos estão relacionados a funções básicas, enquanto o terceiro, considerado um megaplasmídeo, codifica genes associados à virulência, metabólitos secundários e outras funções acessórias (Agnoli et al. 2012).

A adaptabilidade a diversos ambientes e a versatilidade ecológica de *Burkholderia* dependem da alta plasticidade genética de seus genomas grandes e ricos em sequências de inserção. Essa diversidade genética proporciona a síntese de uma vasta gama de metabólitos secundários e enzimas, permitindo que a bactéria se adapte a diferentes ambientes e hospedeiros, além de conferir resistência a antibióticos (Mahenthiralingam et al. 2005; Mannaa et al. 2019).

2. O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC)

O complexo *B. cepacia* (CBC) constitui um grupo composto por pelo menos 24 espécies

estritamente relacionadas, incluindo *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, e *B. contaminans*, entre outras (Hassan et al 2019; Cetin e Orman 2022; Matos et al. 2024). Esses microrganismos são fenotipicamente semelhantes, mas geneticamente distintos (Sfeir 2018). A maioria delas pode ter o potencial de causar infecções respiratórias graves em pacientes com fibrose cística (FC) e outras condições subjacentes (Coenye e Vandamme, 2003; Matos et al. 2024). Além disso, algumas dessas espécies apresentam potencial patogênico em plantas (Velez et al. 2023; Abachi et al. 2024).

As espécies deste complexo apresentam genomas grandes que variam de 6,4 a 9,7 Mb, o que lhes confere a vantagem de se desenvolverem em diferentes nichos ecológicos (Matos et al. 2024). Essa característica permite que algumas dessas espécies também apresentem potencial biotecnológico para controle biológico, biorremediação e promoção do crescimento vegetal (PCV) (Depoorter et al., 2020; Bach et al. 2022b). Os potenciais de cada espécie foram descritos nos itens de potencial patogênico e benéfico das espécies *Burkholderia*.

3. *Burkholderia contaminans* (Bco)

3.1 Descoberta e classificação

De acordo com (Vanlaere et al. 2009) *B. contaminans* (Bco) foi proposta como espécie no ano de 2009, quando houve uma reclassificação taxonômica do táxon K, conhecido como um grupo diverso de isolados do CBC não classificados incluindo bactérias de fontes humanas e ambientais isoladas de todo o mundo. Esse táxon foi examinado por uma abordagem taxonômica polifásica tradicional, por meio de análise de tipagem de sequência multilocus (MLST) usando sete genes específicos e pela análise de sequências disponíveis do genoma total (ANI) que requer uma porcentagem de identidade maior que 95%. As sequências concatenadas demonstraram que os isolados se agrupavam em um único clado na árvore MLST, consistindo em duas linhagens, MLST-I e MLST-II, que representam duas espécies distintas dentro do CBC, *B. contaminans* e *B. lata*. Bco compreende vários nichos ecológicos, pois, pode ser isolada de uma variedade de ambientes, como solo, animais e plantas.

3.2 Características morfológicas e bioquímicas

Bco é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, aeróbica e não forma esporos. Ela

crece bem em diferentes temperaturas, especificamente a 30°C, 37°C e 42°C. As colônias são úmidas, geralmente apresentam um brilho metálico distinto, e a maioria das cepas é pigmentada amarela e hemolítica, o que facilita sua identificação visual em meios de cultura porque não são características comuns entre as espécies de CBC. Todas as cepas conhecidas de Bco crescem em ágar MacConkey e também em ágar seletivo para *B. cepacia*, mas algumas cepas podem alcalinizar esse meio (Vanlaere et al. 2009).

B. contaminans possui várias características bioquímicas distintivas. As cepas utilizam glicose, L-arabinose, D-manose, D-manitol, N-acetilglucosamina, D-gluconato, caprato, adipato, L-malato, citrato e fenilacetato, mas não maltose. Observa-se acidificação de glicose, maltose, lactose, xilose, sacarose e adonitol. A redução de nitrato pode ser variável entre diferentes cepas, mas na maioria das vezes não está presente. Não apresenta atividade descarboxilase, arginina diidrolase ou urease. No entanto, atividades de oxidase, β -galactosidase, esculina hidrolase, lisina descarboxilase e liquefação de gelatina estão presentes. O teor de G+C é de 67 mol% (Vanlaere et al. 2009)

3.3 Características do genoma

O genoma de Bco assim como das demais espécies do CBC varia em tamanho, têm genomas grandes, variando de 6 a mais de 9 Mb, geralmente disposto em três cromossomos e plasmídeos grandes, com um conteúdo de GC alto, entre 66% e 67% (Kim et al. 2023). Até agora, foram sequenciados 164 genomas de Bco. No Brasil, até o presente, foram sequenciados 16 genomas: 1 pela Universidade Federal do Paraná, 14 pelo Instituto Adolfo Lutz e o sequenciado neste estudo pela Universidade de Brasília, conforme dados disponíveis no NCBI.

3.4 Associação com plantas

Muitas espécies do gênero *Burkholderia*, incluindo Bco são bactérias endofíticas (Pal et al. 2022). Essas bactérias estabelecem uma associação com as plantas, habitando os tecidos vegetais internos e intercelulares ao longo de todo o ciclo de vida ou parcialmente. Em sua maioria, não são fitopatogênicas, pois produzem baixos níveis de enzimas líticas em comparação com os patógenos, evitando assim desencadear a resposta imune da planta (Trivedi et al. 2020). Embora endofíticas, elas podem colonizar diversos tecidos das plantas, como raízes, caules, cascas, folhas, pecíolos, flores, frutos e sementes, estabelecendo associações mutualistas benéficas com as plantas (Guo et al. 2023)

Essas bactérias ajudam a aumentar a disponibilidade de nutrientes, especialmente sob estresse, e promovem o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios. Além disso, possuem um grande potencial na biorremediação, melhorando a sobrevivência das plantas contra fitopatógenos por meio de mecanismos como competição, resistência sistêmica induzida e antibiose. Elas também contribuem para a descontaminação de solos e ambientes poluídos (Pal et al. 2022; Tiwari et al. 2023). Tem descrito a Bco como bactéria endofítica. No estudo realizado por Hari et al. (2023) duas cepas de Bco (PLPTu e PLPTw) isoladas de plantas medicinais foram capazes de colonizar a endosfera das mudas de tomateiro.

3.5 Papel de Bco no biocontrole

Os agentes de biocontrole utilizam uma combinação de mecanismos para prevenir ou reduzir doenças em plantas (Bonaterra et al. 2022). Existe uma grande variedade de microrganismos tais como bactérias, fungos e bacteriófagos que têm sido amplamente utilizados como agentes de biocontrole (Nakayinga et al. 2021; Bonaterra et al. 2022; Palmieri et al. 2022). Esses microrganismos são extensivamente estudados e, quando atendem às normas de segurança e eficácia, podem ser registrados como produtos comerciais (Köhl et al. 2011). Além disso, sua aplicação oferece uma alternativa sustentável aos pesticidas químicos, promovendo práticas agrícolas mais seguras e contribuindo para a preservação do meio ambiente.

Os agentes de biocontrole podem atuar através de vários mecanismos, incluindo a interação direta com o patógeno por meio da secreção de compostos antimicrobianos, produção de metabólitos secundários como bactericidas e antibióticos, bem como enzimas que degradam a parede celular do patógeno. Além disso, eles produzem compostos voláteis que reduzem o crescimento e a atividade metabólica dos patógenos. Outro mecanismo envolve a interferência na virulência do patógeno, como a degradação ou inibição enzimática da síntese molecular envolvida no *quorum sensing*. Esses agentes também competem por nutrientes e espaço, e induzem indiretamente a resposta de defesa das plantas, promovendo seu crescimento e resistência a doenças (Köhl et al. 2019; Legein et al. 2020; Rabbee et al. 2024).

O potencial de Bco como agente de biocontrole tem sido testado em condições de *in viro*, contra vários fitopatógenos incluindo bactérias, fungos ascomicetos e oomicetos. Pode-se observar que várias cepas de Bco apresentam esse potencial, com resultados de inibição variando entre 25% e 58%. Além disso, o antagonismo contra vários gêneros de bactérias também foi testado,

mostrando halos de inibição superiores a 2 cm, pelo qual indica ter um forte efeito antagonista (Heo et al. 2022).

O potencial antagonico de Bco deve-se, principalmente, aos metabólitos secundários que essa espécie produz. Entre eles, destaca-se a occidiofungina, um metabólito detectado na cepa *B. contaminans* MS14 (Lu et al. 2009), que exerce efeitos inibitórios ao inibir a síntese de biomoléculas vitais, inibindo vários mecanismos biológicos essenciais para o patógeno (Emrick et al. 2013). Outro importante composto é a pirrolnitrina, um halometabólito microbiano (contendo uma fração de halogênio) de grande relevância para as indústrias agrícola, farmacêutica e industrial. A pirrolnitrina interfere na biossíntese de proteínas e na função da membrana celular dos patógenos, levando à sua inibição e morte (Jung et al. 2018; Pawar et al. 2019). Além disso, os sideróforos produzidos por *B. contaminans* exercem um efeito inibitório através do mecanismo de captação de ferro, sequestrando esse nutriente essencial do ambiente e tornando-o indisponível para os patógenos, o que é crucial para o seu crescimento e desenvolvimento (Hider e Kong, 2010; Deng et al. 2017).

3.6 Papel de Bco na promoção de crescimento de plantas

Promoção de crescimento refere-se à capacidade de certos microrganismos de melhorar o desenvolvimento das plantas por meio de diversos mecanismos diretos e indiretos (Hartman et al. 2019). A diferença entre esses mecanismos nem sempre é evidente: os mecanismos indiretos geralmente ocorrem fora da planta, enquanto os mecanismos diretos afetam diretamente o metabolismo da planta (Goswami et al. 2016). Entre os mecanismos diretos, destacam-se a produção de fitohormônios, como ácido indol-3-acético (IAA), citocininas e giberelinas, a fixação biológica de nitrogênio e a liberação de nutrientes em formas utilizáveis pelas plantas, como fósforo, potássio e zinco (Goswami et al. 2016; Kumar et al. 2021). Já os mecanismos indiretos incluem a produção de sideróforos, quitinases e glucanases, antibióticos para controle de fitopatógenos, resistência sistêmica induzida, inibição do estresse abiótico e a produção de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminase (Goswami et al. 2016; Kumar et al. 2021; Khoso et al. 2023; Hasan et al. 2024).

Esses mecanismos já foram identificados em diversos gêneros de bactérias que foram avaliadas por seu potencial em promover o crescimento das plantas e melhorar sua produtividade. Entre essas, destacam-se *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter salinestris*, *Burkholderia*

phytofirmans, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Paenibacillus favisporus*, *P. polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. stutzeri* e *Rahnella aquatilis* (Ferchichi et al. 2019; Kumar et al. 2021). Tais bactérias são também conhecidas como plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), ou seja, são bactérias que colonizam raízes de plantas e promovem o crescimento vegetal (Gómez-Godínez et al. 2023).

Para Bco, vários estudos apresentaram resultados positivos para promoção de crescimento em diversas culturas, como tomate, milho e soja (Heo et al. 2022; Tagele et al. 2018; You et al. 2021). As cepas *B. contaminans* AY001, *B. contaminans* KNU17BI1 e *B. contaminans* strain ZCC demonstraram ser promotoras de crescimento de plantas (PGPB), exibindo atividades como a de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase, produção de sideróforos, solubilização de fosfato orgânico e inorgânico, produção de ácido indol-acético, solubilização de zinco, fixação de nitrogênio, além de auxiliar na mitigação de estresse biótico e abiótico nas plantas (Heo et al. 2022; Tagele et al. 2018; You et al. 2021).

4. Justificativa e Objetivos

O isolamento de fungos e da espécie *Burkholderia contaminans* associada a folhas de gerânio apresentando lesões necróticas abriu portas para uma série de questionamentos a respeito do papel da bactéria nesta sintomatologia. A impossibilidade de reprodução dos sintomas após várias inoculações nos levou a investigar seu potencial como agente de biocontrole e promotor de crescimento de plantas, conforme descrito na extensa literatura para essa espécie. Assim, para melhor caracterizar esse isolado, foram os seguintes os objetivos deste estudo:

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o genoma de *Burkholderia contaminans* UnB1430, avaliar seu potencial como agente antagonista de fitopatógenos e como promotor de crescimento de plantas.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar o sequenciamento, montagem e anotação do genoma do isolado UnB1430, obtido de folhas de gerânio
- Identificar genes ou fatores relacionados ao potencial do isolado UnB1430 de *B. contaminans*, para o controle de fitopatógenos, promoção de crescimento de plantas e

patogenicidade a plantas e humanos

- Desenhar e validar *primers* específicos para *B. contaminans* com base no genoma obtido
- Realizar testes *in vitro* para avaliar o potencial de *B. contaminans* UnB1430 para inibir o crescimento de uma variedade de fungos e bactérias fitopatogênicas
- Avaliar o potencial antagônico de *B. contaminans* UnB1430 contra *Rhizoctonia solani* em plântulas de soja
- Avaliar o potencial de *B. contaminans* UnB1430 na promoção do crescimento em plântulas de soja

5. Referências Bibliográficas

- Abachi H, Moallem M, Taghavi SM, Hamidizade M, Soleimani A, Fazliarab A, Portier P, Osdaghi E (2024) Garlic Bulb Decay and Soft Rot Caused by the Cross-Kingdom Pathogen *Burkholderia gladioli*. Plant Disease, 108:3:684-693.
- Aba-Regis BLL, Oliveros KMP, Ibarra-Romero C, Raymundo AK, Aggangan NS, Zulaybar TO, Rosana ARR (2021) Draft Genome Sequence of the Phosphate-Solubilizing Rhizobacterium *Burkholderia pseudomultivorans* Strain MPSB1, isolated from a Copper Mined-Out Site. Microbiology Resource Announcements, 10:1:1304-20.
- Agnoli K, Schwager S, Uehlinger S, Vergunst A, Viteri DF, Nguyen DT, Sokol PA, Carlier A, Eberl L (2012) Exposing the third chromosome of *Burkholderia cepacia* complex strains as a virulence plasmid. Molecular Microbiology, 83:362-378.
- An C, Ma S, Liu C, Ding H, Xue W (2022). *Burkholderia ambifaria* XN08: A plant growth-promoting endophytic bacterium with biocontrol potential against sharp eyespot in wheat. Frontiers in Microbiology, 13-906724.
- Arima K, Imanaka H, Kousaka M, Fukuta A, Tamura G (1964) Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. Agricultural and Biological Chemistry, 28:8:575-576.

- Bach E, Sant'Anna FH, Seger GD dos S, Passaglia LMP (2022a) Pangenome inventory of *Burkholderia* sensu lato, *Burkholderia* sensu stricto, and the *Burkholderia cepacia* complex reveals the uniqueness of *Burkholderia catarinensis*. *Genomics*, 114:1:398-408.
- Bach E, Passaglia LMP, Jiao J, Gross H (2022b) *Burkholderia* in the genomic era: from taxonomy to the discovery of new antimicrobial secondary metabolites. *Critical Reviews in Microbiology* 48:2:121-160
- Bochkareva OO, Moroz EV, Davydov II, Gelfand MS (2018) Genome rearrangements and selection in multi-chromosome bacteria *Burkholderia* spp. *BMC Genomics*, 19:965.
- Bonaterrea A, Badosa E, Daranas N, Francés J, Roselló G, Montesinos E (2022) Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10:9:1759.
- Burkholder WH (1942). Three bacterial plant pathogens: *Phytomonas earyophylli* sp. n., *Phytomonas alliicola* sp. n, and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Sondar) Viégas. *Phytopathology*, 32:2:141-149.
- Burkholder WH (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:1:115-117.
- Cetin BS, Orman A (2022) *Burkholderia cepacia* Complex Infections in Urgently Referred Neonates from Syrian Border Regions to a Hospital in Turkey: A Cross-Border Cluster. *Children*, 9:10:1566.
- Coenye T, Vandamme P (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental microbiology*, 5:9: 719-729.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:5:669-678.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Ait Barka E (2008) Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:4:607-626.
- Deng P, Foxfire A, Xu J, Baird SM, Jia J, Delgado KH, Lu SE (2017) The siderophore product ornibactin is required for the bactericidal activity of *Burkholderia contaminans* MS14. *Applied and Environmental Microbiology*, 83:8:00051-17.

- Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B (2019) Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: An update. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 18:1-10
- Elshafie HS, Camele I (2021) An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of *Burkholderia* spp. *Metabolites*, 11:5:321.
- Emrick D, Ravichandran A, Gosai J, Lu S, Gordon DM, Smith L (2013) The antifungal occidiofungin triggers an apoptotic mechanism of cell death in yeast. *Journal of Natural Products*, 76:5:829-838.
- Estrada-de los Santos P, Palmer M, Chávez-Ramírez B, Estrada-de los Santos P, Palmer M, Chávez-Ramírez B, Beukes C, Steenkamp ET, Briscoe L, Khan N, Maluk M, Lafos M, Humm E, Arrabit M, Crook M, Gross E, Simon MF, dos Reis Junior FB, Whitman WB, Shapiro N, Poole PS, Hirsch AM, Venter SN, James EK (2018) Whole genome analyses suggests that *Burkholderia* sensu lato contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the *Burkholderiaceae*. *Genes*, 9:8:389.
- Ferchichi N, Toukabri W, Boularess M, Smaoui A, Mhamdi R, Trabelsi D (2019). Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Archives of Microbiology*, 201:10:1333-1349.
- Gauvreau A, Carrier FM, Poirier C, Morisset J, Lands LC, Lavoie A, Nasir B, Ferraro P, Luong ML (2023) Post-transplant outcomes among cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation colonized by *Burkholderia*: A single center cohort study. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 42:7:917-924.
- Gillis M, Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45:2:274-289.

- Gómez-Godínez LJ, Aguirre-Noyola JL, Martínez-Romero E, Arteaga-Garibay RI, Ireta-Moreno J, Ruvalcaba-Gómez JM (2023). A look at plant-growth-promoting bacteria. *Plants*, 12:8:1668.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food and Agriculture*, 2:1:1127500.
- Guo X, Peng W, Xu X, Xie K, Yang X (2023) The Potential of Endophytes in Improving Salt–Alkali Tolerance and Salinity Resistance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 24:23:16917.
- Han L, Zhang H, Xu Y, Li Y, Zhou J (2021). Biological characteristics and salt-tolerant plant growth-promoting effects of an ACC deaminase-producing *Burkholderia pyrrocinia* strain isolated from the tea rhizosphere. *Archives of Microbiology* 203:2279:2290.
- Hari SB, Briste PS, Sumi AA, Mosharaf, MK, Paul SI, Masum MMI, Jannat R (2023) Endophytic bacteria isolated from medicinal plants induce plant growth promotion and southern blight disease suppression in tomato. *Journal of Plant Pathology* 105:1:197-210.
- Hartman K, Tringe SG (2019) Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress. *Biochemical Journal* 476:19:2705-2724.
- Hassan AA, Coutinho CP, Sá-correia I (2019). *Burkholderia cepacia* Complex Species Differ in the Frequency of Variation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Expression During Cystic Fibrosis Chronic Respiratory Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*,9:273.
- Heo AY, Koo YM, Choi HW (2022) Biological Control Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against Tomato *Fusarium* Wilt and Bacterial Speck Diseases. *Biology*, 11:4:619.
- Hider RC, Kong X (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27:5:637-657.
- Hwang HH, Chien PR, Huang FC, Hung SH, Kuo CH, Deng WL, Chiang EPI, Huang CC (2021) A plant endophytic bacterium, *Burkholderia seminalis* strain 869t2, promotes plant growth in *Arabidopsis*, pak choi, chinese amaranth, lettuces, and other vegetables. *Microorganisms* 9:8:1703.

- Jayasinghearachchi HS, Muthugama TA, Masakorala J, Kulasekara U. S, Jayaratne K, Jayatunga D. A. N, De Silva A. D, Corea EM (2023) *Burkholderia pseudomallei* in soil and natural water bodies in rural Sri Lanka: A hidden threat to public health. *Frontiers in Veterinary Science* 9:1045088.
- Jin Y, Zhou J, Zhou J, Hu M, Zhang Q, Kong N, Liang L, Yue J (2020) Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biology Direct* 15:6.
- Jung BK, Hong SJ, Park GS, Kim MC, Shin JH (2018) Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Applied Biological Chemistry* 61:2:173-180.
- Kaur C, Selvakumar G, Ganeshamurthy AN (2017) *Burkholderia* to *Paraburkholderia*: The journey of a plant-beneficial- environmental bacterium. *Recent advances in Applied Microbiology* 213:228.
- Khoso Ma, Wagan S, Alam I, Hussain A, Ali Q, Saha S, Poudel Tr, Manghwar H, Liu F. (2023). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress* 100341.
- Kim B, Han SR, Lee H, Oh TJ (2024) Insights into group-specific pattern of secondary metabolite gene cluster in *Burkholderia* genus *Frontiers in Microbiology*. 14:1302236
- Kim E, Jung HI, Park SH, Kim HY, Kim SK (2023) Comprehensive genome analysis of *Burkholderia contaminans* SK875, a quorum-sensing strain isolated from the swine. *AMB Express* 13:1:30.
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ (2019) Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10:845.
- Köhl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M, Blum B (2011) Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control* 57:1:1-12.

- Kumar M, Giri VP, Pandey S, Gupta A, Patel MK, Bajpai AB, Jenkins S, Siddique KH (2021). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Emerging as an Effective Bioinoculant to Improve the Growth, Production, and Stress Tolerance of Vegetable Crops. *International Journal of Molecular Sciences* 22:22:12245.
- Kunakom S, Eustáquio AS (2019) *Burkholderia* as a Source of Natural Products. *Journal of Natural Products* 82:7:2018-2037.
- Legein M, Smets W, Vandenheuvel D, Eilers T, Muyschondt B, Prinsen E, Samson R, Lebeer S (2020) Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. *Frontiers in Microbiology* 11:1619.
- Lin Z, Jin T, Xu X, Yin X, Zhang D, Geng M, Pang C, Luo G, Xion L, Penf J, Fei J (2024) Screening and degradation characteristics of plastic-degrading microorganisms in film-mulched vegetable soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 186:105686.
- Lopes-Santos L, Castro DBA, Ferreira-Tonin M, Corrêa DBA, Weir BS, Park D, Ottoboni LMM, Neto JR, Destéfano SAL (2017) Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, *International Journal of General and Molecular Microbiology* 110:6:727-736.
- LPSN. (2024). “List of prokaryotic names with standing in nomenclature”. In genus *Burkholderia*. Available at: <https://lpsn.dsmz.de/genus/Burkholderia>.
- Lu SE, Novak J, Austin FW, Gu G, Ellis D, Kirk M, Wilson-Stanford S, Tonelli M, Smith L (2009) Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*. *Biochemistry* 48:35:8312-8321.
- Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology* 3:144-156.
- Malviya MK, Li CN, Solanki MK, Singh RK, Htun R, Singh P, Li YR (2020) Comparative analysis of sugarcane root transcriptome in response to the plant growth-promoting *Burkholderia anthina* MYSP113 *PLoS One* 15:4:0231206.

- Mannaa M, Park I, Seo YS (2019) Genomic features and insights into the taxonomy, virulence, and benevolence of plant-associated *Burkholderia* species International Journal of Molecular Sciences 20:1:121.
- Matos GR, Joana R, Feliciano JR, Leitão JH (2024). Non-coding regulatory sRNAs from bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex. Applied Microbiology and Biotechnology 108:280.
- Meng XJ, Galileya Medison R, Cao S, Wang Lq, Cheng S, Tan Lt, Sun Zx, Zhou Y (2023) Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic *Burkholderia vietnamiensis* C12 from *Ficus tikoua* Bur against *Rhizoctonia solani*. Biological Control 178:105132.
- Morya R, Salvachúa D, Thakur IS (2020) *Burkholderia*: An Untapped but Promising Bacterial Genus for the Conversion of Aromatic Compounds. Trends in Biotechnology 38:9:938-975.
- Mpinda G, Amuri N, Tindwa H (2024) Multifunctional plant growth promoting potential of *Burkholderia vietnamiensis*-OP984178 and *B. ambifaria*-OP984173 isolated from rhizosphere soils, Tanzania. Journal of Central European Agriculture 25:1:243-254.
- Nakayinga R, Makumi A, Tumuhaise V, Tinzaara W (2021). *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. BMC microbiology 21:1-20.
- Nandakumar R, Shahjahan AKM, Yuan XL, Dickstein ER, Groth DE, Clark CA, Cartwright RD, Rush MC (2009) *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. Plant Disease 93:9:896-905.
- Ngalimat MS, Mohd Hata E, Zulperi D, Ismail SL, Ismail MR, Mohd Zainudin NA, Saidi NB, Yusof MT (2023) A laudable strategy to manage bacterial panicle blight disease of rice using biocontrol agents. Journal of Basic Microbiol 63:11:1180-1195.
- Oliveira WJ, Souza EB, Silva AMF, Lima NB, Leal CM, Candeia JÁ, Gama MA (2019) Elucidating the etiology of onion bacterial scale rot in the semi-arid region of Northeastern Brazil. Tropical Plant Pathology 44:6:494-502.

- Ortega L, Rojas CM (2021) Bacterial panicle blight and *Burkholderia glumae*: From pathogen biology to disease control. *Phytopathology* 111:772-778.
- Paauw A, Scholz HC, Mars-Groenendijk RH, Dekker LJ, Luider TM, Van Leeuwen HC (2023) Expression of virulence and antimicrobial related proteins in *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 17:1.
- Pal G, Saxena S, Kumar K, Verma A, Sahu PK, Pandey A, White JF, Verma SK (2022) Endophytic *Burkholderia*: Multifunctional roles in plant growth promotion and stress tolerance. *Microbiological Research* 265:1277201.
- Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23:4:333-339.
- Palmieri D, Ianiri G, Del Grosso C, Barone G, De Curtis F, Castoria R, Lima G (2022) Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae* 8(7):577.
- Pawar S, Chaudhari A, Prabha R, Shukla R, Singh DP (2019) Microbial pyrrolnitrin: Natural metabolite with immense practical utility. *Biomolecules* 9:9:443.
- Peng LY, Yi T, Song XP, Liu H, Yang HJ, Huang JG (2021) Mobilization of recalcitrant phosphorous and enhancement of pepper P uptake and yield by a new biocontrol and bioremediation bacterium *Burkholderia cepacia* CQ18. *Journal of Applied Microbiology* 130:6:1935-1948.
- Rabbee MF, Ali MS, Islam MN, Islam Md.N, Rahman MM, Hasan Md, M, Baek Kwang-Hyun (2024) Endophyte mediated biocontrol mechanisms of phytopathogens in agriculture. *Research in Microbiology* 104229.
- Ravichandran A, Geng M, Hull KG, Romo D, Lu SE, Albee A, Smith L (2019) A novel actin binding drug with in vivo efficacy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63:1: 10-1128.
- Rodríguez-Cisneros M, Morales-Ruíz L M, Salazar-Gómez A, Rojas-Rojas FU, Estrada-de Los Santos P (2023) Compilation of the antimicrobial compounds produced by *Burkholderia* *Sensu Stricto*. *Molecules* 28:4:1646.

- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS (2014) Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: Proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics* 5:429.
- Schmidt S, Blom JF, Pernthaler J, Berg G, Baldwin A, Mahenthiralingam E, Eberl L (2009) Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environmental Microbiology* 11:6:1422-1437.
- Sfeir MM (2018) *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium name suggest. *Journal of Infection* 77:3:166-170.
- Shantharaj D, Williams MA, Potnis NS, Liles MR (2021) *Burkholderia gladioli* C101 metabolites protect tomato plants against *Xanthomonas perforans* infection. *Journal of Plant Diseases and Protection* 128:2:379-390.
- Tagele SB, Kim SW, Lee HG, Kim HS, Lee YS (2018). Effectiveness of multi-trait *Burkholderia contaminans* KNU17BI1 in growth promotion and management of banded leaf and sheath blight in maize seedling. *Pesquisa microbiológica* 214:8-18.
- Tagele SB, Kim SW, Lee HG, Lee YS (2019) Potential of novel sequence type of *Burkholderia cenocepacia* for biological control of root rot of maize (*Zea mays* L.) caused by *Fusarium temperatum*. *International Journal of Molecular Sciences* 20:5:1005.
- Tiwari P, Kang S, Bae H (2023) Plant-endophyte associations: Rich yet under-explored sources of novel bioactive molecules and applications. *Microbiological Research* 266:127241.
- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, et al (2020) Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 18:607:621.
- Tsuji M, Saito T, Honjou M (2023) The first report of a rot on Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) caused by *Burkholderia cepacia* complex bacteria in Akita Prefecture, Japan. *Journal of General Plant Pathology* 89:238-243.

- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P (2009). Taxon K, A complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:11.
- Velez LS, Aburjaile FF, Farias ARG, Baia AD, Oliveira WJ, Silva AM, Benko-Iseppon AM, Azevedo V, Brenig B, Ham JH, Souza EB, Gama MA (2023) *Burkholderia semiarida* sp. nov. and *Burkholderia sola* sp. nov., two novel *B. cepacia* complex species causing onion sour skin. SystEMA Appl Microbiol 46:3:126415.
- Verma AK, Saminathan M, Neha, Tiwari R, Dhama K, Singh SV (2014) Glanders-A re-emerging zoonotic disease: A review. Journal of Biological Sciences 14:38-51.
- Wang L, Li X, Galileya Medison R, Zheng T, Meng X, Sun Z, Zhou Y (2023) Biocontrol efficacy of *Burkholderia pyrrocinia* S17-377 in controlling rice sheath blight. Biological Control 187:105368.
- Wang XQ, Liu AX, Guerrero A, Liu J, Yu XQ, Deng P, Lu SE (2016) Occidiofungin is an important component responsible for the antifungal activity of *Burkholderia pyrrocinia* strain Lyc2. Journal of applied microbiology 120:3:607-618.
- Wang Z, Zhang D, He Z, Luo Y, Wang H (2024) Two cadmium-resistant bacteria *Burkholderia contaminans* HA09 and *Arthrobacter humicola* improve phytoremediation efficiency of cadmium in *Ageratum conyzoides* L. Journal of Environmental Management 362:121250.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb: Nov. Microbiology and Immunology 36:1251-1275.
- You LX, Zhang RR, Dai JX, Lin ZT, Li YP, Herzberg M, Rensing C (2021). Potential of cadmium resistant *Burkholderia contaminans* strain ZCC in promoting growth of soy beans in the presence of cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety 211:111914.

- Zaman NR, Chowdhury UF, Reza RN, Chowdhury FT, Sarker M, Hossain MM, Khan H (2021). Plant growth promoting endophyte *Burkholderia contaminans* NZ antagonizes phytopathogen *Macrophomina phaseolina* through melanin synthesis and pyrrolnitrin inhibition. PLoS One, 16:9: 0257863.
- Zhang R, Ouyang J, Xu X, Li J, Rehman M, Deng G, Shu J, Zhao D, Chen S, Sayyed RZ, Fahad S, Chen Y (2022) Nematicidal Activity of *Burkholderia arboris* J211 Against *Meloidogyne incognita* on Tobacco. Frontiers in Microbiology 13:915546.

CAPÍTULO 2 - Burkholderia contaminans: genômica, antagonismo a fitopatógenos e promoção de crescimento de soja (*Glycine max* L. Merr.).

INTRODUÇÃO

Os endófitos são microrganismos que vivem dentro dos tecidos vegetais sem causar danos às plantas, proporcionando benefícios como o fornecimento de nutrientes ou a proteção contra patógenos (Vishwakarma et al. 2020; Narayanan e Glick 2022). Esses endófitos podem ser provenientes de sementes, do solo ou das plantas (Verma et al. 2019; Taulé et al. 2021). Os gêneros bacterianos mais isolados incluem *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Pantoea* (Ahmad et al. 2022; Pal et al. 2022).

O gênero *Burkholderia*, estabelecido em 1992, compreende cepas que infectam humanos, animais e plantas (Yabuuchi et al. 1992). *Burkholderia* está amplamente distribuída em solo, água e ambientes hospitalares, pertence à família *Burkholderiaceae* da ordem *Burkholderiales*, na classe *Betaproteobacteria*, do filo *Pseudomonadota*, com 36 espécies de relevância ambiental, industrial, biotecnológica e clínica (Bochkareva et al. 2018). Espécies deste gênero produzem metabólitos secundários e sideróforos com ação fungicida e bactericida, como a occidiofungina, estudada pelo seu potencial no controle de fungos em humanos e plantas (Bach et al. 2022b).

O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), que inclui mais de 20 espécies geneticamente próximas, entre elas *Burkholderia contaminans* (Bco), é conhecido por causar infecções oportunistas em pacientes com fibrose cística ou imunocomprometidos (Depoorter et al. 2020; Bach et al. 2022a). A Bco foi proposta como espécie por Vanlaere et al. (2009) e foi recuperada do Mar dos Sargaços, possivelmente representando um contaminante da amostra (Mahenthiralingam et al. 2006). O genoma desta espécie varia em tamanho de 6 a mais de 9 Mb, geralmente disposto em três cromossomos e plasmídeos grandes, com um conteúdo de GC entre 66% - 67% (Kim et al. 2023). Algumas cepas de Bco promovem o crescimento vegetal, apresentam antagonismo a fitopatógenos e são utilizadas na biorremediação. Essas cepas foram testadas *in vitro* e *in vivo*, demonstrando alta inibição de fitopatógenos (Heo et al. 2022; Pal et al. 2022). A ação de biocontrole de Bco pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo a interação direta com o patógeno, através da secreção de compostos antimicrobianos, interferência na virulência do patógeno, competição por nutrientes e espaço, e por indução indireta da resposta de defesa e promoção do crescimento das plantas (Bonaterra et al. 2022; Pal et al. 2022).

Os patógenos fúngicos de plantas transmitidas pelo solo desempenham um papel significativo na dinâmica das populações de plantas em ambientes naturais e na ocorrência de epidemias em ambientes agrícolas. Mesmo pequenas quantidades de inóculo podem resultar na destruição de plântulas (Otten e Gilligan 2006). Entre esses patógenos destaca-se o fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani*, conhecido por infectar uma ampla gama de hospedeiros em todo o mundo (Liu et al. 2019). Produzem estruturas de escleródios que favorecem a sobrevivência do fungo durante vários anos (Cappellaro et al. 2024). Na cultura da soja, *R. solani* é amplamente reconhecido como a principal espécie que pode causar apodrecimento de sementes, tombamento, podridão da raiz, amortecimento pré e pós-emergente e podridão do hipocótilo com uma lesão marrom-avermelhada afundada característica ou requeima do broto. Esses sintomas podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento, representando uma ameaça significativa à produtividade da soja (Basseto et al. 2007; Cappellaro et al. 2024).

Diversos métodos de controle têm sido recomendados para *R. solani*, como o desenvolvimento de cultivares resistentes e a adoção de práticas de rotação de culturas. No entanto, essas estratégias frequentemente enfrentam desafios significativos devido aos eficientes mecanismos de sobrevivência do patógeno, que é capaz de permanecer por vários anos no solo, mediante restos infestados (Paliwal et al. 2023). Nos últimos anos, alternativas de controle baseadas no uso de microrganismos benéficos têm sido amplamente estudadas. Essa abordagem tem demonstrado grande potencial no manejo de doenças e no seu efeito indireto na promoção de crescimento (Sharma et al. 2017; Sallam et al. 2021). Além disso, o biocontrole oferece benefícios adicionais, como o impacto positivo no meio ambiente e na saúde humana.

Dentro desse contexto, é necessário identificar cepas com potencial de biocontrole e promoção de crescimento, bem como compreender os mecanismos envolvidos. O objetivo geral deste estudo foi identificar uma bactéria endofítica isolada do gerânio (*Pelargonium graveolens*), caracterizar seu genoma e avaliar seu potencial como agente antagonista de fitopatógenos e promotor de crescimento de plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento e caracterização da bactéria

A bactéria foi isolada a partir de folhas de plantas adultas de gerânio (*Pelargonium graveolens*) provenientes de uma área com foco na produção de óleo em Brasília–DF. As folhas previamente foram lavadas com água corrente, seguidamente foram cortadas em quadrados de aproximadamente 10 mm e submetidas à desinfecção superficial, com imersão em álcool 70% por 2 minutos, seguida de hipoclorito de sódio ao 1% por 2 minutos e posteriormente lavadas 3 vezes com água destilada esterilizada. Após a desinfecção, cada fragmento retirado das folhas foi macerado em 1 mL de água estéril, e o extrato foi deixado em repouso por 10 min. Em seguida, 10 µL do extrato foram inoculados em placas de Petri contendo meio Nutriente Ágar (NA) e incubadas a 28 °C por 48 horas. O crescimento de colônias bacterianas foi observado, e estas foram repicadas para garantir o isolamento de colônias puras, as quais eram de pigmentação amarela e mucoides com um brilho metálico. A bactéria foi caracterizada inicialmente para um teste de Gram, testes de infiltração em folhas de tomate e tabaco, além de avaliação de patogenicidade em gerânio em casa de vegetação. Foram utilizados três métodos de inoculação: pulverização, cortes nas folhas utilizando uma tesoura, e infiltração nas folhas e nas hastes com seringa. A cultura pura foi preservada pelos métodos de criopreservação (-80 ° C) e em água destilada estéril à temperatura ambiente. O isolado recebeu o código UnB1430, referente à Coleção de Bactérias Fitopatogênicas da UnB.

2.2 Extração de DNA

O isolado UnB1430 foi previamente cultivado em meio Nutriente Ágar (NA) e incubado por 48 horas a 28 °C. As colônias de coloração amarela e mucoides foram repicadas para novas placas com meio NA para assegurar tratar-se de cultura pura. Após 24 horas, uma alçada de massa bacteriana foi retirada e suspensa em microtubos de 1,5 mL com água ultrapura. A extração de DNA seguiu o protocolo para bactérias Gram-negativas, utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit-PROMEGA. Inicialmente, as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm, com descarte do sobrenadante para remover os exopolissacarídeos e outros compostos solúveis em água que podem interferir na extração do DNA.

Este processo foi repetido por duas vezes. Ao *pellet* bacteriano restante, foram adicionados 600 µL da solução lise (Lysis solution), misturando-se suavemente com uma pipeta, seguido de incubação por 15 min a 80 °C, e em seguida, deixou-se resfriar à temperatura ambiente. Posteriormente, 3 µL de solução RNase foram adicionados à amostra, e a mistura foi homogeneizada gentilmente em vórtex e incubada a 37 °C por uma hora. Após resfriamento à temperatura ambiente, 200 µL de solução para precipitação de proteínas foram adicionados, com mistura no vórtex por alguns segundos, e incubação no gelo por 20 minutos. A amostra foi então centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo previamente identificado, contendo 600 µL de isopropanol, e a solução foi homogeneizada. Após a centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 600 µL de etanol 70% e os tubos foram centrifugados novamente a 14.000 rpm por 5 min para peletar o DNA. O etanol foi descartado e o *pellet* foi deixado para secar por 15 a 30 minutos em estufa a 37 °C, seguido de hidratação com 50 µL de água ultrapura e armazenado a -20 °C. A concentração de DNA do isolado foi aferida utilizando o ultraespectrofotômetro de microvolumes NanoDrop One^c (Thermo Scientific, EUA), e finalmente diluídos com água ultrapura para uma concentração final de 20 ng/µL.

2.3 Sequenciamento do genoma

O sequenciamento do genoma completo da cepa UnB1430 foi realizado utilizando a tecnologia Oxford Nanopore PromethION. Para o sequenciamento, foi utilizada a flow cell FLO-PRO114M (R10.4.1), e o kit SQK-NBD114-24. O processo de base *calling*, que converteu os sinais brutos em sequências de DNA, foi conduzido pelo software Dorado v.0.7 (<https://github.com/nanoporetech/dorado/tree/release-v0.7>). A montagem do genoma foi realizada utilizando o software Flye Assembly v.2.9.3 (Kolmogorov et al. 2019). O polimento ou correção da sequência montada foi executado com o software Medaka v.1.12.0 (Wright e Wykes 2022), garantindo uma sequência final precisa e confiável. O genoma foi anotado pelo NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline v. 4.11 (Tatusova et al. 2016) e submetido ao GenBank.

2.4 Identificação da espécie bacteriana por Identidade Média de Nucleotídeos (ANI)

Para a identificação adequada da espécie isolada do gerânio, foi utilizado o programa fastANI v. 1.2 (Jain et al. 2018) que calcula a Identidade Média de Nucleotídeos (ANI). O software foi executado com as configurações padrão, comparando o genoma sequenciado com 72 sequências completas de membros do gênero *Burkholderia* e 2 do gênero *Paraburkholderia* (Tabela 1), obtidos do GenBank (NCBI). Valores iguais ou superiores a 95% de ANI é o critério para identificar organismos de uma mesma espécie (Chua et al. 2019).

Tabela 1. Espécies, isolados e acessos de *Burkholderia* e *Paraburkholderia* extraídas do GenBank para as análises filogenéticas e o desenho dos *primers*

Espécie	Isolado	Acesso (ID GenBank)
<i>Burkholderia aenigmatica</i>	AU17325	GCA_0022232
<i>Burkholderia aenigmatica</i>	LMG13014 ^T	GCA_902499175
<i>Burkholderia alba</i>	YIM B08401	GCF3472147
<i>Burkholderia ambifaria</i>	BJQ0010	GCA_01645878
<i>Burkholderia ambifaria</i>	FDAARGOS_1027	GCA_01612775
<i>Burkholderia anthina</i>	BJQ0011	GCA_01645880
<i>Burkholderia anthina</i>	LMG20980 ^T	GCA_902498995
<i>Burkholderia arboris</i>	BCC0049	GCA_902830425
<i>Burkholderia arboris</i>	MEC_B345	GCA_02438103
<i>Burkholderia catarinensis</i>	89 ^T	GCA_0018837
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	MSMB384WGS	GCA_0017188
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	VC7848	GCA_001999785
<i>Burkholderia contaminans</i>	AU33395	GCA_03048358
<i>Burkholderia contaminans</i>	CH-1	GCA_0047236
<i>Burkholderia contaminans</i>	FFH2055	GCA_02963364
<i>Burkholderia contaminans</i>	LMG23361 ^T	GCA_02963382
<i>Burkholderia contaminans</i>	MS14	GCA_0010291
<i>Burkholderia diffusa</i>	DSM23434 ^T	GCA_01683676
<i>Burkholderia diffusa</i>	LMG29043	GCA_902830815

<i>Burkholderia gladioli</i>	ATCC10248 ^T	GCA_000959
<i>Burkholderia gladioli</i>	BBB-01	GCA_01669870
<i>Burkholderia glumae</i>	257sh-1	GCA_0099313
<i>Burkholderia glumae</i>	ATCC33617 ^T	GCA_000960
<i>Burkholderia guangdongensis</i>	DHOM02 ^T	GCA_01340387
<i>Burkholderia humptydooensis</i>	FDAARGOS_899	GCA_01602745
<i>Burkholderia humptydooensis</i>	MSMB43	GCA_0015137
<i>Burkholderia lata</i>	383 ^T	GCA_000001
<i>Burkholderia lata</i>	A05	GCA_0037111
<i>Burkholderia latens</i>	AU17929	GCA_0017187
<i>Burkholderia latens</i>	BCC1625	GCA_902832795
<i>Burkholderia mallei</i>	atcc23344 ^T	GCA_03395606
<i>Burkholderia mallei</i>	turkey2	GCA_0023460
<i>Burkholderia mayonis</i>	BDU6 ^T	GCA_0015237
<i>Burkholderia mayonis</i>	BDU8	GCA_0015226
<i>Burkholderia metallica</i>	FL-6-5-30-S1-D7	GCA_0017185
<i>Burkholderia metallica</i>	LMG24068 ^T	GCA_902832845
<i>Burkholderia multivorans</i>	BAA-247	GCA_000959
<i>Burkholderia multivorans</i>	FDAARGOS_246	GCA_0030199
<i>Burkholderia oklahomensis</i>	C6786 ^T	GCA_000959
<i>Burkholderia orbicola</i>	MC0-3	GCA_000001
<i>Burkholderia paludis</i>	LMG30113	GCA_902499105
<i>Burkholderia paludis</i>	MSh1	GCA_000732
<i>Burkholderia perseverans</i>	INN12 ^T	GCA_02287050
<i>Burkholderia plantarii</i>	ATCC43733 ^T	GCA_0014118
<i>Burkholderia plantarii</i>	KACC18964	GCA_03064452
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	GTC3P0254T	GCA_03029725
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Mahidol-1106a	GCA_000756
<i>Burkholderia pseudomultivorans</i>	BCC1191	GCA_902832925

<i>Burkholderia pseudomultivorans</i>	LMG26883 ^T	GCA_902499075
<i>Burkholderia puraquae</i>	CAMPA1040	GCA_0020991
<i>Burkholderia puraquae</i>	LMG29660	GCA_90285
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	DSM10685 ^T	GCA_0010286
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	mHSR5	GCA_0033307
<i>Burkholderia reimsis</i>	BE51	GCA_0032940
<i>Burkholderia savannae</i>	MSMB266 ^T	GCA_0015244
<i>Burkholderia savannae</i>	MSMB852	GCA_0015246
<i>Burkholderia seminalis</i>	869T2	GCA_000705
<i>Burkholderia seminalis</i>	FL-5-4-10-S1-D7	GCA_0017185
<i>Burkholderia singularis</i>	LMG28154 ^T	GCA_900176
<i>Burkholderia singularis</i>	TSV85	GCA_0015237
<i>Burkholderia stabilis</i>	ATCCBAA-67 ^T	GCA_0017421
<i>Burkholderia stabilis</i>	E	GCA_90024
<i>Burkholderia stagnalis</i>	LMG28156 ^T	GCA_902830275
<i>Burkholderia stagnalis</i>	MSMB735WGS	GCA_0017189
<i>Burkholderia territorii</i>	MSMB2203WGS	GCA_0016360
<i>Burkholderia territorii</i>	RF8-non-BP5	GCA_0017183
<i>Burkholderia thailandensis</i>	2002721643	GCA_0017186
<i>Burkholderia thailandensis</i>	E264 ^T	GCA_0035686
<i>Burkholderia ubonensis</i>	ATCC31433	GCA_0020977
<i>Burkholderia ubonensis</i>	MSMB2035	GCA_0017186
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	FDAARGOS_1488	GCA_02009935
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	FL-2-3-10-S3-D0	GCA_0015237
<i>Paraburkholderia fungorum</i>	ATCC BAA-463	GCA_000961515
<i>Paraburkholderia phytotfirmans</i>	PsJN ^T	GCA_000020125

^T- isolado tipo

2.5 Características genômicas da espécie

Foram extraídas do Genbank características genômicas de mais 10 genomas de Bco além dos descritos na Tabela 1, com boas qualidades de sequenciamento completo, a fim de comparar

aspectos como: tipo de sequenciamento, número de cromossomos e tamanho do genoma. (Anexo, Tabela 1)

2.6 Identificação de genes

2.6.1 Genes de resistência a antibióticos

Para identificar os genes de resistência a antibióticos usou-se a mesma base de dados: Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Alcock et al. 2023), em dois programas diferentes, Resistance Gene Identifier (RGI) v.6.0.3, em plataforma online própria (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) e pelo ABRicate v.1.0.1. (Seemann, 2016), no servidor galaxy (Galaxy versão 1.0.1), ambos nas configurações padrão.

2.6.2 Genes de virulência e patogenicidade

A análise de presença de genes de virulência foi realizada com o programa ABRicate v.1.0.1 (Seemann, 2016) no servidor Galaxy v.1.0.1. A base de dados VFDB (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria) (Liu et al. 2022) foi usada no genoma UnB1430, e por BLAST, os itens com identidade e cobertura superiores a 80% foram considerados presentes.

2.6.3 Genes de metabólitos secundários

Para identificar os clusters de genes biossintéticos (BGCs) relacionados à produção de metabólitos secundários, o genoma de UnB1430 foi analisado utilizando a plataforma antiSMASH v7.0 (Blin et al. 2023), com a configuração padrão de rigor máximo para detecção.

2.6.4 Genes de promoção de crescimento

Para a identificação *in silico* de genes envolvidos na promoção do crescimento vegetal (PCV), o genoma foi analisado usando a plataforma PlaBAs (Patz et al. 2021) com os parâmetros padrão. As anotações das proteínas foram processadas em um blastp + hmmer que permite a anotação direta de arquivos FASTA. Essas anotações foram mapeadas contra a ontologia de características de promoção de crescimento vegetal com a ferramenta PGPT-Pred, disponível no servidor.

2.7 Seleção de regiões genômicas exclusivas para Bco e desenho de primers para PCR

Para o desenho de *primers* específicos para *B. contaminans* foi usada a abordagem de subtração *in silico*. A seleção de regiões genômicas com potencial para o desenho de *primers* foi realizada utilizando o software RUCS, configurado com parâmetros padrão, visando identificar rapidamente *primers* para PCR direcionados a sequências core únicas (Thomsen et al., 2017). Para essa análise, foi compilado um conjunto de dados contendo 72 genômicas do gênero *Burkholderia*, representando basicamente as 36 espécies validadas dentro desse gênero e com genomas de melhor qualidade e 5 sequências de *B. contaminans*. O número de genomas por espécie foi de até dois de cada uma. Adicionalmente, foram incluídas duas sequências genômicas do gênero *Paraburkholderia* para expandir a análise comparativa (Tabela 1). Os *primers* foram desenhados para amplificar regiões específicas do DNA, com base nas sequências de referência selecionadas. A primeira região alvo selecionada tem como produto a proteína da família aldolase/aduccina classe II, já a segunda região tem como produto a molibdopterina molibdênio transferase. Cada *primer* foi então submetido a uma etapa de validação *in silico*, utilizando a ferramenta primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), na qual foram comparados com todos os genomas disponíveis no banco de dados NCBI. Esta validação teve como objetivo garantir a especificidade dos *primers*, assegurando que eles amplificassem exclusivamente o alvo desejado e reduzindo ao máximo a ocorrência de resultados falsos positivos. Três pares de *primers* foram selecionados e sintetizados pela empresa Exxtend.

Os *primers* sintetizados foram testados por PCR convencional. Cada reação foi preparada adicionando-se 9,9 µL de água ultrapura, 12,5 µL do kit master mix PROMEGA, 0,3 µL dos primers F/R (concentração de 10pmol/ µL), e 2 µL de DNA (20 ng/µL) (Tabela 2), totalizando 25 µL de volume de reação final. A amplificação foi realizada no termociclador (BioRad T100) programado para desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguida por 34 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57,5 °C (F1/R1), 59,3 °C (F3/R3), 60,1 °C (F4/R4) e 30 segundos a 72 °C, com extensão final de 72 °C por 5 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% a 120V, em tampão de corrida TBE, com a inserção do marcador 1 Kb-DNA-ladder (Kasvi), corados com Gel Red (Biotium), visualizados no transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados. A PCR foi realizada duas vezes, a primeira apenas com dois isolados de *B. contaminans* e a segunda, com diversas espécies de fitobactérias (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies bacterianas utilizadas para os testes de especificidade dos *primers*

Nome	Isolado
<i>Burkholderia contaminans</i>	UnB1430
<i>Burkholderia contaminans</i>	UnB 1431
<i>Xanthomonas euvesicatorica</i> pv. <i>perforans</i>	Xp-84
<i>Xanthomonas euvesicatorica</i> pv. <i>perforans</i>	Xp-1432
<i>Xanthomonas euvesicatorica</i> pv. <i>alli</i>	Xp-a
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Xv-828
<i>Xanthomonas campestris</i>	Xd-58
<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>diffenbachiae</i>	Xd
<i>Erwinia psidii</i>	Ep-A77
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Pc-1387

2.8 Ensaios *in vitro* dos testes de antagonismo, compostos voláteis, sideróforos e de resistência a antibióticos

2.8.1 Microrganismos e condições de crescimento para teste de antagonismo

A atividade antagônica de *B. contaminans* UnB1430 foi avaliada contra diversos fitopatógenos, incluindo 10 fungos, 3 oomicetos e 3 gêneros de bactérias (Tabela 3). Os isolados utilizados neste estudo pertencem às coleções dos Laboratórios de Micologia e Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (UnB) e da Embrapa Hortaliças, Laboratório de Fitopatologia, Gama-DF. Os fungos e oomicetos foram cultivados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), exceto *Phytophthora sojae*, cultivado em MEAD (Ágar Extrato de Malte Dextrose), enquanto as bactérias foram cultivadas em meio 523. Nos ensaios, foram utilizadas placas de Petri plásticas com 8 cm de diâmetro.

Tabela 3. Isolados de fungos, oomicetos e bactérias utilizados neste estudo para os testes *in vitro* de antagonismo

Grupo	Espécie	Isolado	Hospedeiro
Fungo	<i>Corynespora cassicola</i>	CCUB-2101	Algodão
	<i>Rhizoctonia solani</i>	CCUB-5402	Soja

	<i>Macrophomina phaseolina</i>	CCUB-4692	soja
	<i>Alternaria alternata</i>	CCUB-3248	Algodão
	<i>Diaporthe</i> sp.	CCUB-4259	Pequi
	<i>Fusarium solani</i>	CCUB-4657	Tomate
	<i>Fusarium graminearum</i>	Sem código	Trigo
	<i>Colletotrichum pluvivorum</i>	CCUB-3183	Algodão
	<i>C. karsti</i>	CCUB-5412	Gerânio
	<i>Bipolaris maydis</i>	CCUB-5411	Gerânio
Oomicetos	<i>Phytophthora theobromicola</i>	CCUB-1091	Cacau
	<i>P. palmivora</i>	CCUB-1205	Cacau
	<i>P. sojae</i>	CCUB-5401	Soja
Bactérias	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	UnB17	Mandioca
	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	UnB315	Mandioca
	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	EMBRAPA	Mandioca
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 607	Tomate
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 672	Tomate
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 702	Berinjela
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 507	Berinjela
	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	EH 2017-27	Tomate
	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	EH 2017-12	Tomate
	<i>Pseudomonas syringae</i>	AM4-F-2021-55	Tomate

2.8.2 Ensaio *in vitro* de dupla cultura (fungos e oomicetos)

A atividade antagônica da cepa UnB 1430 foi avaliada pela técnica de dupla cultura *in vitro* contra 10 fungos e 3 oomicetos (Tabela 3). Foram adotadas duas metodologias realizadas por Tagele et al. (2019) e Kong et al. (2020) de inoculação da bactéria no meio de cultura, com variações no formato. Na primeira (M1), uma alíquota de 10 µL da cultura bacteriana de UnB1430, com 24 a 48 horas de crescimento, foi inoculada a cerca de 1 cm da borda da placa. Posteriormente, um disco de 5 mm, retirado da cultura fúngica ativa, foi colocado no centro da mesma placa. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas luz. Na segunda metodologia (M2), duas linhas de colônias de UnB1430, sobre as mesmas condições de crescimento, foram estriadas a 2 cm de cada lado do centro da placa. Um disco de 5 mm de diâmetro, retirado de uma cultura fúngica ativa com 8 dias de crescimento, foi posicionado no centro da placa. O experimento foi conduzido com três repetições para cada isolado, incluindo os controles, e foi repetido duas vezes

sob condições similares. Os resultados foram avaliados medindo-se o diâmetro de inibição do crescimento fúngico em diferentes momentos após a inoculação (dpi), conforme as taxas de crescimento específicas dos fungos. As medições ocorreram aos 8 dpi para *Diaporthe* sp., *Bipolaris maydis*., *R. solani* e *M. phaseolina*, aos 10 dpi para *F. graminearum* e *A. alternata*, e aos 15 dpi para *Colletotrichum karsti*, *C. pluvivorum*, *Corynespora cassiicola*, *F. solani*, *P. palmivora*, *P. theobromae* e *P. sojae*. A atividade antifúngica de UnB1430 foi expressa como a porcentagem de inibição do crescimento (PGI), calculada conforme a fórmula de Zygodlo et al. (1994). O PGI foi determinado pela equação, $PGI = (GC - GT)/GC \times 100$, onde GC representa o diâmetro médio do fungo cultivado em BDA (controle); GT representa o diâmetro médio do fungo co-cultivado na placa de BDA.

2.8.3 Ensaio *in vitro* em dupla camada (bactérias)

A atividade antagônica de UnB1430 contra outras bactérias foi avaliada utilizando a técnica de dupla camada, proposta por Romeiro (2007). Colônias da bactéria antagonista, previamente cultivadas em meio sólido 523 durante 24 a 48 horas, foram semeadas por ponto no centro de placas contendo o mesmo meio, utilizando-se uma alça de repicagem para depositar uma gota da suspensão bacteriana na superfície do meio, seguido de incubação por 24 a 48 horas a 27 °C. Decorrido este período, as placas com as colônias foram expostas à luz ultravioleta durante 2 horas, com o objetivo de eliminar as células de *B. contaminans*. Posteriormente, cada placa recebeu uma camada adicional de 5 ml de meio semissólido com crescimento da bactéria alvo incorporado. No preparo desta camada, os inóculos das bactérias-alvo a serem testadas foram ajustados para as seguintes absorbância (OD₆₀₀ nm): 0,3 para *Xanthomonas*, 0,1 para *Pseudomonas* e 0,2 para *Ralstonia*. As placas foram incubadas a 27 °C e após 48-72 horas, foi medido diâmetro das zonas de inibição. O experimento foi conduzido com três repetições para cada isolado bacteriano, incluindo os controles, e repetido duas vezes sob condições similares.

2.8.4 Compostos voláteis

Para determinar a produção de compostos voláteis, utilizou-se o método de placas invertidas (Romeiro 2007). Foram usadas placas de Petri plásticas com 8 cm de diâmetro. Em placas contendo meio sólido 523, adicionou-se 0,1 ml da cultura da bactéria antagonista na fase logarítmica de crescimento, espalhando-se uniformemente com uma alça de Drigalski. Em outra

placa, contendo meio sólido BDA ou MEAD para *P. sojae*, transferiu-se um disco de 5 mm de diâmetro de um fungo em crescimento ativo para o centro. Posteriormente, as tampas das placas foram descartadas, utilizando-se o fundo de uma delas como tampa para a outra. As placas foram seladas assepticamente com papel filme e envolvidas em papel alumínio para garantir condições uniformes. A incubação ocorreu a 25 °C. Após 8 e 15 dias, foi medido o diâmetro do halo de micélio formado, quando comparado com um controle não tratado (na ausência de crescimento da antagonista). O experimento foi conduzido com três repetições para cada isolado, incluindo os controles, e foi repetido duas vezes sob condições similares. Este teste foi realizado exclusivamente para os fungos fitopatogênicos da soja: *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Phytophthora sojae*.

2.8.5 Ensaio de sideróforos

Para verificar a produção de sideróforos pelo isolado de *B. contaminans* UnB1430, este foi cultivado em meio King's B por 48 horas sob agitação, em tubos Eppendorf de 2 mL (Schwyn e Neilands, 1987). Como controle, foram preparadas culturas no mesmo meio de cultura, suplementadas com Fe^{3+} a 2 μM (solução de estoque de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ recém-preparada e esterilizada por filtração). Além disso, um controle negativo consistiu no meio de cultura sem culturas bacterianas. Os frascos foram mantidos a 29 °C por 48 horas, e o meio com o crescimento bacteriano foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, o precipitado foi descartado. Volumes iguais (500 μL) do sobrenadante e da solução de corante azul de cromo S (indicador) foram misturados em um tubo de ensaio. Os tubos contendo a mistura foram avaliados em um período de 15 minutos, e a mudança de cor de azul para "amarelo-laranja" indicou a produção de sideróforos pelo antagonista. Todos os artigos de vidro utilizados neste ensaio foram previamente lavados com HCl a 10% antes do uso.

A solução indicadora de azul de cromo (CAS) consistiu em uma mistura de quatro soluções previamente preparadas: 6 mL da solução de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA) a 10 mM; 1,5 mL de solução de ferro (III) (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 mM HCl) adicionada sob agitação; posteriormente, uma alíquota de 7,5 mL de solução aquosa de CAS a 2 mM foi adicionada lentamente sob agitação; e, por fim, foram adicionados 25 mL de uma solução contendo 4,307 g de piperazina anidra previamente dissolvida em 93,75 mL água e 6,25 mL de HCl a 12 M,

cuidadosamente incorporada (Schwyn e Neilands, 1987). Essa solução tampão foi ajustada para pH 5,6, e o volume foi completado para 100 mL com água Milli-Q.

2.8.6 Teste de resistência a antibióticos

O isolado UnB1430 foi testada quanto à resistência a antibióticos *in vitro*. Após 24-48 horas de cultivo em meio King's B, foi retirada uma alíquota de 100 µL, previamente quantificada para OD₆₀₀ nm (0,1 de absorbância, correspondendo a 10⁸ UFC/mL), espalhada em uma placa contendo o mesmo meio de cultura, utilizando uma alça de Drigalski. Em seguida, discos comerciais impregnados com antibióticos foram colocados em placas inoculadas com *B. contaminans* UnB1430 e incubadas por 12h. Para mensurar a resistência e a sensibilidade, as zonas de inibição foram medidas. Foram testados antibióticos dos grupos aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e macrolídeos (Tabela 4). Os discos utilizados para os antibiogramas foram adquiridos das empresas SENSIFAR e LABORCLIN.

Tabela 4. Grupos e respectivos nomes dos antibióticos testados e concentrações para avaliar a reação da cepa UnB1430 de *Burkholderia contaminans*

Grupo	Nome do antibiótico	Concentração (MCG)
Aminoglicosídeos	Aminocacina	30
	Gentamicina	10
	Streptomina	10
	Tobramicina	10
	Neomicina	30
Tetraciclina	Minociclina	30
	Doxiciclina	30
	Tetraciclina	30
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5
	Levofloxacina	5
	Norfloxacina	10
Macrolídeos	Azitromicina	15
MCG: Micrograma (µg)		

2.9 Potencial de Bco UnB1430 como antagonista e promotor de crescimento de plântulas

2.9.1 Material vegetal e microbiolização das sementes

Foram utilizadas sementes de soja da variedade “Tormenta” (BRASMAX) nos testes *in vivo*. As sementes foram previamente desinfestadas por imersão com etanol a 70% por 3 minutos, seguidas por hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes com água estéril, e secas em papel filtro estéril por 4 h em câmara de fluxo laminar. A microbiolização foi realizada adotando a metodologia de Correa et al. (2009) com modificações. As sementes foram mergulhadas em uma suspensão da bactéria antagonista UnB1430, preparada com água estéril e com colônias cultivadas por 24 a 28 horas a 28 °C. Em seguida, as sementes e a suspensão bacteriana foram colocadas em frascos tipo Erlenmeyer de 150 mL e mantidas sob agitação constante a 200 rpm por 5 horas. A suspensão bacteriana foi ajustada para OD_{600 nm} = 0,1 de absorbância, correspondendo a 10⁸ UFC/mL. Também foram feitas diluições para se atingir uma concentração de 10⁵ UFC/mL quando se precisava dessa concentração. Sementes imersas em água estéril serviram como controle. Após tratamento, as sementes foram secas ao ar, durante a noite. Para confirmar a microbiolização, realizou-se um teste no qual, após a secagem, quatro sementes microbiolizadas e quatro do controle foram colocadas em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA). O crescimento da bactéria foi observado após 24 horas de incubação a 28°C na BOD.

Outro teste para avaliar a capacidade de colonização do sistema radicular por Bco foi realizado utilizando sementes microbiolizadas, seguindo a metodologia descrita por Brasil (2009), com modificações. Em uma caixa plástica desinfestada (37 cm de comprimento, 26,5 cm de largura e 11 cm de altura), foram colocadas quatro folhas de papel Germitest umedecidas com o volume de água calculado pelo peso do papel multiplicado por 2,5. As folhas umedecidas foram organizadas em formato de sanduiche, com duas folhas na base e duas no topo, e as sementes de soja microbiolizadas foram depositadas no centro. Em seguida, as folhas com as sementes foram cuidadosamente enroladas e envoltas em uma sacola plástica. Esse rolo foi incubado em BOD a 28 °C e o mesmo procedimento foi realizado para as sementes controle. Após a emergência das

plântulas (8 dias de incubação), o sistema radicular foi cuidadosamente cortado e transferido para placas de Petri de 15 cm contendo meio TSA. As placas foram incubadas por 48 horas a 28°C e a colonização da bactéria nas raízes foi observada.

2.9.2 Experimento 1: Potencial de biocontrole de UnB1430 contra *Rhizoctonia solani*

Preparação do inóculo fúngico de *R. solani*: O isolado CCUB-5402 de *R. solani* (Tabela 4) foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por um período de 8 a 10 dias. Grãos de arroz, misturados com 65% de água destilada, foram colocados em sacos de polipropileno vedados com base de PVC e algodão e posteriormente autoclavados a 121 °C por 30 minutos a 1 atm de pressão. Em câmara de fluxo laminar, 10 discos de micélio de 5 mm, retirados das bordas da colônia em crescimento ativo, foram transferidos para os sacos contendo arroz esterilizado e incubados a 25 °C por 12 dias. Após esse período de incubação, o inóculo foi triturado em liquidificador para ser utilizado nos experimentos.

Ensaio de antagonismo com UnB1430: O isolado UnB1430 foi avaliado quanto ao seu potencial de supressão contra o isolado CCUB-5402 de *R. solani* em condições de casa de vegetação, em pré e pós-emergência da soja. Os experimentos foram conduzidos em vasos de 400 ml, contendo uma mistura de 30% de solo autoclavado e 70% de substrato à base de fibra de coco (Adubos Bioferteis). Em cada vaso, foram semeadas duas sementes de soja, que representaram uma unidade experimental. O delineamento experimental foi realizado em blocos completamente causalizados (DBC), com três repetições, e com 4 tratamentos organizados, conforme descrito na Tabela 5, sementes microbiolizadas com *B. contaminans* e sementes não inoculadas, serviram como controles. O experimento foi repetido duas vezes em condições similares. O inóculo de *R. solani* foi incorporado aos vasos de duas formas, como abaixo:

Pré-emergência: no primeiro bioensaio, cada vaso recebeu 5 g de inóculo de *R. solani* misturado com o solo e substrato. Cada tratamento contou com 10 unidades experimentais.

Pós-emergência: no segundo bioensaio, após a emergência das plântulas e com o desenvolvimento de duas folhas verdadeiras, o inóculo de *R. solani* foi inoculado em cada vaso, na base do caule de cada plântula, com cuidado para não danificar as raízes. Cada tratamento contou com 8 unidades experimentais.

Tabela 5. Descrição dos tratamentos implementados nos experimentos para avaliação do potencial antagonista de UnB1430 contra *Rhizoctonia solani* em plântulas de soja

Tratamentos	Etiqueta	Descrição
1	Controle	Sem bactéria e sem fungo
2	Bco	Apenas <i>B. contaminans</i> UnB1430 (10 ⁸ UFC/mL)
3	Bco + Rs	Com <i>B. contaminans</i> UnB1430 (10 ⁸ UFC/mL) + <i>R. solani</i>
4	Rs	Apenas <i>R. solani</i>

Avaliação da severidade da doença: As plântulas foram avaliadas 15 dias após a inoculação, e a severidade da doença foi determinada utilizando uma escala de notas descritiva variando de 0 a 4, de acordo com Dorrance et al. (2003) onde: 0 = ausência de sintomas, 1= hipocótilo com pequenas lesões, e entre 1 a 33% de raízes visíveis ou podridão radicular, 2= hipocótilo com grandes lesões, mas sem constrições, com aproximadamente entre 33 a 50% das raízes apodrecidas ou danificadas, 3 = hipocótilo com lesão afundada e constrição do caule basal e entre 50 até 80% das raízes apodrecidas e 4= sementes não germinadas e/ou plântulas não emergidas ou presença de poucas raízes.

Com base nas notas atribuídas, foi calculado o índice de doença (ID) utilizando a fórmula de McKinney (1993).

$$ID (\%) = \frac{\sum(f \times n)}{F \times N} \times 100$$

ID (%) = índice de doença

f = pontuação atribuída a cada muda

n = número de mudas com esta pontuação

F = número total de mudas avaliadas

N = maior pontuação

2.9.3 Experimento 2: Avaliação de *Burkholderia contaminans* UnB1430 como promotora de crescimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Estação Experimental de Biologia da UnB, utilizando vasos com capacidade para 1 kg de solo. Cada vaso foi preenchido com uma mistura composta por 30% de solo autoclavado e 70% de substrato a base de fibra de coco (Adubos Bioferteis). O delineamento experimental adotado foi o de blocos completamente casualizados (DBC), com 3 repetições e 5 tratamentos (Tabela 6). Cada tratamento contou com 10 vasos, nos quais foram semeadas duas sementes por vaso. No entanto, apenas uma planta por vaso foi considerada como unidade experimental, sendo eliminada a menos vigorosa. Dois dos cinco tratamentos receberam suspensão bacteriana como método de inoculação da bactéria. As sementes usadas nesses tratamentos foram microbiolizadas da mesma forma que as do controle. A suspensão bacteriana (90 mL) (Tabela 6) foi aplicada ao solo ao redor da base do caule entre 12 a 15 dias após a semeadura, quando as plântulas apresentavam duas folhas verdadeiras. As avaliações ocorreram aos 25 e 45 dias após a emergência, analisando-se cinco plantas no primeiro período e quatro no segundo período. Os parâmetros avaliados incluíram: altura da planta, comprimento da raiz, peso fresco total e da raiz, além de biomassa seca total e da raiz. Para as análises de biomassa seca, as plantas foram colocadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa a 60 °C por 24 horas.

Tabela 6. Descrição dos tratamentos implementados nos experimentos para avaliação do potencial de promoção de crescimento de soja pela cepa UnB1430

Tratamentos	Etiqueta	Descrição
1	Controle	Sem aplicação de bactéria
2	SemBco 10 ⁸	Sementes microbiolizadas com <i>B. contaminans</i> (10 ⁸ UFC/mL)
3	SemBco 10 ⁵	Sementes microbiolizadas com <i>B. contaminans</i> (10 ⁵ UFC/mL)
4	SusBco 10 ⁸	90 mL de suspensão de <i>B. contaminans</i> (10 ⁸ UFC/mL)
5	SusBco 10 ⁵	90mL de suspensão de <i>B. contaminans</i> (10 ⁵ UFC/mL)

2.10 Análises estatísticas

Os dados de todos os ensaios foram previamente testados quanto à normalidade e homoscedasticidade e, em seguida, submetidos à análise de variância (ANOVA). Assim, o efeito dos fatores principais e a interação entre eles foram avaliados pelo teste F ($\alpha = 5\%$). Análises post hoc foram realizadas para obter as estimativas das médias marginais e os respectivos intervalos de confiança. Posteriormente, foi realizada a comparação múltipla das médias de tratamento a 5% de significância usando o teste de Tukey. Sempre que houve efeito significativo, as comparações múltiplas foram conduzidas. Quando os dados não atenderam às pressuposições de normalidade e homoscedasticidade, estes foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e, quando este apresentou efeito significativo, a comparação das médias foi realizada utilizando o teste de Dunn. Todas as análises e gráficos foram produzidos usando o software R (Core Team 2022).

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento da bactéria

A bactéria isolada de folhas do gerânio apresentou colônias mucoides de pigmentação amarela e brilho metálico em meio NA e apresentou crescimento rápido (24 h) a 28°C (Figura 1). No teste de coloração de Gram, resultou como Gram-negativa. Nos testes de infiltração nas folhas de tomate e tabaco, o resultado foi positivo para reação de hipersensibilidade (HR) após 24 horas após a infiltração, indicando que a bactéria poderia ter potencial fitopatogênico. No entanto, apesar de várias tentativas de inoculação em folhas de gerânio, não foram observados sintomas característicos semelhantes aos originais, e os testes de fluxo bacteriano resultaram negativos. Após a última tentativa de inoculação, realizada com auxílio de uma tesoura nas folhas, a bactéria foi reisolada das folhas. A cultura pura obtida a partir do reisolamento das lesões no gerânio apresentou as mesmas características culturais da bactéria original e confirmou-se sua identidade pela comparação dos perfis de BOX-PCR. Esta cultura recebeu o código UnB1431 (ANEXOS, Figura 1). As folhas de gerânio utilizadas para o reisolamento apresentavam lesões foliares de cor pretas, a partir das quais também foram isolados dois fungos. Inicialmente, esses fungos foram caracterizados morfolologicamente como *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp., Posteriormente, a caracterização molecular foi realizada por meio do sequenciamento do gene marcador gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A amplificação do GAPDH foi realizada usando os primers Gdp1 (5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3') e Gdp2 (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') para *Bipolaris* sp.; eos primers GDF1 (5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA 3') e GDR1 (5'-GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3') para *Colletotrichum* sp. A análise molecular confirmou a identidade dos dois fungos como *Colletotrichum krasti* e *Bipolaris maydis*.



Figura 1. **A.** Folhas de gerânio com manchas necróticas das quais foi feito o isolamento de *B. contaminans* UnB1430 **B.** Características culturais da bactéria isolada, cultivada em meio 523 a 28°C por 48 horas.

3.2 Sequenciamento do genoma e identificação do isolado UnB 1430

A plataforma de sequenciamento PromethION gerou 254.249 reads do isolado UnB1430, com tamanho mínimo de leitura de 1000 bases e máximo de leitura de 88000 bases, com cobertura genômica média de 146,9x. O CheckM Analysis mostrou 99.89% de completude e baixa contaminação de 0.09%, indicando genoma de alta qualidade. A bactéria apresenta três cromossomos, com 3.249.807 bp, 3.637.183 bp e com 1.529.208 bp, e um teor médio de G+C de 66,5%. Outras características do genoma estão descritas na Tabela 7. O genoma foi depositado no GenBank sob número de acesso GCA_040215475.1.

Tabela 7. Características gerais do genoma da cepa UnB1430 de *Burkholderia contaminans*

Dados	UnB1430
Data de coleta	2023
Pais	Brasil
Estado	Distrito Federal
BioProjeto Genbank	PRJNA1120374
Amostra Biológica do Genbank	SAMN41688866
Plataforma de sequenciamento	Oxford Nanopore PromethION

Total de leituras longas	254.249
Método de montagem	Flye v. 2.9.3; Medaka v. 1.12.0
Completude do ChecKM (%)	99.89
contaminação (%)	0.09%
Cobertura	146.9X
Tamanho do genoma (Mb)	8.4
Teor G + C (%)	66.5
Replicons	3
Genes (total)	7,597
Genes (sequencias codificantes)	7,401
Genes (RNA)	90
rRNA (5S, 16S, 23S)	6, 6, 6
tRNA	68
ncRNAs	4
Pseudogenes	106
Plasmideo	0

A análise ANI (Average Nucleotide Identity) identificou o isolado UnB1430 como *B. contaminans*, com valor de 97% de identidade com isolados de *B. contaminans* e 99,98% com o isolado tipo LMG 23361. Com as demais espécies de *Burkholderia* a identidade ficou entre 82,4 e 94,57% na análise de ANI (Tabela S1).

3.3 Características genômicas da espécie *Burkholderia contaminans*

Conforme as informações extraídas do GenBank, foram identificados 15 genomas completos de isolados de Bco com boa qualidade. Os tamanhos variam de 8.136.142 pb (SCAID TST1-2021) a 9.438.657 pb (LMG 23361), com número de cromossomos/plasmídeos entre 3 e 7. O total de genes anotados no UnB1430 foi de 7.602, sendo ligeiramente inferior à LMG23361 (8.756) e superior à cepa FL-1-2-30-S1-D0 (7.338). Quanto aos pseudógenes, o UnB1430 apresentou 106, posicionando-se entre os valores extremos observados de 101 (FL-1-2-30-S1-D0) a 532 (FF145). O índice de CheckM para o UnB1430 foi de 99,89%, consistente com a alta completude dos demais isolados, que variam de 93,88% a 100%. Em relação ao método de sequenciamento, foram usados, Illumina, Oxford Nanopore e PacBio. Outro ponto observado é que vários isolados têm origem de solo, água, rizosfera de animais e de pacientes humanos (Anexo, Figura 1).

3.4 Identificação de genes de resistência a antibióticos

Utilizando o software RGI e ABRICAT e a base de dados CARD, foram identificados diversos genes associados à resistência a antibióticos (ARGs) na cepa *B. contaminans* UnB1430. No RGI, foram detectados três genes: *adeF*, relacionado à resistência a fluoroquinolonas e tetraciclina; *amrA*, associado à resistência a aminoglicosídeos e cloreto de benzalcônio; e identificados o *qacG*, que confere resistência a tobramicina e azitromicina. No ABRICAT, foram identificados outros seis genes, incluindo *amrA*: *opcM*, *ceoB* e *ceoA*, associados à resistência a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas; *Omp38* (de *Burkholderia pseudomallei*), relacionado à resistência a betalactâmicos; e *amrB* relacionado também à resistência a aminoglicosídeos. Esses ARGs estão relacionados a mecanismos mediados por bombas de efluxo, pertencentes especificamente às famílias de resistência, nodulação e divisão celular (RND) e resistência a múltiplas drogas (SMR) (Tabela S2).

3.5 Identificação de genes de virulência e patogenicidade

No genoma de UnB1430 foram identificados 39 genes associados a fatores de virulência, característicos do gênero *Burkholderia* (Tabela 8). Entre eles, o gene *cdpA* relacionado à regulação; *pmlR/bspR1*, parte do sistema de *quorum sensing*; *pilD*, associado ao sistema de adesão via pili tipo IV; e os genes *wcbR*, *wcbS* e *wcbT*, que desempenham um papel na inibição da fagocitose através da capsula I. Outros 33 genes identificados estão envolvidos na mobilidade e invasão pertencendo às famílias *che*, *flg*, *flh*, *fli*, e *mot*, responsáveis pela codificação dos componentes do flagelo. Não foram identificados genes relacionados com o sistema de secreção empregado para inserção de efetores na hospedeira (TTSS) e os genes relacionados ao sistema de pili do tipo IV estavam incompletos e assim comprometendo o processo de adesão.

Tabela 8. Principais fatores de virulência de *Burkholderia* e genes identificados no genoma da cepa UnB1430

Fator	Genes	Clusters	Genes identificados em UnB1430
Adesão	<i>BoaA</i>		Ausente
	<i>BoaB</i>		Ausente

	pili tipo IV	<i>pilA, pilB, pilC, pilD, pilV, pilM, pilS, pilR, pilQ, pilP, pilO, pilN, pilL, pilT</i>	<i>PilD</i>
Sistemas de secreção	<i>Bsa T3SS</i>		Ausente
	<i>T6SS-1</i>		Ausente
Motilidade	<i>BimA</i>		Ausente
	Flagelos	<i>fliL, fliM, fliN, fliO, fliP, fliQ, fliR, fliK, fliJ, fliI, fliM, fliG, fliF, fliE, fliS, flgN, flgM, flgA, flgB, flgC, flgO, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flgJ, flgK, flgL, fliA, flhG, flhF, flhA, flhB, cheZ, cheY, cheB, cheD, cheR, tsr, cheW, cheA, cheY1, motB, motA, fliC, fliD</i>	<i>cheA, cheB, cheD, cheR, cheW, cheY, cheZ, flgA, flgB, flgC, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flgK, flgN, flhA, flhB, fliA, fliF, fliG, fliH, fliI, fliJ, fliM, fliN, fliP, fliQ, fliR, motA, motB</i>
Antifagocitose	capsula I	<i>BPSL2786, wcbT, wcbS, wcbR, wcbQ, wcbP, wcbO, wcbN, wcbM, gnhA, wcbL, wcbK, wcbJ, wcbI, wcbH, wcbG, wcbF, wcbE, wzt2, wzn, wcbD, wcbC, wcbB, wcbA, manC</i>	<i>wcbR, wcbS e wcbT</i>
Biofilmes	<i>Quorum sensing</i>	<i>bspl2, bspl3, bspR2, bsp3, bspR4, bspR5, pmlI/bspI1, pmlR/bspR1,</i>	<i>pmlR/bspR1</i>
Regulação	<i>CdpA</i>		Presente

3.6 Metabólitos secundários

A análise realizada no site antiSMASH, especializado na identificação de genes homólogos relacionados à produção de antibióticos e metabólitos secundários, identificou a presença de 20 clusters de genes biossintéticos (BGCs) no genoma de UnB1430 (Tabela 9). Com base na identidade de sequência, cinco desses BGCs (regiões 1.8, 1.11, 2.2, 3.1 e 3.3) apresentaram mais de 50% de similaridade com clusters conhecidos, associados à biossíntese de N-aciloxiácil glutamina, piochelina, ornibactina C4/C6/C8, pirrolnitrina e occidiofungina A. Os demais clusters apresentaram baixa similaridade com aqueles previamente descritos na literatura.

Tabela 9. Cluster de genes biossintéticos (BGCs) identificados no genoma de *B. contaminans* UnB1430 pelo antiSMASH

Cr	R	Localização (nt)		Tipo de cluster de genes previsto por antiSMASH	Agrupamento conhecido e mais semelhante	%
CP157952.1	1.1	1	20.650	Betalactona	lipopolissacarídeo	5%
	1.2	109.132	131.270	Redox-cofator	-	-
	1.3	145.634	166.737	Terpeno	-	-
	1.4	727.096	751.200	Terpeno	-	-
	1.5	808.096	818.482	Ectoína	-	-
				Cianeto de hidrogênio/semelhante a NRPS	-	-
	1.6	1.431.088	1.477.068	Fosfato	Tripeptídeofosfinotricina	6%
	1.7	2.028.915	2.061.811	Terpeno	N-aciloxiiacil glutamina	50%
	1.8	2.186.931	2.207.995	Hserlactona	-	-
	1.9	2.837.569	2.858.177	Terpeno	-	-
	1.10	3.027.684	3.048.754	NRP-Metalóforo/ NRPS	piochelina	100%
CP157953.1	2.1	773.559	794.461	Terpeno	-	-
				NRP-Metalóforo/ NRPS	Ornibactina C8/ornibactina C4/ornibactina C6	100%
	2.2	1.140.113	1.205.212	T1PKS	o-antígeno	19%
	2.3	2.124.332	2.171.969	Em polietileno	APE Vf	10%
	2.4	3.417.033	3.458.244			
CP157954.1	3.1	74.446	115.531	Outro	pirrolnitrina	100%
	3.2	520.525	531.340	RiPP-like	-	-
				NRPS-como /NRPS /T1PKS /TERPENO	Occidiofungina A	94%
	3.3	1.042.316	1.128.522	Betalactona		
	3.4	1.354.594	1.378.497	Betalactona		
	3.5	1.497.623	1.527.880	Betalactona	lipopolissacarídeo	5%

Cr: Cromossomo

R: Região

%: Similaridade com BGCs

3.7 Identificação dos genes de promoção de crescimento

A análise do genoma de *B. contaminans* UnB1430 no servidor PLaBAs revelou a presença de 4515 genes associados a características promotoras de crescimento de plantas (PGPTs), relacionadas a diversos efeitos diretos e indiretos (Figura 2). Desses, 67% estão ligados a mecanismos indiretos, como a colonização do sistema radicular, exclusão competitiva, controle de estresse/biocontrole, estimulação da resposta de defesa da planta e funções putativas. Os outros 33% dos genes estão associados a mecanismos diretos, incluindo biofertilização, produção de fitohormônios e sinais vegetais, e biorremediação (Figura 2). Entre esses, os genes relacionados à biofertilização representam 15% e desempenham funções como solubilização de potássio (K) e fósforo (P), assimilação de enxofre, aquisição de nitrogênio, fixação de dióxido de carbono (CO₂), e aquisição de ferro por meio de hemóforos e sideróforos, além de homeostase e outros sistemas de transporte e aquisição de ferro.

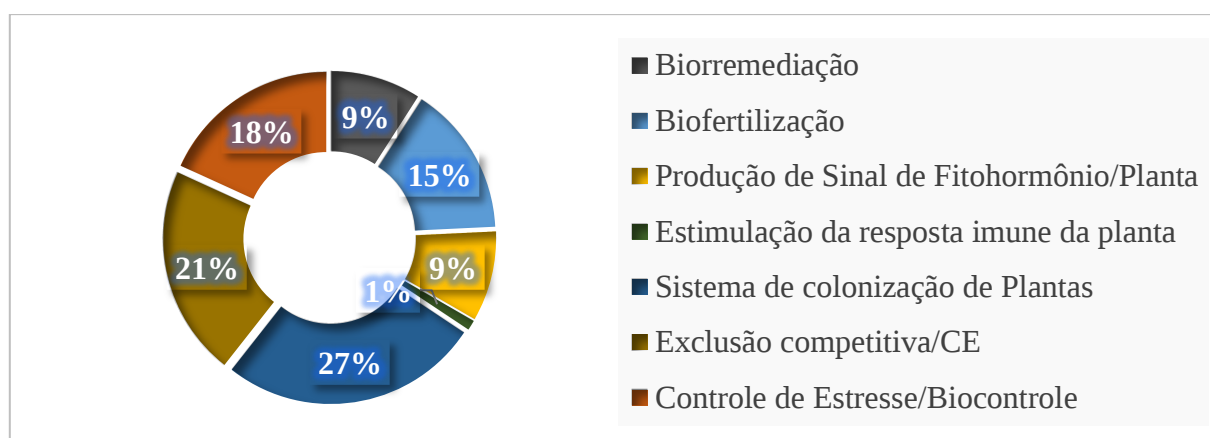


Figura 2. Distribuição percentual das funções associadas aos genes associados a promoção de crescimento identificados no genoma de UnB1430, por médio da PLaBAs

Os genes associados à produção de fitohormônios e sinais vegetais representam 9% e incluem funções como síntese de vitaminas vegetais, compostos voláteis e sinais que regulam e estimulam a ramificação das plantas, sinalização durante a embriogênese e estímulo à germinação. Esses genes também estão envolvidos na produção de fitohormônios como citocininas, auxinas, giberelinas, xantina e ácido gama-aminobutírico (GABA), bem como na produção de fosfolipídios de sinalização vegetal, terpenoides e seus derivados, ubiquinona/coenzima Q e carnitina vegetal.

Os genes relacionados à biorremediação correspondem aos últimos 9% dos mecanismos diretos, estando envolvidos na descontaminação de metais pesados e na biodegradação de xenobióticos (Tabela S3).

3.8 Desenho de *primers*

Foram desenhados três pares de *primers* (Tabela 10), que foram utilizados no presente estudo para a detecção da bactéria *B. contaminans* nos ensaios *in planta* e quando necessário como uma ferramenta para confirmação da identidade. Essa abordagem foi necessária, pois, até o momento, não existem *primers* descritos na literatura para a identificação molecular específica de *Bco*.

Tabela 10. Lista dos *primers* desenhados com base no genoma de *B. contaminans* e seus respectivos amplicons

<i>Primers</i>	Sequências (5' -> 3')	pb
BurkC_F1	GCTCCCCGAATTCTCCATTC	205
BurkC_R1	CGTGACTTCCTCGTACAGC	
BurkC_F3	AATACGGTGGGACATCGACC	126
BurkC_R3	ATGCCGCGCAGGGTG	
BurkC_F4	CGGGAAATACGGTGGGACA	82
BurkC_R4	CGCGCTTGCCTCGCC	

3.9 Teste dos *primers* em PCR convencional

Dos três pares de *primers* sintetizados, apenas os pares BurkC F1/R1 e F3/R3 geraram amplicons específicos na PCR, sem amplificação de fragmentos inespecíficos com o DNA dos dois isolados de *B. contaminans* utilizados no teste, demonstrando-se adequados para o alvo. O outro par de *primers* testado F4/R4 não amplificou o fragmento esperado de 82 pb (Figura 3). Posteriormente, os *primers* que amplificaram *B. contaminans* foram testados contra diversas bactérias fitopatogênicas para verificar sua especificidade. O *primer* BurkC F1/R1 amplificou um fragmento próximo de 200 pb em *Xanthomonas vesicatoria* (Xv-828), *Erwinia psidii* (Ep- A77) e *Pseudomonas cichorii* (Pc-1387) (Figura 4). Por outro lado, o *primer* BurkC F3/R3, apresentou maior especificidade para *B. contaminans*, sem amplificação do DNA de outras isolados de

espécies fitopatogênicas (Figura 5). Esse resultado indica que o primer BurkC F3/R3 tem um maior potencial para uso na identificação de *B. contaminans*

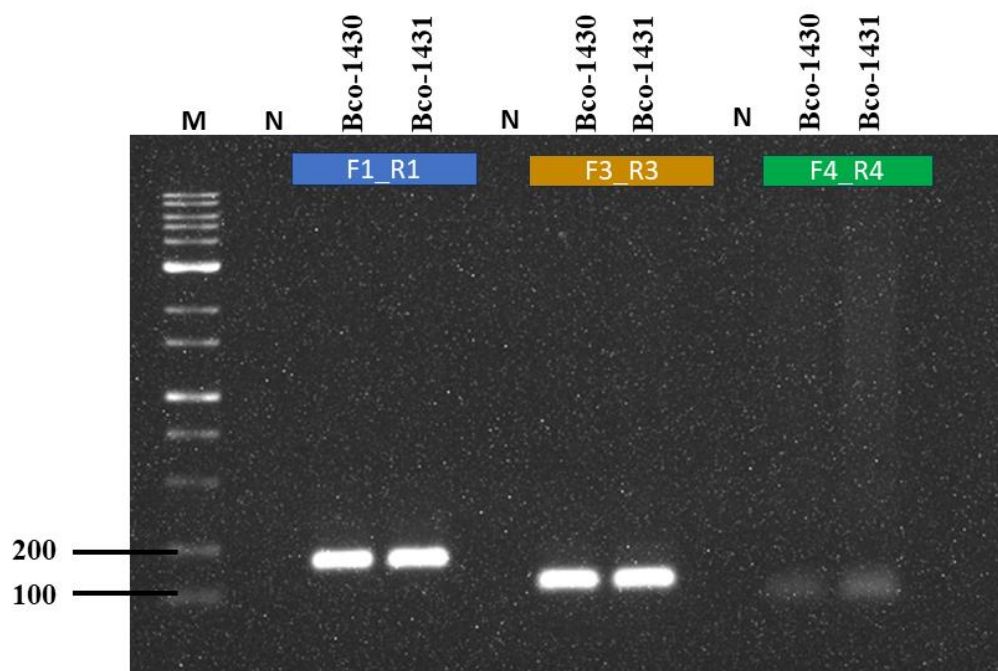


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos amplicons gerados por PCR com três pares de *primers*: BurkC, F1/R1, F4/R4 e F3/R3, utilizando DNA de dois isolados de *B. contaminans* (UnB1430 e 1431). As reações foram realizadas com temperatura de anelamento de 57,5°C para F1/R1 (fragmento de 205 pb), 59,3°C para F3/R3 (fragmento de 126 pb), e 60,1°C para F4/R4 (fragmento de 82 pb). M-marcador 1 Kb Kasvi. N-contrôle negativo (água).

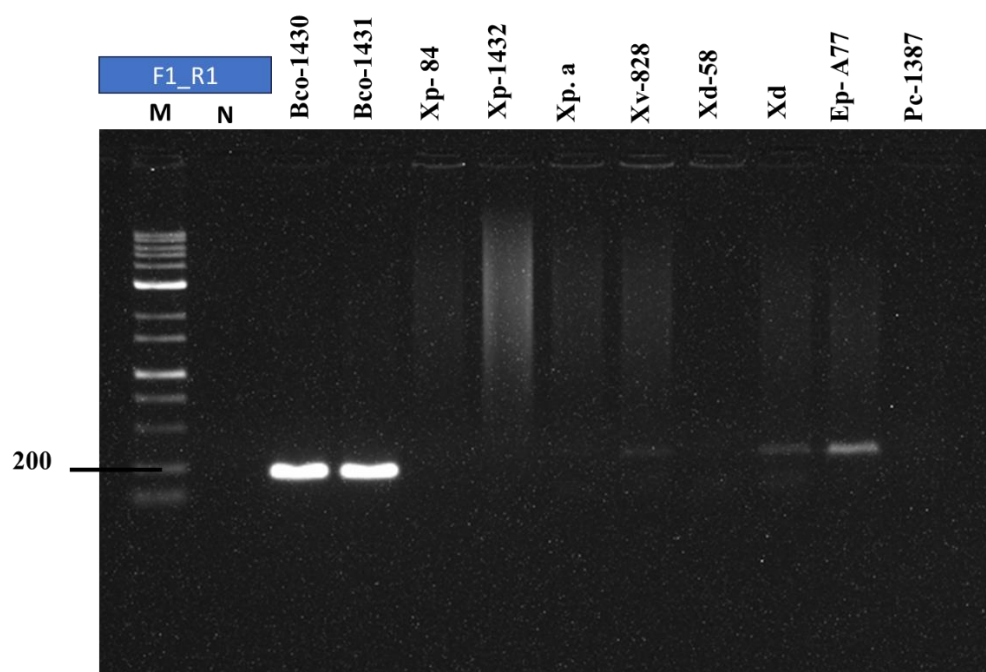


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos amplicons gerados por PCR com o par de *primers*, BurkCF1/R1 com diversos isolados de bactérias fitopatogênicas (Tabela 2), com temperatura de anelamento de 57,5°C. Tamanho do fragmento esperado: 205 pb. M-marcador 1 Kb Kasvi. N- controle negativo.

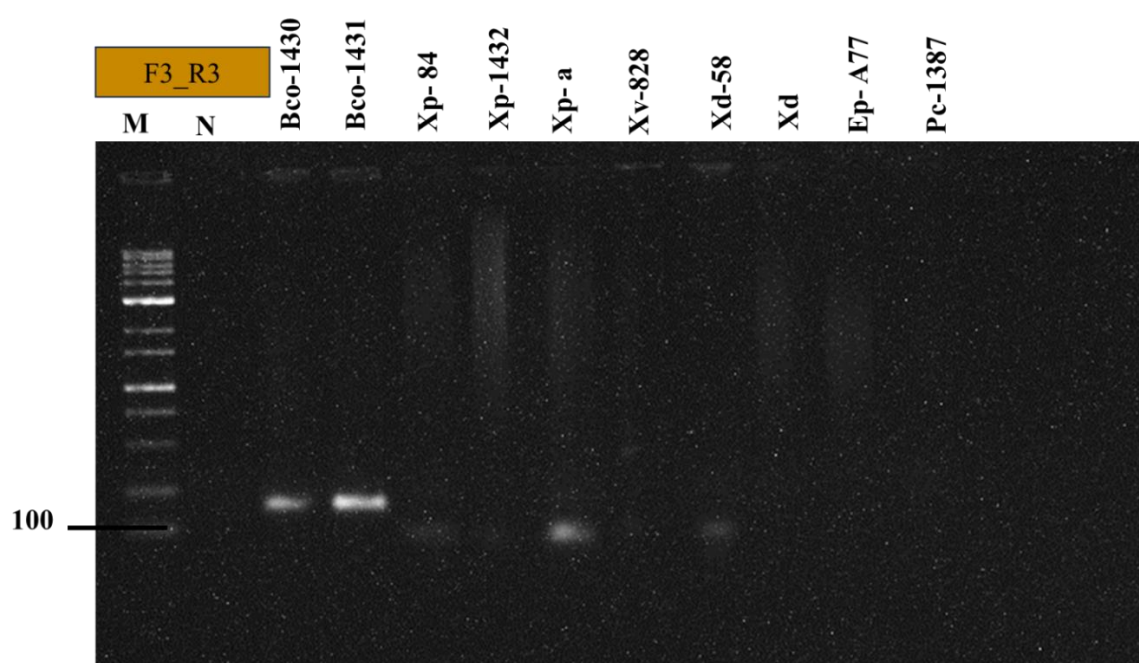


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos amplicons gerados por PCR com o par de *primers*,

BurkCF3/R3 com diversos isolados de bactérias fitopatogênicas (Tabela 2), com temperatura de anelamento de 59,3°C. Tamanho do fragmento esperado: 126 pb. M-marcador 1 Kb Kasvi. N-controle negativo.

3.10 Ensaios *in vitro*

3.10.1 Antagonismo a fungos fitopatogênicos

A atividade antifúngica de UnB1430 foi avaliada contra 13 fungos fitopatogênicos, previamente mencionados (Tabela 3), utilizando a técnica de cultura dupla e dois métodos distintos de inoculação da bactéria antagonista. A cepa UnB1430 demonstrou inibição significativa do crescimento micelial de todos os fungos testados, embora a eficiência da atividade inibitória tenha sido variável entre as espécies. Houve formação de halo ao redor da bactéria antagonista, indicando que a inibição não ocorreu apenas por competição, mas também possivelmente pela produção de metabólitos secundários. Além disso, mudanças visíveis na coloração micelial foram observadas nos fungos confrontados com a cepa UnB1430 (Figura 6). No método M2 (duas linhas paralelas estriadas da cepa UnB1430 a 2 cm de cada lado do centro da placa, com um disco do fungo depositado na metade entre as duas linhas), a maior porcentagem de inibição foi observada para *Phytophthora sojae* (PS), com uma média de $84,8 \pm 1,38$, destacando-se estatisticamente em relação aos demais fungos. Na sequência, isolados como *Rizoctonia solani* (RS), *P. palmivora* (PP) e *Bipolaris maydis* (BM) também apresentaram inibições superiores a 80% sem diferenças significativas entre si. Por outro lado, o isolado que apresentou a menor inibição foi *Fusarium solani* (FS), com uma média de $54,3 \pm 1,38$, resultado semelhante na metodologia M1 (10 µL de suspensão de células de UnB1430 inoculados a 1 cm da borda da placa, enquanto um disco da cultura fúngica foi colocada no centro da placa). No método M1, o comportamento dos isolados testados foi diferente, com resultados significativamente menores em comparação ao método M2. O isolado PS, que teve o melhor desempenho no método M2, apresentou uma redução considerável na inibição, com média de $26,2 \pm 1,38$. Isolados como RS e *Macrophomina phaseolina* (MP) seguiram a mesma tendência, com percentuais mais baixos de inibição. No entanto, *Phytophthora theobromicola* (PT) foi o isolado que apresentou a maior porcentagem de inibição e diferenças significativas, com média de $46,7 \pm 1,38$ em relação aos demais isolados.

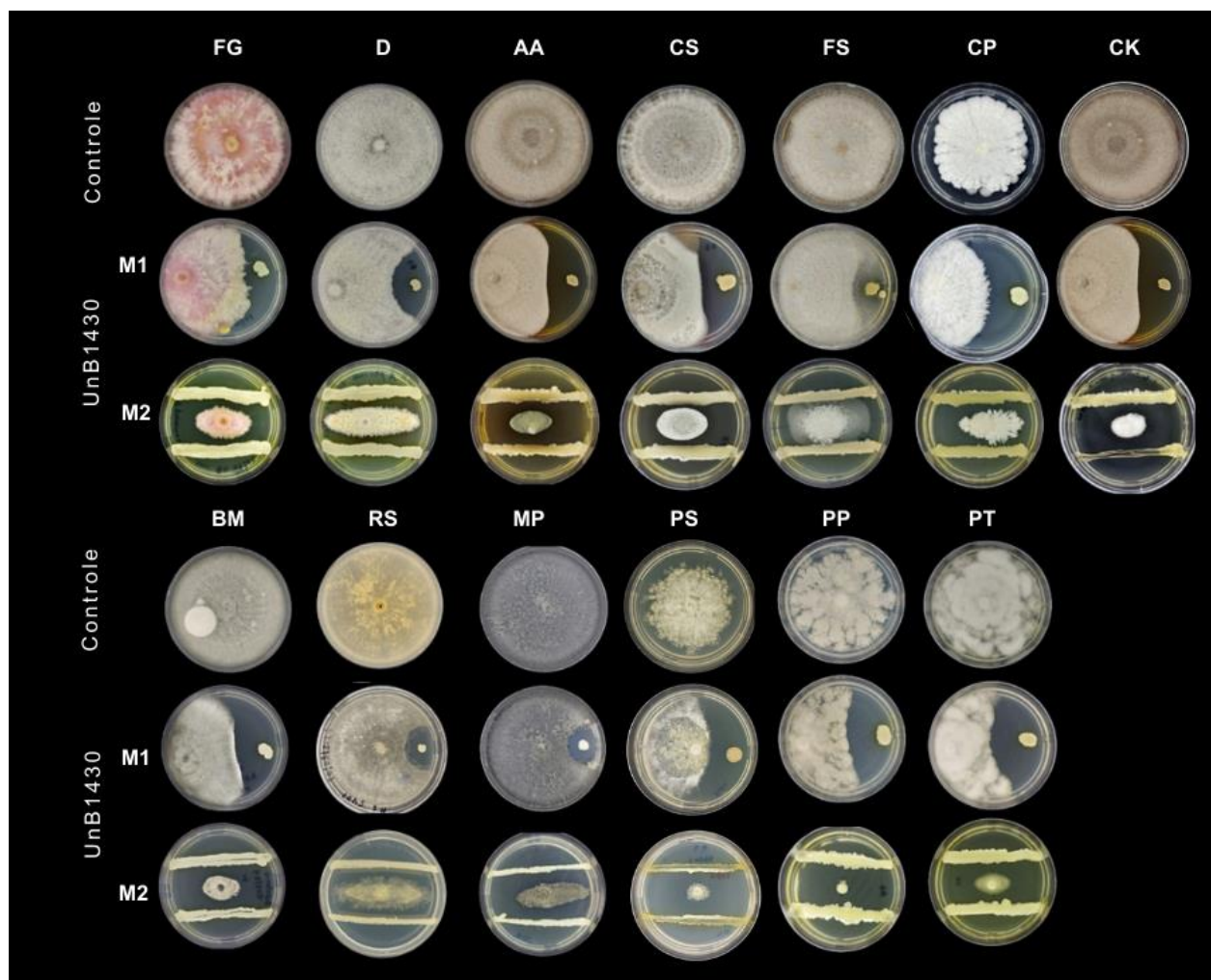


Figura 6. Ensaios de cultura dupla para inibição do crescimento fúngico pelo efeito antagônico de *Burkholderia contaminans* UnB1430 a 25 °C, utilizando duas metodologias. As medições foram realizadas aos 8 dias após a inoculação (dpi) para *Diaporthe* sp. (D), *Bipolaris maydis*. (BM), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Macrophomina phaseolina* (MP); aos 10 dpi para *Fusarium graminearum* (FG) e *Alternaria alternata* (AA), e aos 15 dpi para *Colletotrichum karsti* (CK), *C. pluvivorum* (CP), *Corynespora cassiicola* (CS), *F. solani* (FS), *Phytophthora. palmivora* (PP), *P. theobromae* (PT) e *P. sojae* (PS).

Tabela 11. Avaliação da atividade antifúngica de *Burkholderia contaminans* UnB1430 contra fungos fitopatogênicos por dois diferentes métodos

Método	Espécie	Isolado	Média ± EP	Comp. Méd
M2	<i>Fusarium solani</i>	FS	54.3 ± 1.38	A
M2	<i>Colletotrichum pluvivorum</i>	CP	61.3 ± 1.38	B
M2	<i>Corynespora cassicola</i>	CC	65.8 ± 1.38	BC

M2	<i>Fusarium graminearum</i>	FG	68.8 ± 1.38	CD
M2	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MP	71.7 ± 1.38	CDE
M2	<i>Diaporthe</i> sp.	D	72.9 ± 1.38	DE
M2	<i>Alternaria alternata</i>	AA	74.6 ± 1.38	DEF
M2	<i>Phytophthora theobromicola</i>	PT	75.0 ± 1.38	DEF
M2	<i>Colletotrichum karsti</i>	CK	77.1 ± 1.38	EF
M2	<i>Bipolaris maydis</i>	B	80.0 ± 1.38	FG
M2	<i>Phytophthora palmivora</i>	PP	80.6 ± 1.38	FG
M2	<i>Rhizoctonia solani</i>	RS	80.8 ± 1.38	FG
M2	<i>Phytophthora sojae</i>	PS	84.8 ± 1.38	G
M1	<i>Fusarium solani</i>	FS	16.2 ± 1.38	A
M1	<i>Phytophthora sojae</i>	PS	26.2 ± 1.38	B
M1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MP	27.1 ± 1.38	BC
M1	<i>Rhizoctonia solani</i>	RS	32.5 ± 1.38	BCD
M1	<i>Diaporthe</i> sp.	D	33.3 ± 1.38	CD
M1	<i>Fusarium graminearum</i>	FG	35.0 ± 1.38	DE
M1	<i>Phytophthora palmivora</i>	PP	36.3 ± 1.38	DE
M1	<i>Alternaria alternata</i>	AA	37.1 ± 1.38	DE
M1	<i>Corynespora cassicola</i>	CC	37.5 ± 1.38	DE
M1	<i>Colletotrichum pluvivorum</i>	CP	37.8 ± 1.38	DE
M1	<i>Bipolaris maydis</i>	B	38.8 ± 1.38	DE
M1	<i>Colletotrichum karsti</i>	CK	40.4 ± 1.38	EF
M1	<i>Phytophthora theobromicola</i>	PT	46.7 ± 1.38	F

M2: metodologia 2, duas linhas paralelas estriadas da cepa UnB1430 a 2 cm de cada lado do centro da placa, com um disco do fungo depositado na metade entre as duas linhas.

M1: metodologia 1, 10 ul de suspensão de células de UnB1430 inoculados a 1 cm da borda da placa, enquanto um disco da cultura fúngica foi colocada no centro da placa.

Média ± EP: Média da porcentagem de inibição do crescimento micelial (diâmetro cm), calculada com base na redução do diâmetro das culturas tratadas em comparação com os controles, acompanhada do erro padrão obtido a partir de 3 repetições em dois ensaios.

Comp. Méd: comparação de médias com base no teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras iguais indicam que os valores não diferem estatisticamente entre si.

A ANOVA p ($p\text{-value} < 2,2 \times 10^{16}$) indicou um efeito significativo de UnB1430 sobre a inibição do crescimento micelial

3.10.2 Antagonismo a bactérias fitopatogênicas

A atividade de antibiose da cepa UnB1430 foi avaliada contra três gêneros de fitobactérias, incluindo duas patovares do gênero *Xanthomonas*, por meio da metodologia de dupla camada. Os resultados revelaram diferenças significativas no potencial de inibição de crescimento entre os isolados testados. O isolado de *Pseudomonas syringae* apresentou a menor média de antibiose ($1,00 \pm 0,15$), destacando-se como o menos suscetível. Por outro lado, os isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, juntamente com os de *Ralstonia solanacearum*, demonstraram ser os mais sensíveis à antibiose de UnB1430, apresentando médias de inibição superiores em relação aos demais isolados. Já os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* exibiram níveis intermediários de inibição. As taxas de antibiose estão apresentadas na Tabela 12 e na Figura 7.

Tabela 12. Avaliação da atividade de antibiose de *Burkholderia contaminans* UnB1430 contra bactérias fitopatogênicas

Espécie	Isolado	Média $\pm$ EP	Comp. Méd
<i>Pseudomonas syringae</i>	AM4-F-2021-55	1.00 ± 0.15	A
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	EH 2017-12	2.67 ± 0.15	B
<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	EH 2017-27	3.27 ± 0.15	BC
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 507	3.57 ± 0.15	CD
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 702	3.90 ± 0.15	CDE
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 672	3.97 ± 0.15	CDE
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	EMBRAPA	4.03 ± 0.15	DE
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH-RS 607	4.07 ± 0.15	DE
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	UnB315	4.20 ± 0.15	DE
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	UnB17	4.47 ± 0.15	E

Média $\pm$ EP: Média do halo de inibição do crescimento bacteriano, calculada com base na redução do diâmetro das culturas em cm, acompanhada do erro padrão obtido a partir de 3 repetições em dois ensaios.

Comp. Méd: comparação de médias com base no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A ANOVA p (p -value $1,81 \times 10^{-11}$) indicou um efeito significativo de UnB1430 sobre a inibição do crescimento bacteriano.

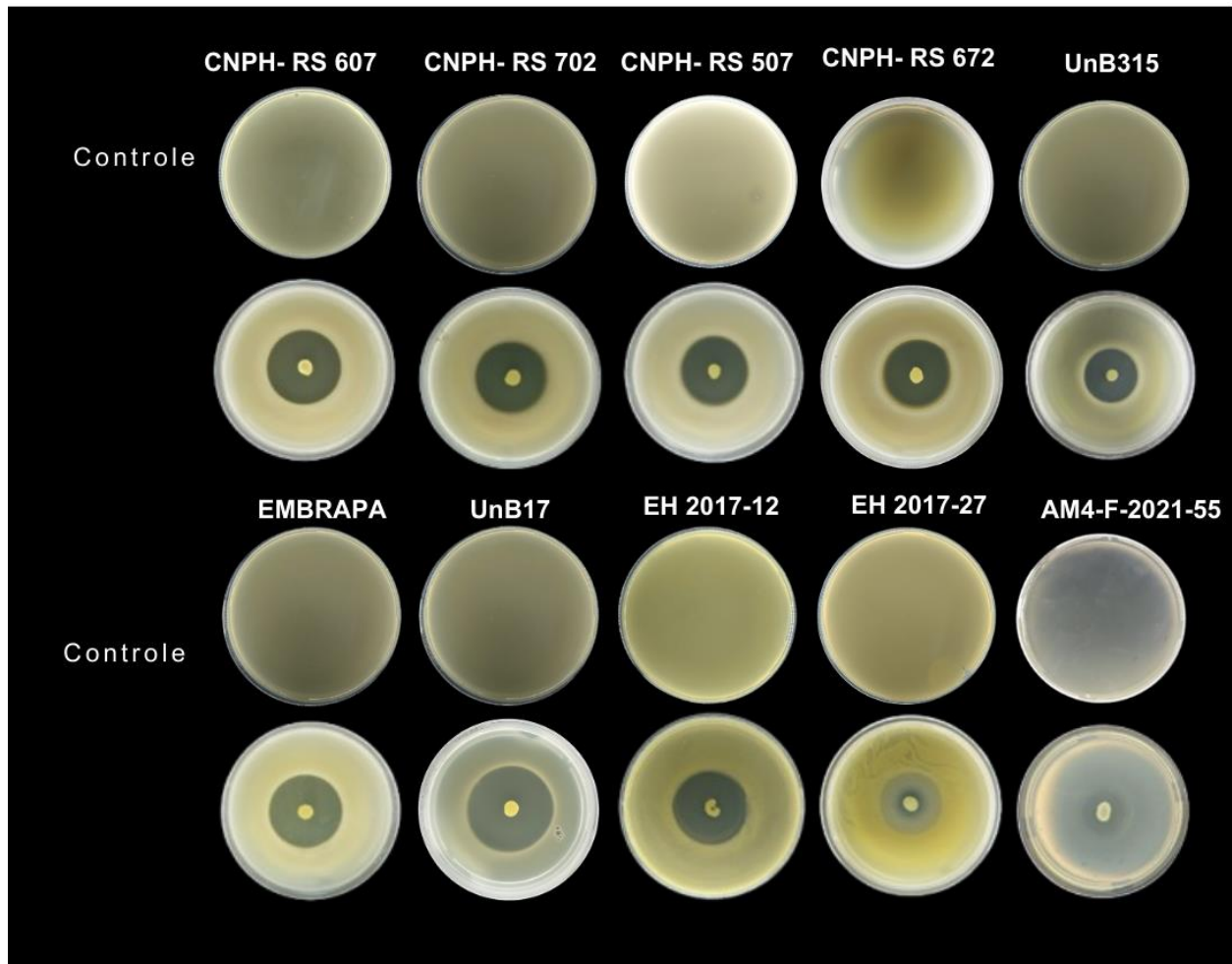


Figura 7. Ensaios de dupla camada para testar a antibiose de *Burkholderia contaminans* UnB1430 contra três gêneros de fitobactérias: *Ralstonia solanacearum* (CNPH-RS 607; CNPH-RS 507; CNPH-RS 702 e CNPH-RS 672); *Xanthomonas. phaseoli* pv. *manihotis* (EMBRAPA; UnB315; UnB17); *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (EH 2017-12 e EH 2017-27); *Pseudomonas syringae* (AM4-F-2021-55).

3.10.3 Sideróforos e compostos voláteis

O isolado UnB1430 demonstrou a capacidade de produzir sideróforos e compostos voláteis (Figura 8). No ensaio de produção de sideróforos, foi evidenciada pela mudança de cor para amarelo-laranja, observada no tratamento (Bco sem ferro). Entretanto, também houve mudança de cor no tratamento (Bco com ferro), o que não era esperado, uma vez que a presença de ferro

geralmente reprime a produção de sideróforos. Esse resultado pode estar relacionado à baixa concentração de Fe^{3+} (2 μM) utilizada. O controle negativo (CN) não apresentou contaminação, pois sua coloração permaneceu inalterada. A ação de compostos voláteis produzidos por UnB1430 foi avaliada quanto à capacidade de inibição do crescimento dos fungos PS, RS e MP. Os resultados (Tabela 13) confirmaram que UnB1430 é capaz de produzir compostos voláteis e usar este mecanismo como biocontrole, já que inibiu o crescimento dos fungos testados, com exceção de MP, cujo crescimento foi acompanhado apenas por mudanças na coloração micelial. O teste T não revelou diferenças significativas entre os tratamentos e o controle ($P > 0,05$). O teste de Tukey mostrou que MP apresentou a menor resposta ao efeito dos compostos voláteis ($8,00 \pm 0,314$), indicando a ausência de inibição significativa. Em contrapartida, PS ($3,83 \pm 0,152$) e RS ($4,48 \pm 0,177$) demonstraram maior inibição por compostos voláteis, mas não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 13. Inibição do crescimento de três fungos fitopatogênicos da soja por efeito da produção de compostos voláteis da bactéria *Burkholderia contaminans* UnB1430

Fungo	Média $\pm$ EP	Comp. Méd
<i>Phytophthora sojae</i> (PS)	3.83 ± 0.152	A
<i>Rhizoctonia sojae</i> (RS)	4.48 ± 0.177	A
<i>Macrophomina phaseolina</i> (MP)	8.00 ± 0.314	B

Média $\pm$ EP: Média do halo de inibição do crescimento fúngico, calculada com base na redução do diâmetro das culturas em cm, acompanhada do erro padrão obtido a partir de 3 repetições em dois ensaios.

Comp. Méd: comparação de médias com base no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A ANOVA p ($p\text{-value } 2,71 \times 10^{-5}$) indicou um efeito significativo da produção de compostos voláteis de UnB1430 sobre a inibição do crescimento bacteriano.

Valores médios do controle: *Phytophthora sojae* (PS) = 8 cm, *Rhizoctonia sojae* (RS) = 8 cm e *Macrophomina phaseolina* (MP) = 5,5 cm.

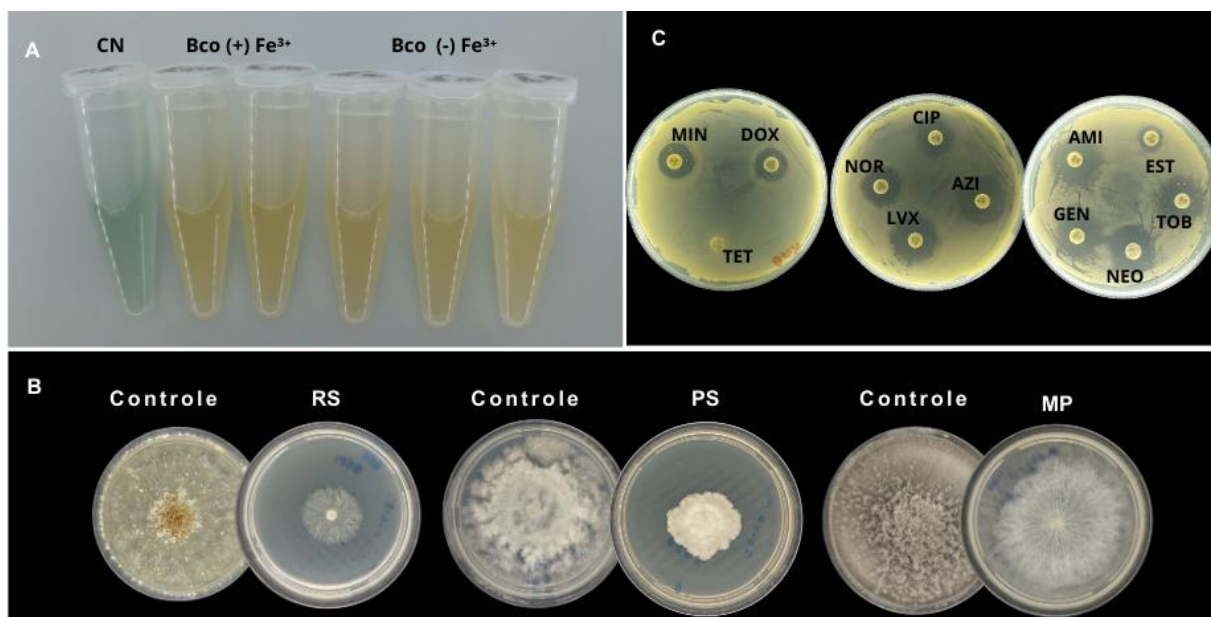


Figura 8. Produção de sideróforos e compostos voláteis por *Burkholderia contaminans* UnB 1430. A. Mudança de cor para amarelo-laranja, indicando a produção de sideróforos pelo isolado UnB1430. CN- controle negativo; Bco com suplementação de ferro; Bco sem ferro. B. inibição do crescimento de *Macrophomina phaseolina* (MP), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Phytophthora sojae* (PS), no ensaio de compostos voláteis, evidenciando diferenças no crescimento dos fungos em comparação ao controle. C. Halo de sensibilidade em resposta ao antibiótico testado, do grupo de tetraciclínas (Minociclina-MIN, Doxíciclina-DOX e Tetraciclina-TET), fluoroquinolonas (Ciprofloxacina-CIP, Levofloxacina-LVX e Norfloxacina-NOR), macrolídeos (Azitromicina-AZI) e aminoglicosídeos (Aminocacina-AMI, Gentamicina-GEN, Estreptomicina-EST, Tobramicina-TOB, e Neomicina-NEO)

3.10.4 Resistência a antibióticos

No teste de resistência a antibióticos em ágar, UnB1430 apresentou sensibilidade à maioria dos antibióticos testados, com exceção de resistência a tetraciclina (30 µg), pertencente ao grupo das tetraciclínas. Esse foi o único caso de resistência observado fenotipicamente (Tabela 14).

Tabela 14. Sensibilidade e resistência da bactéria UnB1430 a diferentes classes de antibióticos

Grupo	Nome do antibiótico	Halo (cm)	Resultado
Aminoglicosídeos	Aminocacina	1,8	S
	Gentamicina	2,1	S
	Estreptomicina	1,25	S
	Tobramicina	2,2	S

Tetraciclinas	Neomicina	1,7	S
	Minociclina	1,9	S
	Doxiciclina	1,75	S
	Tetraciclina	0	R
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	1,8	S
	Levofloxacina	1,85	S
	Norfloxacina	1,75	S
Macrolídeos	Azitromicina	1,8	S

S:sensibilidade

R: resistência

Halo de sensibilidade

3.11 Experimentos em casa de vegetação

3.11.1 Microbiolização das sementes e colonização radicular de UnB1430

A microbiolização das sementes foi confirmada, pois, ao comparar as placas do controle, observou-se crescimento bacteriano sobre as sementes. Além disso, verificou-se a capacidade de colonização radicular pelo isolado UnB1430 (ANEXO, Figura 3 A e B).

3.11.2 Potencial de biocontrole de *Burkholderia contaminans* UnB1430 contra *Rhizoctonia solani*

Neste ensaio, investigou-se o potencial de UnB1430 para controle da podridão-radicular causada por *R. solani* em condições de casa de vegetação, inoculado em condições de pré e pós-emergência. Observou-se a redução da severidade da doença em ambas as condições, embora não sempre significativamente diferente em relação ao tratamento apenas com *R. solani* (RS) (Figura 9).

Nos ensaios de pré-emergência (Figura 9 A), observou-se que o tratamento Rs (controle negativo) apresentou índices de severidade (ID) próximos a 100%, indicando sintomas severos. Esse valor foi significativamente superior aos controles Bco (plantas inoculadas apenas com Bco) e controle absoluto (plantas não inoculadas), ambos com ID 0%, como esperado. Em contraste, o tratamento Bco + Rs, que incluiu a aplicação de Bco UnB1430, resultou em uma redução considerável da severidade da doença nas plântulas de soja, com ID também próximo a 0%. No

entanto, estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos Rs, Bco e Bco + Rs, possivelmente devido à variabilidade nos dados. Na repetição do experimento (Figura 8B), o tratamento Bco + Rs apresentou severidade intermediária, com ID significativamente menor em comparação ao tratamento Rs, mesmo este apresentando uma severidade maior. Esses resultados podem ser atribuídos à influência das condições ambientais durante o experimento, como temperaturas mais baixas e maior umidade relativa, que intensificaram a severidade da doença. Mesmo sob essas variações, o tratamento contendo Bco UnB1430 manteve uma redução consistente na severidade da doença em relação ao tratamento Rs.

Nos ensaios de pós-emergência (Figura 9 C), o tratamento Rs continuou a apresentar os maiores índices de severidade, com valores variando entre 75% e 100%. Esses resultados indicam a presença de sintomas severos, como lesões afundadas no hipocótilo, constrição do caule basal e até apodrecimento de 50% a 80% das raízes. Nesta fase também foi observada uma redução nos sintomas com o tratamento Bco + Rs, cujos resultados estatísticos foram semelhantes aos observados de pré-emergência em ambos os experimentos, variando a significância do índice da doença no segundo experimento (Figura 9 D).

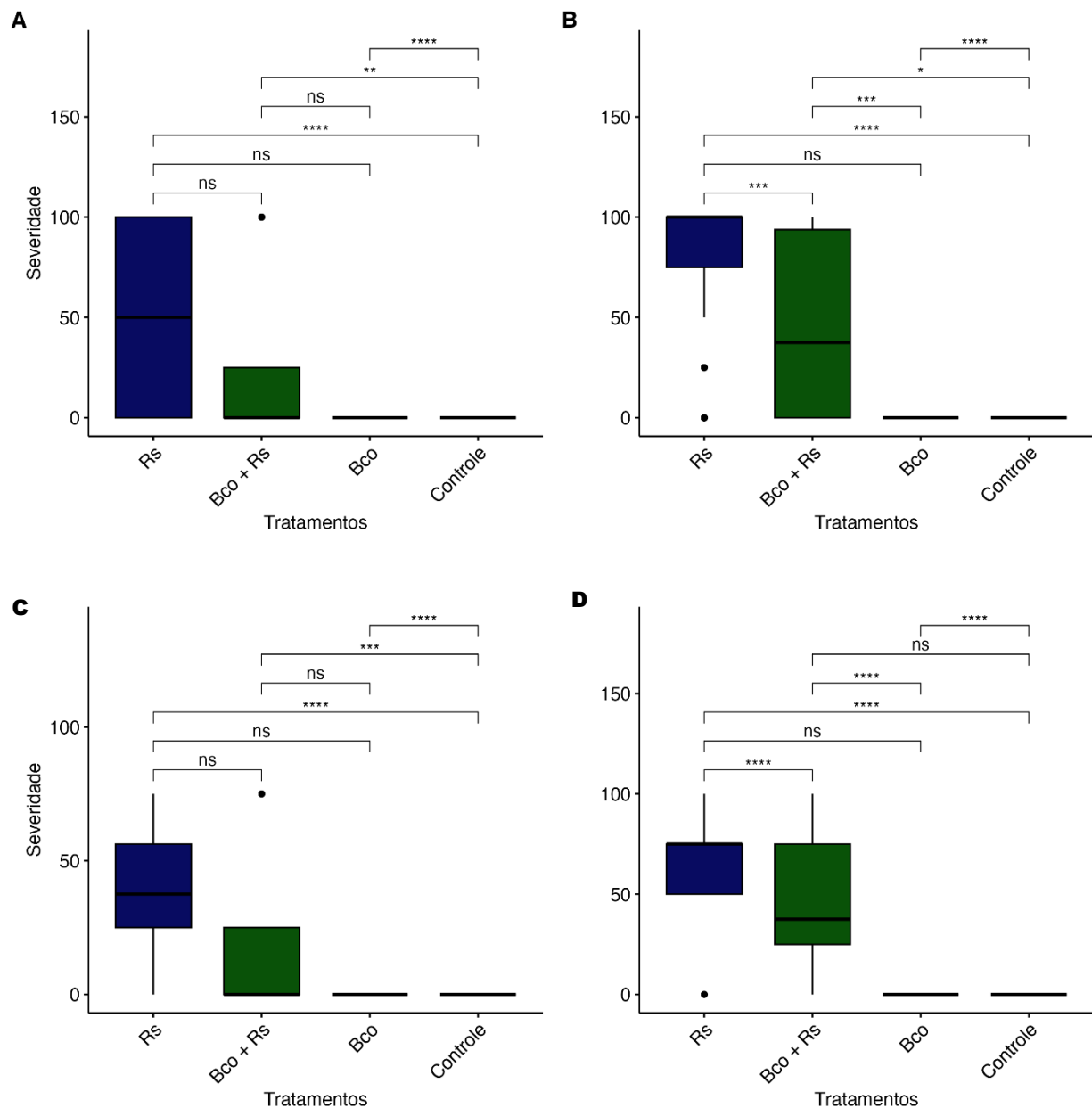


Figura 9. Potencial de *Burkholderia contaminans* UnB1430 para o biocontrole da podridão-radicular da soja causada por *Rhizoctonia solani* em condições de casa de vegetação. (A) e (B): Avaliação em pré-emergência. (C) e (D): Avaliação em pós-emergência. Severidade= % Índice de severidade. Tratamentos Rs (apenas *R. solani*), Bco + Rs (plântulas tratadas com UnB1430 e *R. solani*), Bco (apenas UnB430) e o controle absoluto (plantas não inoculadas) (A) e (C): gráfico referente ao primeiro ensaio. (B) e (D): Gráfico referente à repetição do ensaio em um período posterior no tempo. ns= não significativo, * = significativo, ****= altamente significativo.

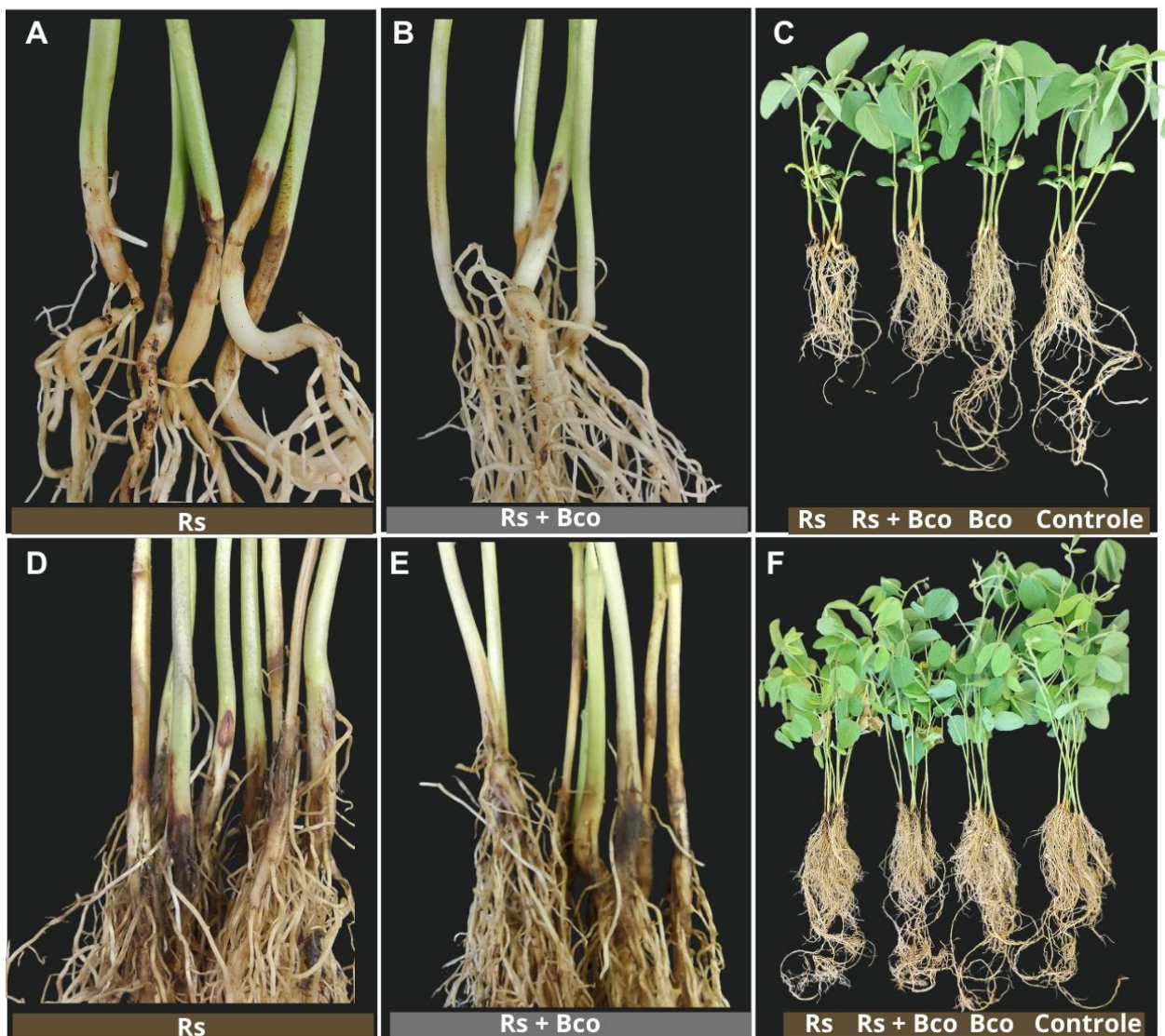


Figura 9. Efeitos da inoculação de *Burkholderia contaminans* UnB1430 (Bco) no controle da podridão-radicular da soja causada por *Rhizoctonia solani* (Rs). (A), (B) e (C): sintomas após inoculação na pré-emergência. (D), (E) e (F): Sintomas na pós-emergência. (A) e (D): plântulas tratadas apenas com *R. solani*, mostrando sintomas severos de lesões profundas e alta severidade de podridão radicular. (B) e (E) plântulas tratadas com *R. solani* e Bco UnB1430, mostrando sintomas reduzidos de lesões e maior integridade das raízes. (C) e (F). Comparação visual entre os tratamentos.

3.11.3 Potencial de *Burkholderia contaminans* UnB1430 na promoção de crescimento de plântulas de soja

As variáveis avaliadas nas plântulas, como altura da planta, comprimento da raiz, peso fresco e peso seco (considerando o total da plântula e apenas a raiz), apresentaram variações nos tratamentos com UnB1430 entre as avaliações realizadas aos 25 e 45 dias após a emergência. Na avaliação realizada aos 25 dias, o tratamento nas sementes com UnB1430 (semBco 10^8) apresentou médias significativamente superior para altura, comprimento da raiz e peso fresco em relação ao controle, enquanto os demais tratamentos não diferiram significativamente (Figuras 10A, C e E). Já na avaliação aos 45 dias, essas não foram mantidas, indicando um efeito temporário para esses parâmetros (Figura 10B, D e F). No entanto, o peso fresco das raízes (Figura 11, A e B) mostrou resultados consistentes em ambas as avaliações. O tratamento SemBco- 10^8 ufc/mL promoveu um aumento significativo no peso das raízes em relação aos demais tratamentos, mantendo o mesmo padrão de eficiência aos 45 dias. No entanto, os tratamentos SusBco- 10^8 e SemBco- 10^5 , mostraram desempenhos mais próximos ao tratamento SemBco- 10^8 nesta avaliação final (45 dias). Os resultados do peso seco das raízes (Figuras 11, E e F) corroboraram os dados do peso fresco. Aos 25 dias, os tratamentos SemBco- 10^8 e SusBco- 10^8 diferiram significativamente do controle, enquanto os demais tratamentos não apresentaram diferenças. Aos 45 dias, o efeito positivo da inoculação de UnB1430 numa concentração 10^8 ufc/mL tornou-se ainda mais evidente, apresentando resultado significativamente superior aos demais. O peso seco total das plântulas (Figuras 11, C e D) também revelou o impacto positivo do tratamento SemBco- 10^8 . Em ambas as avaliações, as plântulas tratadas com essa concentração diferiram significativamente do controle, enquanto os demais tratamentos não mostraram diferenças estatísticas. Esses resultados demonstram que a inoculação com a cepa UnB1430, na concentração de 10^8 UFC/ml, promoveu um aumento significativo no peso total da planta, evidenciando seu potencial como agente promotor de crescimento (Figuras 12, A e B).

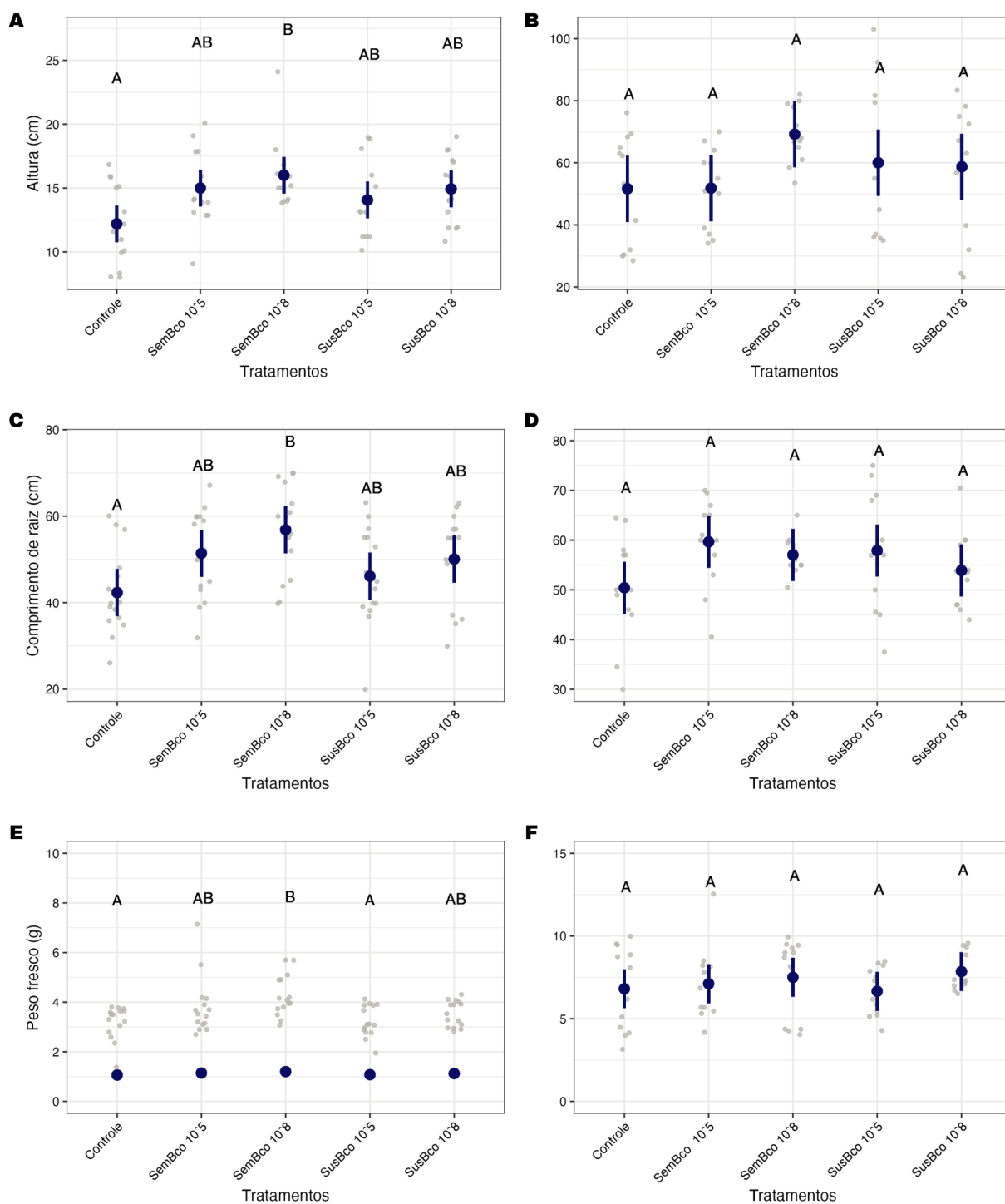


Figura 10. Avaliação da promoção de crescimento por *Burkholderia contaminans* UnB1430 em plântulas de soja, considerando os seguintes parâmetros: (A) e (B) altura da planta; (C) e (D) comprimento da raiz; (E) e (F): peso fresco total da plântula. As avaliações foram realizadas aos 25 dias após a emergência (A, C e E) e aos 45 dias após a emergência (B, D e F). Valores médios

com a mesma letra em cada avaliação não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$), conforme o teste Tukey.

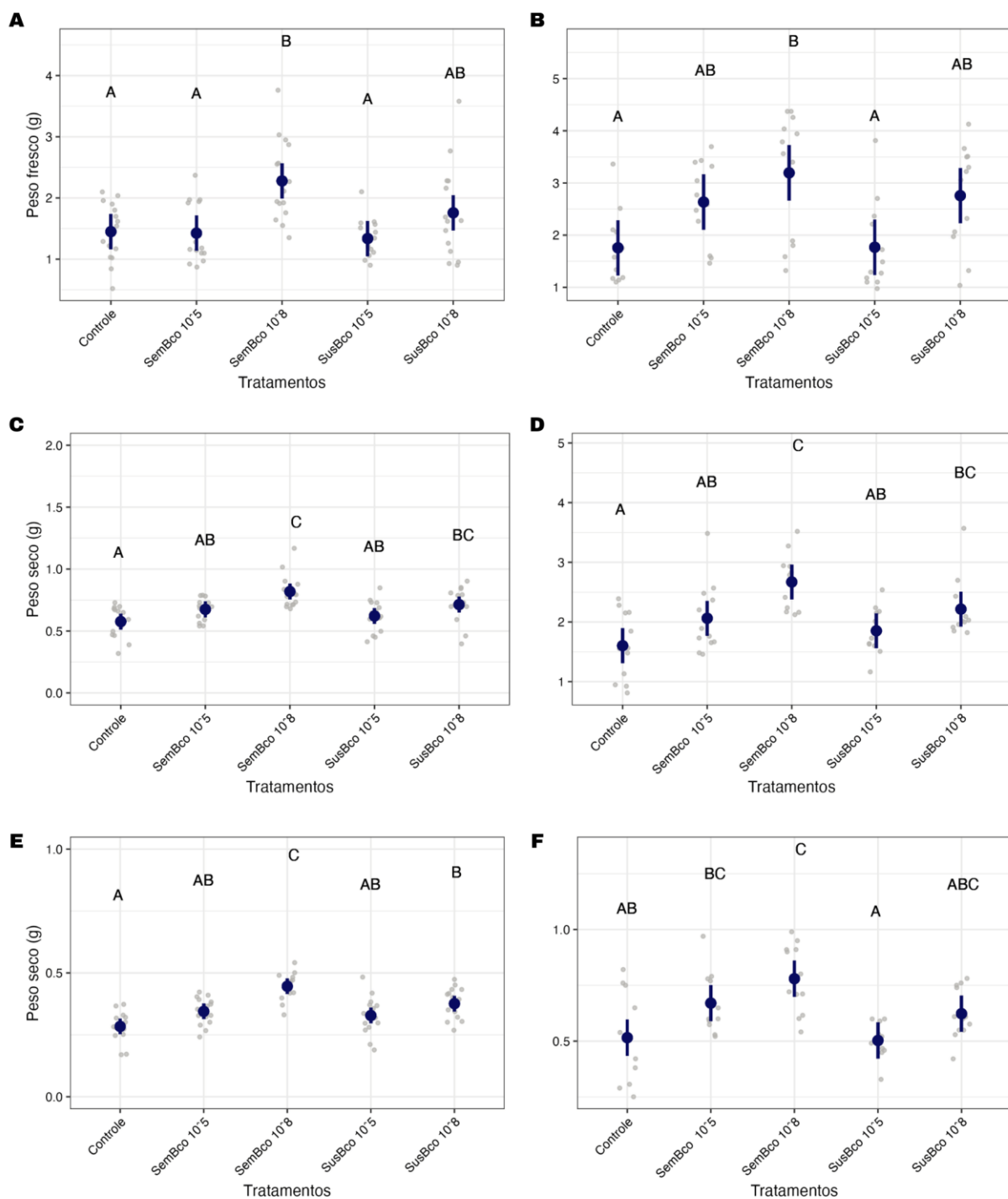


Figura 11. Efeito de *Burkholderia contaminans* UnB1430 na promoção de crescimento em

plântulas de soja, considerando os parâmetros: (A) e (B) peso fresco da raiz. (C) e (D) peso seco total da plântula, (E) e (F) peso seco da raiz. As avaliações foram realizadas aos 25 dias após a emergência (A, C e E) e aos 45 dias após a emergência (B, D e F). Valores médios com a mesma letra em cada avaliação não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$), conforme o teste Tukey.



B

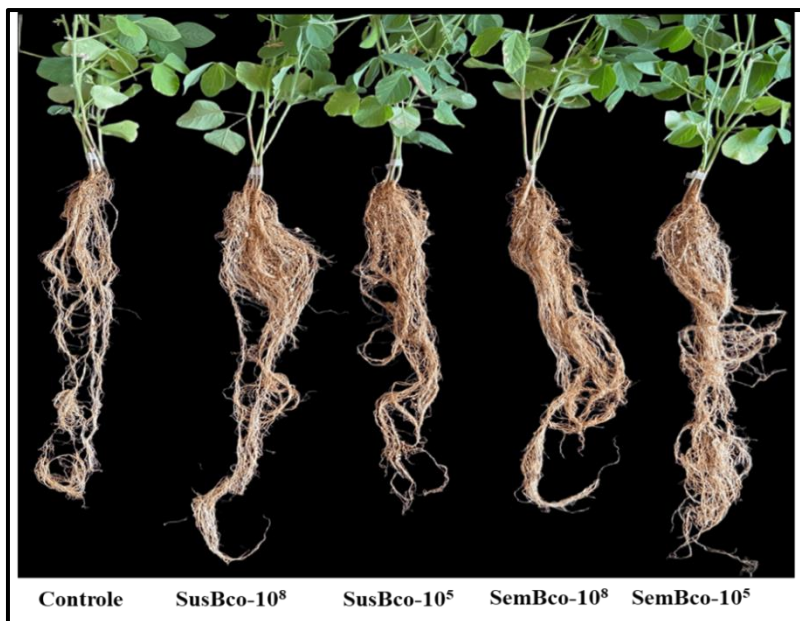


Figura 12. Efeito de *Burkholderia contaminans* UnB1430 na promoção de crescimento em plântulas de soja via inoculação nas sementes ou em suspensão nas plântulas, em duas concentrações da bactéria. A: avaliação aos 25 dias. B: avaliação aos 45 dias após emergência.

4 DISCUSSÃO

Várias espécies do gênero *Burkholderia* têm sido reconhecidas por seu potencial em processos agrícolas, ambientais, industriais e farmacêuticos. No contexto agrícola, essas espécies estabelecem interações benéficas com as plantas, promovendo maior tolerância a fitopatógenos, resistência a estresses ambientais (como seca e salinidade), redução do estresse oxidativo e estímulo ao crescimento vegetal. Essas bactérias também melhoram a eficiência da fotossíntese e facilitam a absorção de nutrientes (Pal et al. 2022).

Neste estudo, foi identificada uma bactéria Gram-negativa a partir de folhas de gerânio apresentando lesões necróticas. Após várias tentativas de inoculação em plântulas de gerânio, a bactéria foi reisolada das folhas assim como dois fungos. O isolado bacteriano original, UnB1430, foi identificado como *Burkholderia contaminans*, enquanto os fungos foram identificados como *Bipolaris maydis* e *Colletotrichum kastri*. Os testes realizados demonstraram que UnB1430 apresentou antagonismo contra os dois fungos isolados do gerânio *in vitro*, mas se a bactéria exerce esse antagonismo na planta ainda precisa ser investigado. A incapacidade de reprodução dos sintomas somente com a inoculação de UnB 1430 sugere que a bactéria tem um papel secundário como endofítica. Esse papel foi reforçando pela incapacidade da bactéria de reproduzir os sintomas necróticos característicos observados no isolado original, mesmo após três tentativas de inoculação em folhas de gerânio. Embora a bactéria tenha apresentado reação de hipersensibilidade (HR) no teste de infiltração. Sua interação com o gerânio não resultou em sintomas típicos de patogenicidade. Assim é provável que a bactéria atue de forma não patogênica no contexto avaliado, desempenhando um papel potencial benéfico como antagonista de fungos fitopatogênicos. Reações típicas de HR já foram relatadas em outras espécies de *Burkholderia* spp. com potencial em biocontrole e PGPB. Pois, *B. seminalis* R456 demonstrou HR e foi incapaz de causar sintomas de doença em mudas de arroz (Li et al. 2011). A análise e anotação do genoma de UnB1430 revelou ser constituído por três cromossomos, totalizando 8,4 Mb, e apresentando genes característicos relacionados ao biocontrole e PGPB.

Diversos microrganismos têm sido amplamente utilizados como agentes de biocontrole, demonstrando eficácia na supressão de fungos e bactérias causadores de doenças agrícolas (Bonaterra et al. 2022). Seguindo essa linha, a cepa UnB1430 foi avaliada sob condições de casa de vegetação, mostrando potencial como agente de biocontrole e promotor de crescimento em plântulas de soja. A inoculação das sementes com a bactéria (concentração de 10^8 ufc/mL) aumentou significativamente o peso fresco das plântulas e reduziu a severidade da podridão-radicular causada por *Rhizoctonia solani* durante a fase de pré e pós-emergência. Os sintomas de severidade foram determinados com base na escala de notas e variaram conforme a fase da emergência. Nos estágios iniciais (pré-emergência), os sintomas incluíram necrose radicular e morte das plantas antes da emergência. Em pós-emergência, a doença se manifestou por lesões necróticas no caule próximo ao solo, resultando em tombamento das plantas. Esse fitopatógeno, conhecido por sua diversidade morfológica, gama de hospedeiros e agressividade (Ajayi-oyetunde e Bradley 2018), representa um desafio no manejo fitossanitário de culturas agrícolas importantes.

Os resultados obtidos corroboram estudos prévios que destacaram o potencial do gênero *Burkholderia* como agente biocontrolador de *R. solani* em culturas como algodão, tomate, milho e arroz. *B. contaminans* KNU17BI1, *B. cepacia* CF-66 e BC11, *B. vietnamiensis* C12 e *B. seminalis* R456 já demonstraram eficácia no controle desse patógeno (Kang et al. 1998; Quan et al. 2006; Cuong et al. 2011; Li et al. 2011; Tagele et al. 2018; Zhang et al. 2020; Meng et al. 2023). Entretanto, este é o primeiro estudo a investigar o potencial de *B. contaminans* como agente de biocontrole de *R. solani* na cultura da soja, ampliando as opções de manejo dessa doença.

Além disso, o efeito combinado de *Burkholderia* com outras bactérias, como *Bacillus subtilis*, já foi descrito como uma estratégia para potencializar a supressão de doenças. Szczech et al. (2004) demonstraram que a aplicação sequencial de *B. cepacia* BY e *Bacillus subtilis* RB14-C reduziu significativamente a doença em tomate, sugerindo que a associação da Bco UnB1430 com outros agentes biocontroladores poderia ser uma abordagem interessante para estudos futuros.

Os resultados obtidos na análise do genoma também reforçam as características de UnB1430 como promotora de crescimento, atributo marcante do gênero *Burkholderia*. Esse potencial inclui ações diretas como solubilização de nutrientes (K e P), assimilação de enxofre, , fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios (citocininas, auxinas, giberelinas, xantina e ácido gama-aminobutírico-GABA) e síntese de sideróforos, além de ações indiretas, como a redução de estresses oxidativos e abióticos. Estudos que avaliaram o potencial PGPB deste gênero na cultura

da soja demonstraram um aumento no peso fresco das plantas, mesmo na presença de cádmio. Nesses estudos as cepas *Burkholderia* sp. D54 e *B. contaminans* ZCC, mostraram atividades semelhantes (Guo et al. 2020; You et al. 2021) e a produção de hormônios regulam processos-chave no crescimento vegetal e no desenvolvimento radicular, além de modular respostas ao estresse abiótico, como salinidade e seca (El Sabagh et al. 2022). Estudos com outras cepas de *Burkholderia* também demonstraram a presença de genes associados à síntese de fitormônios e solubilização de nutrientes, reforçando o papel dessa espécie como promotora de crescimento (Heo et al. 2022; Tagele et al. 2018; You et al. 2021).

No contexto do antagonismo a fitopatógenos, UnB1430 demonstrou significativa inibição *in vitro* do crescimento micelial e alterações visíveis na coloração de diversos fungos testados, com resultados variáveis entre as espécies. Por exemplo, *Fusarium solani* apresentou menor inibição, um comportamento distinto de estudos envolvendo *B. arboris* DHR18, que demonstraram maior eficiência contra essa espécie (Yang et al. 2024). Essa variação ressalta a complexidade das interações microbianas e a importância de caracterizar as atividades de cepas específicas em diferentes contextos. Além disso, Bco UnB1430 exerceu atividade antibiótica contra três gêneros de fitobactérias, reforçando seu amplo espectro de ação.

O desempenho de UnB143 variou significativamente de acordo como método de inoculação utilizado, uma vez que foram obtidos resultados distintos dependendo da metodologia aplicada. Isso evidencia a importância de selecionar o método mais adequado para cada contexto experimental *in vitro*. Além disso, mudanças visíveis na coloração micelial foram observadas nos fungos confrontados com a cepa UnB1430, sugerindo indução de alterações no desenvolvimento desses fungos. Esses resultados indicam que a inibição do crescimento não ocorre apenas por competição por espaço e nutrientes, mas também pode estar relacionada à produção de metabólitos secundários.

Diversas cepas de *B. contaminans* e outras espécies do gênero *Burkholderia* foram previamente avaliadas e relatadas como potenciais agentes de biocontrole (Depoorte et al. 2021; Barrera-Galicia et al. 2021; Heo et al. 2022; Othman 2023; Kong et al. 2023; Meng et al. 2024; Jia e Lu 2024). Por exemplo, a cepa *B.* demonstrou atividade inibitória contra *Botrytis cinerea* e *Phoma medicaginis*, devido à produção da enzima beta-N-acetil-hexosaminidase essencial na degradação da parede celular de fungos (Ben Slimene Debez et al. 2024). De forma semelhante, *B. contaminans* KNU17BI1 inibiu fitopatógenos como *Stemphylium botryosum* e *R. solani*, além de reduzir a

severidade da infecção por *R. solani* em milho (Deng et al. 2017).

Adicionalmente, *Burkholderia contaminans* S614 *contaminans* MS14 destacou-se por sua atividade bactericida, mediada pela produção do sideróforo ornibactina, que inibe o crescimento de bactérias fitopatogênicas como *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia glumae*, *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* e *Clavibacter michiganensis*, além de diversos fungos (Tagele et al. 2018).

A espécie *B. contaminans* é amplamente reconhecida por sua capacidade de produzir diversos metabólitos secundários com propriedades antifúngicas e bactericidas, como a occidiofungina e sideróforos. Esses compostos apresentam uma ampla gama de atividades contra patógenos de plantas e animais, robustecendo o potencial biotecnológico da espécie (Hansanant et al. 2024). A análise genômica da cepa UnB1430 revelou clusters biossintéticos associados à produção de metabólitos secundários com atividades antimicrobianas, incluindo pirrolnitrina, N-aciloxiiacil glutamina, sideróforos (Piochelina e ornibactina C4/C6/C8), além de occidiofungina. Esses metabólitos desempenham um papel central na inibição de fitopatógenos, e podem contribuir para a PCV. A occidiofungina um glicolipopeptídeo não sintetizado ribossomicamente, apresenta um mecanismo de ação único, alterando a integridade da parede celular ou induzindo apoptose em células fúngicas (Ma et al. 2020; Gu et al. 2011; Hansanant et al. 2024). Estudos prévios destacam sua potente atividade antifúngica contra diversos patógenos (Doty et al. 2022; Jia et al. 2022).

Os sideróforos pioquelina e ornibactina também são reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas. A pioquelina, identificada originalmente em *Pseudomonas aeruginosa* (Reimann et al. 2016) e ornibactina em *B. cepacia*, possuem propriedades bactericidas que têm sido amplamente estudadas (Sokol et al. 2000; Deng et al. 2017). A similaridade biológica entre as cepas *B. contaminans* UnB1430 e a cepa MS14, previamente caracterizada por seu potencial biocontrolador, sugere que ambas compartilham mecanismos genéticos responsáveis pela síntese de metabólitos bioativos e atividades antimicrobianas (Deng et al. 2016).

A análise do genoma da cepa UnB1430 revelou informações importantes sobre sua estrutura genética, destacando fatores relacionados à virulência, motilidade, resistência antimicrobianos e adaptação ambiental. Esses resultados contribuem para a compreensão de seu potencial biotecnológico e perfil não patogênico.

Dentre os fatores de virulência, foram identificados apenas três genes relacionados à inibição da fagocitose (*wcbR*, *wcbS* e *wcbT*) que codificam componentes da capsula do tipo I.

Entretanto, a ausência de um conjunto completo de genes para sistemas de secreção, como T3SS e T6SS, diferencia a UnB1430 de outras cepas de *B. contaminans*, como no estudo de Kim et al. (2023) que identificou esses sistemas em outras cepas da mesma espécie. Esses sistemas, frequentemente associados à patogenicidade, desempenham papéis cruciais na entrega de efetores que ajudam na evasão imunológica e interações com o hospedeiro (Kendall 2017; Vander Broek e Stevens 2017; Yang et al. 2018). Assim, a ausência desses sistemas reforça o perfil não patogênico da cepa UnB1430.

Em relação à adesão, foi identificado apenas o gene *pilD*, relacionado à formação de pili tipo IV (T4P). Entretanto, a ausência de outros genes essenciais para a formação completa do T4P, como *pilA*, *pilB* e *PilD*, sugere que a capacidade de adesão e colonização é limitada. Estudos anteriores destacam a relevância do T4P em processos de adesão, motilidade de superfície e formação de biofilmes em cepas patogênicas de *Burkholderia* (Craig et al. 2004; Essex-Lopresti et al. 2005, Singh et al. 2022). Além disso, não foram identificados os outros genes associados à adesão (BoaA e BoaB).

Outro fator de destaque no genoma de Bco UnB 1430 é a ausência do gene *fliC*, codificador de flagelina, frequentemente relacionado à adesão e invasão de células hospedeiras (Inglis et al. 2003; Urban et al. 2004; Chua et al. 2004). Embora genes relacionados à motilidade, como *cheA*, *cheB*, *cheD*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *chez*, e genes flagelares como (*flg* e *fli*), tenham sido identificados, a ausência de *fliC* limita a capacidade de interação invasiva, sugerindo que a motilidade de UnB1430 está mais relacionada à adaptação a nichos ambientais do que à patogenicidade.

A presença do gene *cdpA*, regulador de fosfodiesterase específica de ácido diguanílico cíclico (c-di-GMP), indica uma regulação funcional entre motilidade e formação de biofilmes. Estudos mostram que *cdpA* reduz os níveis de c-di-GMP promovendo a motilidade e inibindo a formação de biofilmes, enquanto sua inativação pode aumentar a agregação celular e a produção de exopolissacarídeos (Lee et al. 2010). Essa regulação pode favorecer a adaptação da UnB1430 a ambientes diversos.

Outro gene identificado foi *pmlR/bspR1* associado ao *Quorum Sensing* (QS), mecanismo de comunicação celular relevante na adaptação ambiental, formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos (Eberl 2016). Apesar da ausência de outros genes QS, como *bpsI* e *bpsR*, a presença de *pmlR/bspR1* sugere uma capacidade básica de QS na UnB1430, com possível papel na estabilidade ambiental e adaptação a condições adversas, em vez de promover virulência. Embora,

este gene esteja relacionado com a virulência de algumas espécies, como *B. glumae* na cultura do arroz, pois é um regulador transcricional da família LuxR (Cui et al. 2021). Os primeiros genes QS foram identificados em uma cepa de *B. cepacia* relacionados com a produção de sideróforos (Lewenza et al. 1999)

A resistência a antibióticos, uma característica intrínseca ao gênero *Burkholderia*, foi confirmada na cepa UnB1430 por meio da análise genômica. Essas análises revelaram a presença de genes relacionados a sistemas de efluxo do tipo resistência nodulação-divisão (RND), que conferem resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina, além de resistência a múltiplas drogas (SMR) (Moore et al. 1999). Esses mecanismos destacam, a capacidade adaptativa de UnB1430 diante de diversos desafios ambientais. Estudos comparativos sugerem que cepas patogênicas e não patogênicas de *Burkholderia* compartilham perfis semelhantes de resistência a antibióticos, refletindo sua notável plasticidade genômica (Jia e Lu 2024). A identificação de genes com base no banco de dados CARD geralmente é realizada no nível da classe de antibióticos, o que torna importante uma comparação direta com o fenótipo de resistência observado. Fenotipicamente UnB1430 demonstrou resistência apenas à tetraciclina. A análise genômica por sua vez, indicou a presença de genes associados à resistência ao grupo das tetraciclina. No entanto, os testes fenotípicos revelaram que UnB1430 permaneceu sensível a outros antibióticos do mesmo grupo, como a minociclina e a doxiciclina. Esses resultados reforçam a importância de integrar dados genômicos e fenotípicos para compreensão mais abrangente do perfil de resistência de microrganismos. Um padrão semelhante foi observado no estudo de Angus et al. (2014) que testaram várias cepas de *Burkholderia*. Os resultados fenotípicos mostraram sensibilidade a diversos antibióticos, enquanto a resistência observada incluiu a tetraciclina.

Outro achado relevante foi a presença do gene *Omp38* de *Burkholderia pseudomallei*, associado à resistência a beta-lactâmicos (Siritapetawee et al. 2004). A presença sugere que UnB1430 pode ter adquirido características de resistência semelhantes de outras espécies do gênero *Burkholderia*. Como os beta-lactâmicos, amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas graves, a presença desse gene levanta questões importantes sobre o potencial de resistência a antibióticos dentro do gênero (Urban-Chmiel et al. 2022).

Além disso, em análises adicionais, realizadas com o isolado *B. contaminans* Sk875, foram identificados genes associados à resistência a tetraciclina/ fluoroquinolona (*afeF*), e aminoglicosídeo (*amrA*) (Kim et al. 2023). De forma semelhante, os genes identificados na cepa UnB1430 neste

estudo estão relacionados a várias bombas de efluxo, que adotam diferentes mecanismos de resistência, permitindo à bactéria sobreviver e prosperar em uma ampla gama de ambientes (Deng et al. 2016).

5 REFERÊNCIAS

- Ahmad T, Farooq S, Mirza DN, Kumar A, Mir RA, Riyaz-Ul-Hassan S (2022). Insights into the endophytic bacterial microbiome of *Crocus sativus*: functional characterization leads to potential agents that enhance the plant growth, productivity, and key metabolite content. *Microbial ecology* 1-20
- Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of Rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant pathology* 67:1: 3-17.
- Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, McArthur AG (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic acids research* 51: D1: D690-D699
- Angus AA, Agapakis CM, Fong S, Yerrapragada S, Estrada-de Los Santos P, Yang P, Hirsch AM (2014). Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. *PloS one* 9:1:83779.
- Bach E, Passaglia LMP, Jiao J, Gross H (2022a) *Burkholderia* in the genomic era: from taxonomy to the discovery of new antimicrobial secondary metabolites. *Critical Reviews in Microbiology* 48:2:121-160
- Bach E, Sant'Anna FH, Seger GD dos S, Passaglia LMP (2022b) Pangenome inventory of *Burkholderia* sensu lato, *Burkholderia* sensu stricto, and the *Burkholderia* cepacia complex reveals the uniqueness of *Burkholderia catarinensis*. *Genomics* 114:1:398-408
- Barrera-Galicia GC, Peniche-Pavía HA, Peña-Cabriaes JJ, Covarrubias SA, Vera-Núñez JA, Délano-Frier JP. (2021). Metabolic footprints of *Burkholderia* sensu lato rhizosphere bacteria active against maize *Fusarium* pathogens. *Microorganisms*, 9:10: 2061
- Basseto MA, Ceresini PC, Valério Filho WV. (2007). Severidade da mela da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em função de doses de potássio. *Summa phytopathologica*, 33,

- Ben Slimene Debez I, Houmani H, Mahmoudi H, Mkadmini K, Garcia-Caparrós P, Debez A, Tabbene O, Djébalí N, Urdaci M-C (2024). Response Surface Methodology-Based Optimization of the Chitinolytic Activity of *Burkholderia contaminans* Strain 614 Exerting Biological Control against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 12:8:1580.
- Blin K, Shaw S, Augustijn HE, Reitz ZL, Biermann F, Alanjary M, Weber T (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection regulation chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research* 51: W1:W46-W50
- Bochkareva OO, Moroz E V, Davydov II, Gelfand MS (2018) Genome rearrangements and selection in multi-chromosome bacteria *Burkholderia* spp. *BMC Genomics* 19:1-17
- Bonaterrea A, Badosa E, Daranas N, Francés J, Roselló G, Montesinos E (2022). Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms* 10:9: 1759.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). Regras para análise de sementes. Regras para Análise de Sementes. Mapa. 399
- Cappellaro S, Huzar-Novakowski J, Chiomento JLT, Inokuti EM. (2024). Characterization and report of binucleate *Rhizoctonia* AG-Fb affecting soybean in Brazil. *Journal of Phytopathology* 172:1:13274.
- Chua KL, Chan YY, Gan YH. (2003). Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity* 71:4: 1622-1629.
- Chua KO, See-Too WS, EeR, Lim YL, Yin WF, Chan KG (2019) In silico analysis reveals distribution of quorum sensing genes and consistent presence of LuxR solos in the *Pandoraea* species. *Front Microbiol* 10:1758.
- Correa OS, Montecchia MS, Berti MF, Ferrari MCF, Pucheu NL, Kerber NL, García AF (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41:2:185-194.
- Craig L, Pique, ME, Tainer, JA (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2 :5: 363-378.
- Cui Z, Wang S, Kakar KU, Xie G, Li B, Chen G, Zhu B (2021). Genome sequence and adaptation analysis of the human and rice pathogenic strain *Burkholderia glumae* AU6208. *Pathogens* 10:2:87.

- Cuong ND, Nicolaisen MH, Sørensen J, Olsson S (2011). Hyphae-colonizing *Burkholderia* sp.—a new source of biological control agents against sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* AG1-IA) in rice. *Microbial ecology* 62 425-434.
- Deng P, Foxfire A, Xu J, Baird SM, Jia J, Delgado KH, Lu SE (2017). The siderophore product ornibactin is required for the bactericidal activity of *Burkholderia contaminans* MS14. *Applied and Environmental Microbiology*, 83:8:00051-17.
- Deng P, Wang X, Baird SM, Showmaker KC, Smith L, Peterson DG, Lu S (2016). Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS 14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. *Microbiologyopen* 5:3: 353-369.
- Depoorter E, De Canck E, Coenye T, Vandamm P (2021) *Burkholderia* bacteria produce multiple potentially novel molecules that inhibit carbapenem-resistant gram-negative bacterial pathogens. *Antibiotics* 10:2:147.
- Depoorter E, De Canck E, Peeters C, Wieme AD, Cnockaert M, Zlosnik JE, Vandamme P (2020). *Burkholderia cepacia* complex taxon K: where to split? *Frontiers in microbiology*, 11, 1594.
- Dorrance AE, Kleinhenz MD, McClure SA, Tuttle NT (2003) Efeitos da temperatura, umidade e tratamento de sementes na podridão radicular de *Rhizoctonia solani* da soja. *Plant disease* 87:5:533–538.
- Doty SL, Joubert PM, Firrincieli A, Sher AW, Tournay R, Kill C, Okubara P (2022). Potential biocontrol activities of *Populus* endophytes against several plant pathogens using different inhibitory mechanisms. *Pathogens* 12:1:13.
- Eberl L (2006). Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *International Journal of Medical Microbiology* 296:2-3: 103-110.
- EL Sabagh A, Islam MS, Hossain A, Iqbal MA, Mubeen M, Waleed M, Abdelhamid MT (2022). Phytohormones as growth regulators during abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Agronomy*, 4:765068.
- Essex-Lopresti AE, Boddey JA, Thomas R, Smith MP, Hartley MG, Atkins T, Titball RW (2005). A type IV pilin, PilA, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence in vivo. *Infection and immunity*, 73:2:1260-1264
- Gu G, Smith L, Liu A, Lu SE (2011). Genetic and biochemical map for the biosynthesis of

- occidiofungin, an antifungal produced by *Burkholderia contaminans* strain MS14. *Applied and Environmental Microbiology* 77:17: 6189-6198.
- Guo JK, Zhao J, Ren XH, Jia HL, Muhammad HL X, Hua L (2020). Effects of *Burkholderia* sp. D54 on growth and cadmium uptake of tomato, ryegrass and soybean plants. *International Journal of Environmental Science and Technology* 17:1149-1158.
- Hansanant N, Cao K, Tenorio A, Joseph T, Ju M, McNally N, Smith L (2024). Previously Uncharacterized Variants, OCF-E–OCF-J, of the Antifungal Occidiofungin Produced by *Burkholderia contaminans* MS14. *Journal of Natural Products* 87:2:186-194.
- Heo AY, Koo YM, Choi HW (2022) Biological Control Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against Tomato *Fusarium* Wilt and Bacterial Speck Diseases. *Biology: Basel*) 11
- Hornik, K. the R Core Team (2022) The R FAQ <https://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>.
- Inglis TJ, Robertson T, Woods DE, Dutton N, Chang BJ (2003). Flagellum-mediated adhesion by *Burkholderia pseudomallei* precedes invasion of *Acanthamoeba astronyxis*. *Infection and immunity* 71:4: 2280-2282.
- Jain C, Rodriguez RL, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S (2018) High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications* 9:5114
- Jia J, Ford E, Hobbs SM, Baird SM, Lu SE (2022). Occidiofungin is the key metabolite for antifungal activity of the endophytic bacterium *Burkholderia* sp. MS455 against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 112:3:481-491.
- Jia J, Lu SE (2024). Comparative Genome Analyses Provide Insight into the Antimicrobial Activity of Endophytic *Burkholderia*. *Microorganisms* 12:1: 100.
- Kang Y, Carlson R, Tharpe W, Schell MA (1998). Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:10: 3939-3947.
- Kendall MM. (2017). Extra! Extracellular effector delivery into host cells via the type 3 secretion system. *Mbio*, 8:3: 10-1128.
- Kim E, Jung HI, Park SH, Kim HY, Kim SK. (2023). Comprehensive genome analysis of

- Burkholderia contaminans* SK875, a quorum-sensing strain isolated from the swine. *AMB Express* 13:1: 30
- Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature biotechnology*, 37:5: 540-546.
- Kong P, Richardson P, Hong C (2020). *Burkholderia* sp. SSG is a broad-spectrum antagonist against plant diseases caused by diverse pathogens. *Biological control* 151: 104380.
- Lee HS, Gu F, Ching SM, Lam Y, Chua KL (2010). CdpA is a *Burkholderia pseudomallei* cyclic di-GMP phosphodiesterase involved in autoaggregation, flagellum synthesis, motility, biofilm formation, cell invasion, and cytotoxicity. *Infection and immunity* 78:5: 1832-1840.
- Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA (1999). Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *Journal of Bacteriology* 181:3: 748-756.
- Li B, Liu BP, Yu RR, Lou MM, Wang YL, Xie GL, Sun GC (2011). Phenotypic and molecular characterization of rhizobacterium *Burkholderia* sp. strain R456 antagonistic to *Rhizoctonia solani*, sheath blight of rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2305-2313.
- Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research* 50: D1:D912-D917.
- Ma J, Guo F, Jin Z, Geng M, Ju M, Ravichandran A, Zhang H (2020). Novel antiparasitic activity of the antifungal lead occidiofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64:8: 10-1128.
- Mahenthiralingam E, Baldwin A, Drevinek P, Vanlaere E, Vandamme P, LiPuma JJ, Dowson CG (2006). Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS One* 1:1:17.
- McKinney HH (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 6:195–218
- Meng X, Luo Y, Zhao X, Fu Y, Zou L, Cai H, Tu M (2024). Isolation, Identification, and Biocontrol Mechanisms of Endophytic *Burkholderia arboris* DHR18 from Rubber Tree against Red Root Rot Disease. *Microorganisms* 12:9: 1793.
- Meng XJ, Medison RG, Cao S, Wang LQ, Cheng S, Tan LT, Zhou Y (2023). Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic *Burkholderia vietnamiensis* C12

- from *Ficus tikoua* Bur against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control* 178: 105132.
- Moore RA, DeShazer D, Reckseidler S, Weissman A, Woods DE (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43:3465-470.
- Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J (2022). Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics*, 11:8:1079.
- Narayanan Z, Glick BR (2022). Secondary metabolites produced by plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microorganisms* 10:10: 2008.
- Othman NZ (2023). Genome sequence data of *Burkholderia* sp. IMCC1007 isolated from maize rhizosphere: A potential strain in fusaric acid mycotoxin biodegradation. *Data in Brief* 48: 109204.
- Otten W, Gilligan CA (2006). Soil structure and soil-borne diseases: using epidemiological concepts to scale from fungal spread to plant epidemics. *European Journal of Soil Science* 57:1: 26-37.
- Pal G, Saxena S, Kumar K, Verma A, Sahu PK, Pandey A, Verma SK (2022). Endophytic *Burkholderia*: Multifunctional roles in plant growth promotion and stress tolerance. *Microbiological Research* 265:127201.
- Paliwal K, Jajoo A, Tomar RS, Prakash A, Syed A, Bright JP, Sayyed RZ (2023). Enhancing biotic stress tolerance in soybean affected by *Rhizoctonia solani* root rot through an integrated approach of biocontrol agent and fungicide. *Current Microbiology* 80:9: 304.
- Patz S, Gautam A, Becker M, Ruppel S, Rodríguez-Palenzuela P, Huson DH (2021). PLABase: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. *BioRxiv* 2021.??vChecar se foram citados no cap. 2, não encontrei.
- Quan CS, Zheng W, Liu Q, Ohta Y, Fan SD. (2006). Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Applied microbiology and biotechnology* 72: 1276-1284.
- Reimann C, Patel HM, Serino L, Barone M, Walsh CT, Haas D (2001). Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 183:3: 813-820.
- Romeiro RDS (2007). Controle biológico de enfermidades de plantas fundamentais. Viçosa, MG: Editora UFV. p.99

- Sallam N, Ali EF, Seleim MA, Khalil Bagy HM (2021). Endophytic fungi associated with soybean plants and their antagonistic activity against *Rhizoctonia solani*. Egyptian Journal of Biological Pest Control 31, 1-9.
- Schwyn B, Neilands J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry 160:1: 47-56.
- Seemann, T. (2016). ABRicate: Mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. GitHub: San Francisco, CA, USA. Available online at <https://github.com/tseemann/abricate>
- Sharma M, Tarafdar A, Ghosh R, Gopalakrishanan S (2017). Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. Volume 2: Soil-Microbe-plant interaction 153:188
- Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Suginta W. (2004). Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and its function as a diffusion porin. Biochemical Journal 384:3: 609-617.
- Sokol PA, Darling P, Lewenza S, Corbett CR, Kooi CD (2000). Identification of a siderophore receptor required for ferric ornibactin uptake in *Burkholderia cepacia*. Infection and immunity 68:12: 6554-6560.
- Szczeczek M, Shoda M (2004). Biocontrol of *Rhizoctonia* Damping-off of Tomato by *Bacillus subtilis* Combined with *Burkholderia cepacia*. Journal of Phytopathology 152:10: 549-556.
- Tagele SB, Kim SW, Lee HG, Kim HS, Lee YS (2018). Effectiveness of multi-trait *Burkholderia contaminans* KNU17BI1 in growth promotion and management of banded leaf and sheath blight in maize seedling. Microbiological Research 214, 8-18.
- Tagele SB, Kim SW, Lee HG, Lee YS (2019). Potential of novel sequence type of *Burkholderia cenocepacia* for biological control of root rot of maize (*Zea mays* L.) caused by *Fusarium temperatum*. International Journal of Molecular Sciences 20:5: 1005.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Ostell J (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic acids research 44:14: 6614-6624.
- Taulé C, Vaz-Jauri P, Battistoni F (2021). Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. World Journal of Microbiology and Biotechnology 37: 1-9.
- Thomsen MCF, Hasman H, Westh H, Kaya H, Lund O (2017). RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. Bioinformatics 33(24): 3917-3921.
- Urban TA, Griffith A, Torok AM, Smolkin ME, Burns JL, Goldberg JB (2004). Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. Infection and

- immunity, 72:9: 5126-5134.
- Vander Broek CW, Stevens JM (2017). Type III secretion in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 255.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Vandamme P (2009). Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59:1: 102-111.
- Verma, S. K, Kharwar, R. N, White, J. F. (2019). The role of seed-vectored endophytes in seedling development and establishment. *Symbiosis* 78: 107-113.
- Vishwakarma K, Kumar N, Shandilya C, Mohapatra S, Bhayana S, Varma A (2020). Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: a review. *Frontiers in Microbiology* 11: 560406.
- Wright C, Wykes M (2022) Medaka. Disponível: <https://github.com/nanoporetech/medaka>
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb: Nov. *Microbiology and Immunology* 36:1251-1275
- Yang X, Long M, Shen X (2018). Effector–immunity pairs provide the T6SS nanomachine its offensive and defensive capabilities. *Molecules* 23:5: 1009.
- Yang Y, Wang H, Tu J, Li Y, Guan H (2024). Comprehensive genomic analysis of *Burkholderia arboris* PN-1 reveals its biocontrol potential against *Fusarium solani*-induced root rot in *Panax notoginseng*. *Current Genetics* 70:1: 4.
- You LX, Zhang RR, Dai JX, Lin ZT, Li YP, Herzberg M, Rensing C (2021). Potential of cadmium resistant *Burkholderia contaminans* strain ZCC in promoting growth of soybeans in the presence of cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211: 111914.
- Zhang M, Wang X, Ahmed T, Liu M, Wu Z, Luo J, Li B (2020). Identification of genes involved in antifungal activity of *Burkholderia seminalis* against *Rhizoctonia solani* using Tn5 transposon mutation method. *Pathogens* 9:10: 797.
- Zygodlo JA, Guzman CA, Grosso NR. (1994). Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes*

minuta L. and *T. filifolia* Lag. Journal of Essential Oil Research 6:6: 617-621.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo destacam o potencial do isolado UnB1430 de *Burkholderia contaminans* para o biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas. Em condições de casa de vegetação UnB1430 reduziu visivelmente a severidade da doença de podridão-radicular em plântulas de soja, embora sem diferença significativa em relação às plântulas inoculadas apenas com *R. solani* e além, as plântulas inoculadas com Bco nas sementes, em concentração de 10^8 UFC/mL, apresentaram maior peso seco em comparação com as não tratadas.

A análise genômica revelou fatores associados à produção de metabólitos bioativos, como sideróforos e occidiofungina, além de características relacionadas à promoção de crescimento vegetal e adaptação ambiental. A ausência de sistemas de secreção associados à virulência e de genes essenciais para adesão e motilidade invasiva reforça o perfil não patogênico da cepa, ampliando sua segurança para uso em aplicações agrícolas.

Esses resultados não apenas corroboram estudos prévios sobre espécies do gênero *Burkholderia*, mas também introduzem uma nova perspectiva sobre o uso de *B. contaminans* na cultura da soja, abrindo caminhos para investigações futuras que conduzam a práticas de manejo sustentável.

Foram desenhados três pares de *primers*, dos quais um apresentou especificidade para *Burkholderia contaminans*. Até o momento, não há registros na literatura sobre *primers* específicos para essa espécie *ainda*.

ANEXOS

Tabela 1. Características genômicas de 15 isolados de *Burkholderia contaminans* com sequenciamento completo e de alta qualidade.

Isolado	Tipo de sequenciamento	C	Tamanho	Genes totais	Pseudogenes	CheckM (%)	ANI	Hospedeiro
UnB1430	Oxford Nanopore Promethion	3	8416198	7602	106	99.89	OK	Folhas do gerânio
MS14	Illumina	3	8509249	7759	139	100	OK	Solo
FFH2055	Illumina MiSeq	3	8214913	7501	149	99.47	OK	Humano
FL-1-2-30-S1-D0	PacBio	3	8170775	7384	101	99.89	OK	Solo
B17-01563-1	Oxford Nanopore MinION; Illumina NovaSeq	4	8617690	7788	109	99.89	OK	Água
SK875	Illumina; PacBio	4	8596045	7801	126	100	OK	Porco
DM32	Oxford Nanopore; Illumina NovaSeq	4	8481745	7909	153	99.57	OK	Produtos de limpeza
ZCC	PacBio RSII	5	9002241	8254	341	97.07	OK	Solo
XL73	PacBio	5	8656859	7878	130	99.68	OK	Rizosfera de pepino
FFI45	Illumina MiSeq	5	8863406	8153	532	93.98	OK	Solução farmacêutica
NML151013	Oxford Nanopore MiniION	5	8666185	7976	140	99.72	OK	Humano
toggle1	Oxford Nanopore GridION	6	9280736	8561	248	99.89	OK	Sangue
5080	Oxford Nanopore; Illumina	6	8789975	8017	133	99.85	OK	Humano
SCAID TST1- 2021 (11/270)	PacBio Sequela	6	8363142	7660	332	93.88	OK	Cotonete de tubo/Procedimentos cirúrgicos
LMG 23361T	PacBio	7	9436857	8726	282	98.2	OK	Ovelha/leite

C: Número de cromossomos

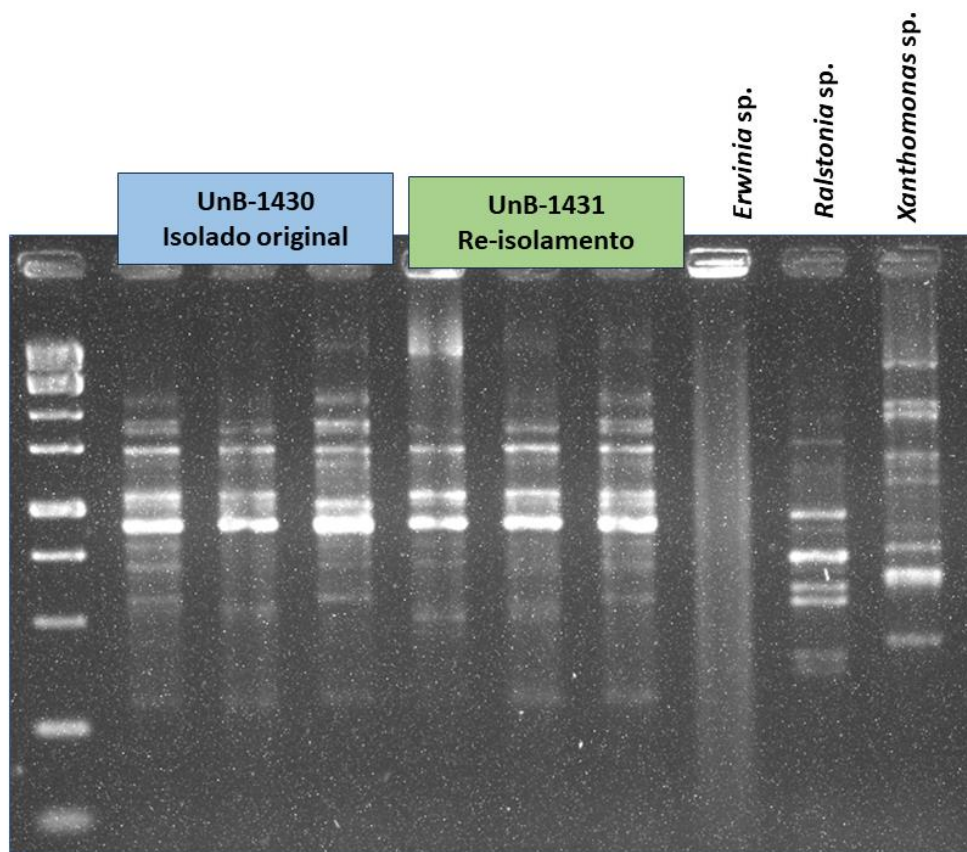


Figura 2. Perfil molecular obtido por BOX-PCR dos isolados de *B. contaminans* UnB1430 (isolado original) e UnB1431 (reisolamento), com os perfis de *Ralstonia* sp. e *Xanthomonas* sp. como controles.

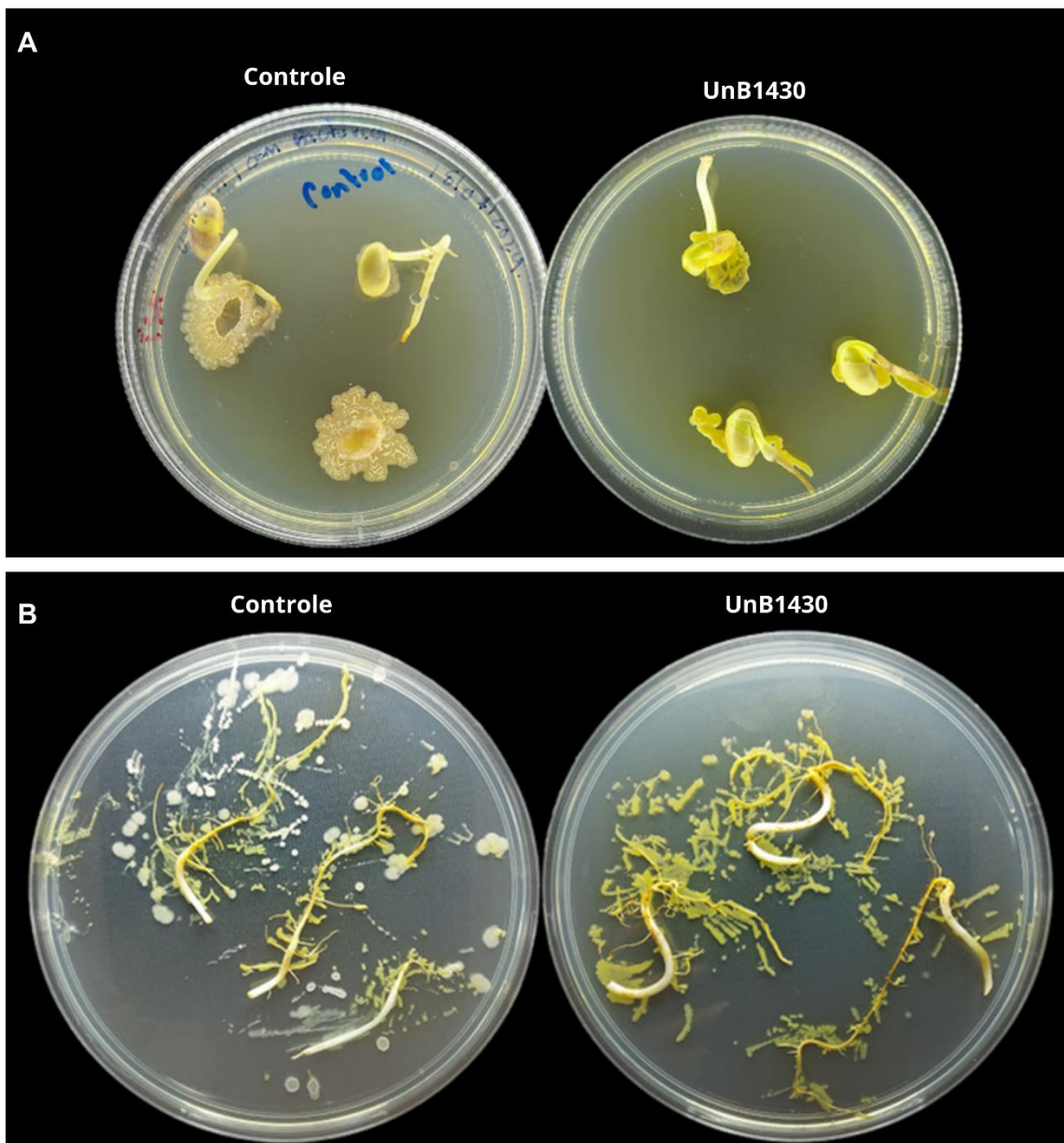


Figura 3. (A). Ensaio para confirmar a microbiolização das sementes de soja, onde quatro sementes microbiolizadas e quatro do controle foram colocadas em placas de Petri. **(B).** Teste para avaliar a capacidade de colonização do sistema radicular por UnB1430. O Crescimento bacteriano sobre as sementes e raízes confirmou tanto a microbiolização das sementes quanto a colonização da radicular. Meio Ágar Triptona de Soja (TSA), resultado observado após 24 horas de incubação a 28°C na BOD.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Link [Tabelas suplementares](#)

Tabela S1. Resultado ANI

Tabela S2. Genes de resistência antibióticos

Tabela S3. Genes de promoção de crescimento