

ISABELA NELVO ESTEVES

ANTAGONISMO *in vitro* À BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA
Ralstonia solanacearum



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Profa. Lucy Seldin e coorientação da Me. Isabella Dal’Rio

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

N432a Nelvo Esteves, Isabela
Antagonismo IN VITRO à bactéria fitopatogênica
RALSTONIA SOLANACEARUM / Isabela Nelvo Esteves. --
Rio de Janeiro, 2022.
52 f.

Orientadora: Lucy Seldin.
Coorientadora: Isabella Dal'Rio.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. murcha-bacteriana. 2. biocontrole. 3.
Ralstonia solanacearum. 4. substâncias
antimicrobianas. 5. capuchinha. I. Seldin, Lucy,
orient. II. Dal'Rio, Isabella, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Isabela Nelvo Esteves**
DRE: 119057285

BANCA EXAMINADORA: Profa. Daniela Sales Alviano Moreno (Presidente)
Profa. Dirlei Nico
Profa. Maite Vaslin de Freitas Silva
Profa. Fernanda de Avila Abreu (Suplente)

Título da Monografia: “*Antagonismo in vitro à bactéria fitopatogênica Ralstonia solanacearum*”

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/svt-hvjk-ovf?hs=224>

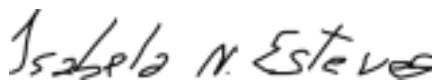
Data e hora de início: **19 de dezembro de 2022 às 9:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **9,8** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Profa. Daniela Sales Alviano Moreno
10,0	Profa. Dirlei Nico
9,5	Profa. Maite Vaslin de Freitas Silva
_____	Profa. Fernanda de Avila Abreu

Presidente da banca: 
Profa. Daniela Sales Alviano Moreno

Aluno: 
Isabela Nelvo Esteves



Orientador:

Profa. Lucy Seldin / Coorientador: MSc. Isabella Dal'Rio

Coordenador de

TCC:



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, que sempre apoiou meus estudos. Roberto, meu pai; Elaine, minha mãe; e Ester, minha prima-irmã. O amor incondicional de vocês me moveu o tempo todo.

To Jason, for being an amazing partner and always giving me love and support. Our love breaks the barrier of distance and I can't wait for our future together.

Agradeço à minha orientadora, Lucy Seldin, que esteve comigo desde meu segundo período no curso de Microbiologia. Obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos, e por nunca ter me deixado desistir, mesmo nos momentos que eu duvidei de mim mesma. Aos meus coorientadores, Isabella Dal'Rio e Luciano, que me ensinaram tanto sobre a rotina de laboratório e me ajudaram a crescer. A todos do LGM e do LABEM, que foram incríveis colegas de trabalho durante todos os meus anos de graduação.

Ao curso de Microbiologia e aos professores incríveis que tornam o instituto a nossa segunda casa. Obrigada, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por me formar Microbiologistas. À banca avaliadora desse TCC, muito obrigada por aceitarem fazer parte dessa etapa, professoras!

Aos meus melhores amigos: Renan, Art, Stef, Pedro, Vini, Ralice, Dudu e Matheus. Eu amo vocês e mal posso esperar para ver tudo que vamos alcançar juntos.

À UFRJ e todos seus trabalhadores. A UFRJ resiste e continuará resistindo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO**ISABELA NELVO ESTEVES****ANTAGONISMO *in vitro* À BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Ralstonia solanacearum*****Orientador: Lucy Seldin****Coorientadores: Isabella Dal’Rio e Luciano Procópio**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* causa uma doença popularmente conhecida como murcha-bacteriana. A fitopatologia manifesta-se nas plantas infectadas através de sintomas como a murcha das folhas e o apodrecimento das raízes da planta. Diversos métodos são utilizados na tentativa de controlar a disseminação da doença, como por exemplo a aplicação do agrotóxico hidróxido de cobre; entretanto, nenhum deles se mostra suficientemente eficaz. Portanto, o desenvolvimento de um bioinoculante a partir de um consórcio de estirpes bacterianas promotoras de crescimento de plantas (PGPB - *Plant Growth Promoting Bacteria*) é uma possível alternativa para o controle da doença, já que as PGPB podem dar proteção contra fitopatógenos por meio da produção de compostos bioativos, como substâncias antimicrobianas (SAMs). Em um estudo realizado anteriormente no nosso laboratório, foram isoladas das raízes da planta *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) 245 PGPB produtoras de SAMs. Além disso, foi observada a presença de sintomas característicos da fitopatologia causada por *R. solanacearum* nas plantas de capuchinha utilizadas no estudo. Dando continuidade ao estudo, os objetivos desse trabalho foram: (i) isolar possíveis estirpes de *R. solanacearum* das plantas de capuchinha e (ii) realizar testes de antagonismo *in vitro* utilizando as PGPB previamente isoladas. Para isso, foram coletadas e processadas aproximadamente 10g de raízes de capuchinha que apresentavam sintomas característicos da doença causada por *R. solanacearum*. O lavado e o macerado das raízes foram diluídos sucessivamente, semeados em meio seletivo para *Ralstonia* (meio SMSA-E) e incubados por até 5 dias. As estirpes isoladas foram selecionadas através de sua morfologia colonial (colônias brancas, leitosas, irregulares e avermelhadas no centro) e observadas ao microscópio óptico após coloração de Gram. As estirpes provavelmente pertencentes à espécie *R. solanacearum* foram então submetidas a testes de antagonismo *in vitro* com as PGPB previamente isoladas da capuchinha em meio de cultura sólido CPG (*Casamino acid Peptone-Glucose*), tanto por meio da técnica de cultura cruzada quanto pela técnica de inóculo direto em placa (*spot on lawn*). Dezesesseis estirpes de PGPB apresentaram

capacidade de inibir o crescimento das possíveis estirpes de *R. solanacearum*. Dessas 16 estirpes, 9 estirpes apresentaram padrões de bandas diferentes após a amplificação por PCR utilizando-se o iniciador BOXA1R. Dessa forma, essas 9 estirpes foram identificadas molecularmente através do gene *rrs* que codifica o 16S rRNA. Estas estirpes foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Enterobacter*. Assim, as PGPB com atividade contra *R. solanacearum* poderão ser utilizadas para futuros testes *in vivo* e para um possível desenvolvimento de um bioinoculante para a capuchinha.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*, capuchinha, murcha-bacteriana, biocontrole, substâncias antimicrobianas.

ABSTRACT**ISABELA NELVO ESTEVES*****IN VITRO* ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST THE PLANT PATHOGEN*****Ralstonia solanacearum*****Orientador: Lucy Seldin****Coorientador: Isabella Dal’Rio e Luciano Procópio**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* causes a disease known as bacterial wilt. The phytopathology manifests itself on infected plants by symptoms such as wilting of the leaves and rotting of the plant's roots. A wide range of methodologies have been tested to control disease dissemination, for example, the application of copper hydroxide. Nevertheless, none of the recent methodologies are presenting sufficient efficacy. Therefore, the development of a bioinoculant from a consortium of plant growth-promoting bacteria (PGPB) is a possible alternative to disease control, as PGPB can offer protection against plant pathogens through the production of bioactive compounds such as antimicrobial substances. In a study previously developed in the laboratory, 245 PGPB were isolated from the roots of the plant *Tropaeolum majus* L. (garden nasturtium). Additionally, the presence of characteristic symptoms of bacterial wilt in the garden nasturtium plants utilized was observed. To continue that study, we: (i) isolated possible *R. solanacearum* strains from the garden nasturtium plants and (ii) performed *in vitro* antagonism assays utilizing the PGPB previously isolated. For that, we collected and processed approximately 10 g of garden nasturtium roots that presented bacterial wilt symptoms. The roots were sterilized, macerated and further serially diluted. The dilutions were plated on selective media for *Ralstonia*, SMSA-E, and incubated for up to 5 days. The isolated strains were selected by observation of colony morphology (milky white irregular colonies with a reddish center) and visualized under an optical microscope after Gram staining. The possible isolated *R. solanacearum* strains were employed in *in vitro* antagonism assays on CPG (Casamino acid Peptone-Glucose) culture medium with PGPB isolated from garden nasturtium, utilizing both a cross-culture assay and a spot-on-lawn assay. Sixteen PGPB strains were able to inhibit the growth of possible *R. solanacearum* strains. Nine of these 16 strains exhibited different patterns after PCR amplification utilizing the primer BOXA1R. Furthermore, those 9 strains were molecularly identified through the *rrs* gene, encoding the 16 rRNA. After molecular identification, the strains were identified as belonging to the genera *Pseudomonas*, *Serratia* and *Enterobacter*. The PGPB that presented activity against *R. solanacearum* could be used in future *in vivo* assays and for possible bioinoculant development.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, garden nasturtium, biocontrol, bacterial wilt, antimicrobial substances

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS**ISABELA NELVO ESTEVES****ANTAGONISMO *in vitro* À BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Ralstonia solanacearum*****Orientador: Lucy Seldin****Coorientador: Isabella Dal’Rio e Luciano Procópio**

Resumo para pessoas leigas da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A bactéria *Ralstonia solanacearum* causa em plantas uma doença popularmente conhecida como murcha-bacteriana, que murcha as folhas e apodrece as raízes da planta. Atualmente, o controle da doença é difícil e custoso. Portanto, é interessante o desenvolvimento de alternativas eficazes, econômicas e sustentáveis. Um inoculante que utiliza bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB - *Plant Growth Promoting Bacteria*) é uma possível alternativa para o controle da doença, já que as PGPB podem produzir substâncias antimicrobianas (SAMs) que combatem fitopatógenos. Em um estudo realizado anteriormente no laboratório, foram isoladas das raízes da planta *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) 245 PGPB produtoras de SAMs. Também foi observada a presença de sintomas de murcha-bacteriana nas plantas utilizadas. Para continuar esse estudo, os objetivos deste trabalho foram: (i) isolar possíveis estirpes de *R. solanacearum* das plantas de capuchinha e (ii) realizar testes de antagonismo *in vitro* utilizando as PGPB previamente isoladas. Para isso, foram coletadas e processadas raízes de capuchinha que apresentavam sintomas de murcha-bacteriana. Para realizar o isolamento do fitopatógeno, utilizamos um meio de cultura seletivo para *R. solanacearum*. As estirpes bacterianas foram isoladas considerando-se seu aspecto visual (colônias brancas, leitosas, irregulares e avermelhadas no centro) e através de microscopia óptica. As estirpes de *Ralstonia* isoladas foram utilizadas em testes de antagonismo *in vitro* com as PGPB. Por meio dos testes de antagonismo, podemos visualizar se uma bactéria consegue inibir o crescimento da outra. Nove bactérias benéficas apresentaram capacidade de inibir o crescimento das possíveis estirpes de *Ralstonia*. Dessa forma, essas 9 estirpes bacterianas foram identificadas molecularmente sendo assim identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Enterobacter*. Assim, as bactérias benéficas que inibiram o crescimento de *Ralstonia* poderão ser utilizadas em futuros testes nas plantas e para o potencial desenvolvimento de um bioinoculante para capuchinha.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*, capuchinha, biocontrole, murcha-bacteriana.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Na foto, capuchinha de cor vermelha. As folhas da planta são arredondadas e planas, e as flores podem apresentar colorações de amarelo ao vermelho. Fonte: Herbário da UniRio <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/tropaeolum-majus-1>18
- Figura 2** – Fotos retiradas de acervo pessoal. Na imagem, capuchinha doente na casa de vegetação do Centro de Ciências da Saúde – UFRJ. Vê-se a murcha da flor, na seta em azul, assim como o amarelamento das folhas, nas setas em vermelho25
- Figura 3** - Teste inicial realizado em caule de capuchinha. Na direção das setas em rosa, a secreção de muco comumente produzido por *Ralstonia*. Foto retirada de acervo pessoal.28
- Figura 4** - – Esquema representativo do processamento de raízes para isolamento de *R. solanacearum* em meio seletivo SMSA-E. A parte “A” da figura representa o esquema do isolamento de estirpes rizosféricas, conforme descrito no tópico 4.2. A parte “B” representa o isolamento de estirpes endofíticas conforme descrito em 4.3.29
- Figura 5** - Representação do teste de cultura cruzada, onde a linha rosa “R” é a estirpe de *Ralstonia* a ser testada; as linhas horizontais “Neg” mostram um resultado negativo e a linha “Pos” mostra inibição do crescimento do fitopatógeno.31
- Figura 6** - Esquema representando o teste realizado para seleção de estirpes que produzem SAM contra as possíveis estirpes de *Ralstonia*.32
- Figura 7** - Estirpe bacteriana isolada em meio SMSA-E que apresenta as características da morfologia colonial de *R. solanacearum* (colônias brancas, leitosas, irregulares e avermelhadas no centro). Imagem retirada de arquivo pessoal.34
- Figura 8** – Exemplos do método de cultura cruzada. Na linha vertical, a estirpe 25C e, na horizontal, estirpes rizosféricas. A interrupção do crescimento da estirpe 25C em direção às estirpes rizosféricas demonstra um possível antagonismo. Fotos retiradas do acervo pessoal.35
- Figura 9** - Exemplos de halos de inibição obtidos após o teste de produção de substâncias antimicrobianas. Imagens retiradas do arquivo pessoal.37
- Figura 10** - Dendrograma gerado a partir de análise do gel de BOX-PCR no programa BIONUMERICS. Na imagem, padrões de bandas semelhantes foram agrupados considerando 70% de similaridade, apresentando assim 7 grupos BOX que foram nomeados de A a G38
- Figura 11** - Árvore filogenética gerada a partir do programa MEGA11. As estirpes foram identificadas, a partir do sequenciamento gene *rrs*, como pertencentes a três gêneros - *Serratia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Relação das amostras de *Ralstonia* sequenciadas e seus resultados de maior identidade com sequências depositadas no banco de dados “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn33
- Tabela 2** – Halos de inibição de crescimento das estirpes de *Ralstonia* no Teste de Produção de Substâncias Antimicrobianas utilizando estirpes de PGPB.35
- Tabela 3** – Relação das amostras sequenciadas e seus resultados de maior identidade com sequências depositadas no banco de dados “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA – RNA ribossomal 16S

BLASTn – *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

Gene *rrs* – Gene que codifica o 16S rRNA

PANC – Plantas Alimentícias Não-Convencionais

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGPB – *Plant Growth-Promoting Bacteria* (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas)

q.s.p. – Quantidade suficiente para

RNA – Ácido ribonucleico

RSSC – *Ralstonia solanacearum species complex*

SAMs – Substâncias Antimicrobianas

TBE – Tris, Ácido Bórico e EDTA

UV – Ultravioleta

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA LEIGOS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Capuchinha, uma Planta Alimentícia não Convencional	17
1.2. A Microbiota Vegetal.....	19
1.3. A Rizosfera.....	20
1.4. Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (PGPB)	20
1.5. O Fitopatógeno <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS GERAIS	26
3.1 Objetivos Específicos.....	26
4. METODOLOGIA	27
4.1. Amostragem.....	27
4.2. Isolamento de <i>Ralstonia solanacearum</i> da região rizosférica de capuchinhas potencialmente infectadas	28
4.3. Desinfecção das raízes de capuchinhas potencialmente infectadas para isolamento de <i>Ralstonia solanacearum</i> da região endofítica.....	29
4.4. Extração do DNA das possíveis estirpes de <i>Ralstonia solanacearum</i> selecionadas.....	29
4.5. Sequenciamento de parte do gene <i>rrs</i> das possíveis estirpes de <i>Ralstonia</i> selecionadas.....	30
4.6. Testes de antagonismo in vitro entre PGPB rizosféricas e duas estirpes de bactérias do gênero <i>Ralstonia</i>	30
4.6.1. Cultura Cruzada.....	31
4.6.2. Teste de produção de substâncias antimicrobianas	31
4.7. BOX-PCR.....	32
4.8. Sequenciamento de parte do gene <i>rrs</i> das estirpes selecionadas	32
4.9. Análise filogenética.....	33
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Isolamento e Identificação de estirpes de <i>Ralstonia</i>	33
5.2. Testes de cultura-cruzada	34
5.3. Testes de Produção de Substâncias Antimicrobianas	35
5.4. BOX-PCR.....	37

5.5. Identificação das estirpes selecionadas.....	38
5.6. Análise Filogenética.....	39
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9. ANEXOS	47

1. Introdução

1.1. Capuchinha, uma Planta Alimentícia não Convencional

Em 2022, a população mundial oficialmente atingiu 8 bilhões de habitantes (United Nations, 2022). Essa superpopulação observada gera grandes demandas para a produção alimentícia em nível global. Além disso, a problemática é acentuada pelos desafios enfrentados na agricultura atualmente; por exemplo, a utilização de agrotóxicos poluentes e prejudiciais à saúde humana. É necessário alimentar a população de forma nutritiva, sustentável e viável economicamente.

Nesse sentido, vê-se como opção promissora a expansão do uso das Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANC), plantas que apresentam uma ou mais partes comestíveis, porém não participam da dieta convencional da população. Estudos apontam que aproximadamente 90% das espécies de PANC, como a capuchinha e a ora-pro-nóbis, apresentam elevada composição nutricional. Além disso, essas espécies se desenvolvem facilmente por toda a América do Sul, sendo amplamente distribuídas pelo continente. Ademais, pesquisas de análise sensorial realizadas em todo o país mostram muita aceitação aos sabores de diversas PANC. Dessa forma, vê-se que as PANC possuem potencial para a diversificação da alimentação da população e seu cultivo sustentável deve ser impulsionado. Diversas espécies da flora brasileira são consideradas PANC e o potencial econômico, nutricional e medicinal dessas plantas precisa ser mais explorado (Silva *et al.*, 2018; Ebert *et al.*, 2021).

A capuchinha, nome popularmente utilizado para a planta alimentícia não convencional *Tropaeolum majus* L., é uma hortaliça originária das regiões dos Andes que pertence à família das Tropeoláceas. Suas folhas são arredondadas e planas, as florações são de coloração amarela, laranja ou vermelha, e a planta pode chegar a até 2 a 3 metros de comprimento e 30 a 40 centímetros de altura (Figura 1).

Todas as partes da capuchinha são comestíveis. Suas folhas, assim como as flores, botões e brotos, podem ser consumidas cruas, como salada ou transformadas em pesto de capuchinha, misturadas a massas e omeletes. Já os botões e brotos podem virar conserva e as flores colorir a comida. Com seus tons de amarelo, laranja e vermelho, torna-se atrativa para composição visual de pratos na gastronomia. Apesar do recente destaque na gastronomia contemporânea, a capuchinha já vem sendo consumida por povos tradicionais da América do Sul (Bazylo *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2020; Ebert *et al.*,

2021).

Esta planta também é procurada por suas propriedades medicinais, sendo conhecida popularmente por possuir atividades expectorantes. Segundo diversos estudos, a característica medicinal da capuchinha deve-se à presença de compostos bioativos de atividade antioxidante e anti-inflamatória. De acordo com Souza e colaboradores (2020), as capuchinhas com flores de coloração vermelha apresentam maior atividade antioxidante por possuírem maior concentração de antocianinas. Entre as principais antocianinas encontradas na capuchinha estão o pelargonidina-3-glicosídeo e a quercina (Souza *et al.*, 2020).

No que diz respeito ao seu cultivo, a capuchinha é considerada uma planta anual, subtropical e de fácil alastramento. Desde que irrigada corretamente, o cultivo pode ser durante todo o ano, com preferência a locais parcialmente sombreados. O seu plantio, assim como feito para outras PANC, é realizado principalmente por agricultores familiares, que praticam a agricultura orgânica e/ou a agricultura urbana (Ebert *et al.*, 2021). Além disso, a capuchinha também apresenta potencial para o plantio em consórcio. Segundo estudo realizado por Moraes (2008), uma maior produção de cabeças de repolho foi observada plantado em consórcio com capuchinha, em comparação com a região de monocultura do plantio. Com isso, a pesquisa acerca de formas sustentáveis de promover plantações de plantas alimentícias é de interesse biotecnológico mundial.



Figura 1 – Na foto, capuchinha de cor vermelha. As folhas da planta são arredondadas e planas, e as flores podem apresentar colorações de amarelo ao vermelho. Fonte: Herbário da UniRio <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/tropaeolum-majus-l>

1.2. A Microbiota Vegetal

A microbiota de um organismo compõe todos os fungos, bactérias, protozoários e vírus que o habitam. No que diz respeito às plantas, a microbiota pode ser dividida em três grupos, sendo eles os microrganismos da superfície da planta (epifíticos), os microrganismos do solo aderido à raiz (rizosféricos) e os microrganismos dos tecidos internos da planta (endofíticos). É observado que a comunidade microbiana de plantas é majoritariamente composta por espécies fúngicas e bacterianas. A presença de vírus e de protozoários também é explorada. (Santos e Olivares, 2021).

A composição microbiana das plantas é variável entre os nichos epifítico, rizosférico e endofítico. No ambiente endofítico são predominantes bactérias dos filos Proteobacteria e Firmicutes e, em menor quantidade, bactérias do filo Bacteroidetes. Já a comunidade epifítica é composta majoritariamente de bactérias do filo Proteobacteria, representando 50% da comunidade bacteriana desse nicho. Nesta comunidade é também observado os filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinomycetes. Por sua vez, o solo rizosférico é dominado principalmente pelos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria. Em relação à comunidade fúngica em plantas, encontram-se os filos Ascomycetes e Basidiomycetes em todos os nichos (Trivedi *et al.*, 2020).

A colonização dos microrganismos na planta é complexa e ocorre por diversas formas. A primeira forma de transmissão de microrganismos é a transmissão vertical, na qual microrganismos da planta progenitora são transmitidos à semente. Com a germinação da planta, a microbiota originária da semente se estabelece nos tecidos vegetais acima do solo.

A colonização microbiana na raiz acontece por meio da transmissão horizontal, no qual microrganismos do solo se locomovem, por meio de flagelos, ao sistema radicular a partir da percepção quimiotática de exsudatos da raiz (Santos e Olivares, 2021).

A íntima relação entre plantas e seus microrganismos hospedeiros levou a definição da planta como um organismo holobionte. Esse conceito foi definido pela primeira vez em 1991 por René Fester e Lynn Margulis e expandido em 2008 por Zilber-Rosenberg e Rosenberg. Zilber-Rosenberg e Rosenberg discorreram que o conceito de holobionte depende também do estudo das funções realizadas pelos microrganismos que compõem a microbiota e suas inter-relações (Margulis e Fester, 1991; Zilber-Rosenberg e Rosenberg, 2008). Alguns microrganismos que compõem a fitomicrobiota estão associados à realização de funções fundamentais para a sobrevivência da planta, como a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de minerais insolúveis. A coevolução

entre planta e microrganismos, por consequência, deu origem a complexas cascatas sinalizadoras entre plantas e microrganismos. Por exemplo, exsudatos da raiz recrutam microrganismos benéficos à planta, o que é explorado nos tópicos a seguir (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2015; Cesaro *et al.*, 2021; Lyu *et al.*, 2021).

1.3. A Rizosfera

A rizosfera é definida como a área do solo que sofre grande influência da liberação de substâncias pela raiz da planta. Essas substâncias são majoritariamente compostos orgânicos que tornam o solo rizosférico rico em fontes de carbono, o que faz a atividade microbiana dessa área ser até 50 vezes maior que no solo não influenciado pela raiz. Entre os organismos encontrados na rizosfera, destacam-se as bactérias. Estima-se que até 15% da superfície total das raízes sejam cobertos por diversas estirpes bacterianas. Além das bactérias, fungos, nematóides, protozoários e microartrópodes são alguns dos organismos encontrados nesse microambiente. Esse contato próximo entre microrganismos e a planta, que ocorre através da raiz, acarreta a troca de substâncias que impacta a planta hospedeira e seus microrganismos associados (Das *et al.*, 2021).

Os exsudados radiculares podem ser categorizados pelo seu peso molecular. Entre os de baixo peso molecular estão os componentes solúveis em água, como carboidratos simples, fitormônios, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, e outros metabólitos secundários à base de carbono. Já os de alto peso molecular são, em sua maioria, enzimas e polissacarídeos que formam a mucilagem, uma secreção vegetal que possui função protetora na raiz. Ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos são exsudatos radiculares essenciais para o recrutamento de bactérias do solo à rizosfera através da quimiotaxia bacteriana (Das *et al.*, 2021; Volpiano *et al.*, 2022).

A partir do recrutamento de espécies bacterianas, em troca do fornecimento de um microambiente altamente nutritivo, as plantas se associam a microrganismos capazes de realizar funções essenciais para a subsistência vegetal. Entre algumas dessas funções realizadas pelas bactérias rizosféricas incluem-se a solubilização de fosfato, a liberação de compostos antimicrobianos que inibem fitopatógenos e a indução de crescimento da planta (Pathania *et al.*, 2020). Por essas características que melhoram a saúde e o crescimento vegetal, essas bactérias são chamadas de Bactérias Promotoras de Crescimento (PGPB - *Plant Growth Promoting Bacteria*).

1.4. Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (PGPB)

As bactérias podem interagir com plantas de forma negativa (por exemplo, os fitopatógenos), de maneira neutra ou benéfica. As PGPB são bactérias benéficas associadas a plantas que favorecem o desenvolvimento da planta e/ou promovem proteção contra fitopatógenos por meio da produção de compostos bioativos, como substâncias antimicrobianas (Pathania *et al.*, 2020).

A promoção de crescimento vegetal por PGPB pode ocorrer por mecanismos diretos e indiretos. Como mecanismos diretos, é possível citar processos como a fixação do nitrogênio atmosférico, a solubilização e a mineralização de fosfato e a produção e liberação de sideróforos. A fixação biológica de nitrogênio é o processo, realizado por bactérias e arqueias, de redução do nitrogênio atmosférico em amônia. O nitrogênio atmosférico é a forma de nitrogênio mais abundante na natureza, porém, a maior parte dos organismos vivos é incapaz de utilizá-lo no seu metabolismo. Por isso, a fixação biológica de nitrogênio é um processo de grande importância, já que todos os organismos necessitam de nitrogênio para metabolização de proteínas e bases nitrogenadas. Portanto, a partir da presença dessas PGPB fixadoras de nitrogênio, aumenta-se o teor de nitrogênio assimilável pelas plantas no solo, assim, contribuindo para o desenvolvimento vegetal. Algumas PGPB fixadoras de nitrogênio já foram documentadas em estudos, entre elas encontram-se bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, entre outras (Prashar, Kapoor e Sachdeva, 2014; Lindström e Mousavi, 2020).

Para as plantas, o fósforo (P) é um nutriente importante por participar da composição de ácidos nucleicos, adenosina trifosfato (ATP), fosfolipídeos e por ser um elemento essencial na fotossíntese. No solo, o fósforo pode ser encontrado na sua forma orgânica (Po) ou inorgânica (Pi). Ademais, o P pode ser caracterizado por sua capacidade de ser adsorvido por plantas, o que é chamado de labilidade (Billah *et al.*, 2019). Formas que são de fácil adsorção pela planta, chamadas de lábeis, são formas solúveis ou associadas a elementos de baixa energia de ligação. As formas chamadas de não-lábeis, ou seja, de difícil adsorção vegetal, compreendem formas sólidas como a apatita e apresentam maior energia de ligação. Por meio do uso de fertilizantes, formas solúveis de P são adicionadas ao solo, porém, devido à alta reatividade desse elemento, este rapidamente se associa com outros componentes do solo, como o ferro e o alumínio, formando compostos pouco solúveis. Dessa forma, grande parte do investimento em fertilizantes a base de fósforo é retida no solo e não adsorvida pelas plantas (Fonseca,

2020).

Visto que grande parte do P presente no solo não é biodisponível às plantas, estudos demonstram que algumas bactérias presentes no solo e na rizosfera possuem mecanismos que tornam este elemento disponível à adsorção vegetal. No caso do Po, a sua disponibilização ocorre por meio da mineralização, que é a hidrólise enzimática realizada por enzimas fosfomonoesterases de ligações com grupos orgânicos. Diversos microrganismos do solo podem liberar fosfomonoesterases contribuindo para o processo de mineralização, por exemplo, estirpes bacterianas dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Enterobacter*, entre outras. No que diz respeito ao Pi, a liberação de P ocorre de uma forma não-enzimática a partir das bactérias solubilizadoras de fosfato, que são capazes de disponibilizar formas insolúveis de Pi por meio da liberação de ácidos orgânicos como o ácido glucônico. Entre alguns dos gêneros bacterianos com estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato encontram-se *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia* (Souza, Ambrosini e Passaglia, 2015; Billah *et al.*, 2019; Fonseca, 2020).

No que diz respeito à produção de sideróforos, sabe-se que o ferro é o quarto elemento em maior abundância na terra. Apesar disso, sua forma mais abundante, o ferro ferroso (Fe^{3+}), não é facilmente assimilado por plantas ou por bactérias. Dessa forma, certas bactérias produzem moléculas de baixo peso molecular e alta afinidade por Fe^{3+} , chamadas sideróforos. Além disso, essas bactérias possuem receptores de membrana especializados na ligação entre sideróforo e Fe^{3+} , assim tornando possível a internalização do ferro. Diversas plantas conseguem realizar ligações moleculares entre o complexo sideróforo- Fe^{3+} produzidos pelas PGPB e, assim, internalizar e utilizar o ferro (Souza, Ambrosini e Passaglia, 2015, Das *et al.*, 2021).

A produção de sideróforos pode também ser considerada um método indireto de promoção de crescimento vegetal. Isso porque as PGPB produtoras de sideróforos podem internalizar o ferro disponível do solo, limitando a disponibilidade desse nutriente e assim limitando a proliferação de microrganismos patogênicos que não possuam esse mecanismo. Alguns exemplos de gêneros bacterianos já encontrados na literatura com estirpes produtoras de sideróforos são os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Rhodococcus* e *Acinetobacter* (Arya *et al.*, 2018).

Além da produção de sideróforos, já foram estudados outros mecanismos indiretos de promoção vegetal, como a produção de antibióticos, a produção de enzimas líticas e a indução de resistência sistêmica. As PGPB podem levar a indução de resistência sistêmica nas plantas por meio da produção de compostos, como o ácido indolilacético, que são

reconhecidos por receptores vegetais. Com esse desse reconhecimento, cascatas sinalizadoras das vias do etileno e do ácido jasmônico são ativadas. A partir disso, ocorre a expressão de genes que induzem a resistência sistêmica da planta, assim reduzindo a gravidade e a incidência das fitopatologias.

Acerca da produção dos compostos antimicrobianos, já foram caracterizadas diversas substâncias produzidas por PGPB. Entre elas, por exemplo, encontram-se quitinases, proteases, celulases, lipases e beta-1,3 glucanases, capazes de lisar parte da parede celular de fungos fitopatogênicos. A produção dessas enzimas por PGPB são eficazes contra vários fungos fitopatogênicos, entre eles, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* (Souza, Ambrosini e Passaglia, 2015; Pathania *et al.*, 2020).

O fato de as PGPB favorecerem a saúde e a nutrição da planta por meio dos mecanismos anteriormente citados é de extrema importância para a agricultura já que a aplicação de fertilizantes químicos e agrotóxicos são as atuais opções de aplicação em terras agrícolas para potencialização da nutrição vegetal e controle de fitopatologias. A utilização descontrolada de agrotóxicos gera consequências ambientais como a contaminação dos solos, a poluição de corpos d'água, e a dependência do solo aos fertilizantes. Essa dependência não é só economicamente custosa, como também leva a riscos para a saúde humana através da contaminação química dos alimentos. A possibilidade da utilização de PGPB para facilitar a aquisição de nutrientes pelas plantas, aliando-se com a produção de substâncias antimicrobianas, torna as PGPB grandes atrativos para sua aplicação biotecnológica em campo através da produção de bioinoculantes (Santos e Olivares, 2021).

1.5. O Fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*

A espécie *R. solanacearum* é composta por bactérias Gram-negativas que podem causar uma fitopatologia popularmente conhecida como murcha-bacteriana. A diversidade genética das espécies de *R. solanacearum* é tão significativa que as estirpes bacterianas isoladas formam um complexo de espécies, o RSSC (*Ralstonia solanacearum species complex*). Esse complexo de espécies é dividido em seis biovars e cinco raças. A divisão em raças é dada pela capacidade da estirpe de infectar determinados hospedeiros vegetais, enquanto a divisão em biovars é determinada pela capacidade do isolado oxidar álcoois e dissacarídeos. (Lowe-Power *et al.*, 2022). A fitopatologia causada por RSSC afeta cerca de 200 espécies de plantas e é encontrada no Brasil

principalmente nos plantios de tomate, pimentão, batata, banana, tabaco e eucalipto (Lopes e Rosatto, 2018).

A disseminação de RSSC nas plantas pode ocorrer de diversas maneiras, através de águas pluviais e/ou da utilização de ferramentas de jardinagem contaminadas. A colonização de RSSC na planta se inicia pela raiz utilizando-se fatores de adesão bacterianos como pilus e flagelo, ou os lipopolissacarídeos da membrana que permitem a formação do biofilme bacteriano na raiz (Li *et al.*, 2014). Essa adesão ocorre principalmente em regiões de alongamento e ramificação da raiz, que são regiões com barreira epidérmica mais fina e onde ocorre maior liberação de exsudatos radiculares que facilitam a infecção pelo fitopatógeno (Romantschuk, 1992; Yuliar e Toyota, 2015).

Em uma etapa posterior, o fitopatógeno consegue penetrar o xilema por meio da secreção de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular da planta. No interior dos vasos da planta, a bactéria se multiplica, produz exopolissacarídeos e gera uma massa celular que obstrui o sistema vascular da planta. Assim, estirpes do RSSC impedem o transporte de água e de nutrientes pela planta. A partir dessa obstrução, são apresentados os principais sintomas da murcha-bacteriana: a murcha e o amarelamento das folhas (Figura 2) (Lowe-Power, Khokhani e Allen, 2018).

A murcha-bacteriana é uma doença de difícil controle pois as estirpes de *R. solanacearum* possuem uma grande variabilidade genética, se disseminam rapidamente por diferentes veículos e infectam diversas espécies de plantas, incluindo as ervas-daninhas, comuns em plantações e servem como hospedeiras do fitopatógeno. Além disso, *R. solanacearum* é capaz de sobreviver no solo mesmo sem a presença de hospedeiros e pode assumir um estado de latência que ocorre em bactérias não-esporulantes chamado de “viável, mas não cultivável”. Neste caso, a célula encontra-se metabolicamente ativa, porém não é cultivável em meios de cultura. Esse estado é vantajoso ao fitopatógeno e permite a sobrevivência em ambientes desfavoráveis. Dessa forma, o solo agrícola colonizado por *R. solanacearum* pode perpetuar a doença em plantios futuros, mesmo após a remoção das plantas doentes (Hayward, 1991; Grey e Steck, 2001).

Na tentativa de controlar a doença, agricultores aplicam métodos como: (i) utilização de compostos químicos, por exemplo, o hidróxido de cobre; (ii) a rotação de culturas e (iii) a solarização, uma forma de controle da temperatura do solo a partir da cobertura deste com um filme plástico. Entretanto, nenhum desses métodos se mostra

suficientemente eficaz (Yuliar e Toyota, 2015). Portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias de controle se torna cada vez mais necessárias à agricultura.

Uma alternativa aos métodos de controle já utilizados é o controle biológico, que consiste na introdução de um predador natural contra pragas e/ou microrganismos que prejudicam e adoecem plantações. No que diz respeito à *R. solanacearum*, um microrganismo, ou consórcio de microrganismos, produtores de substâncias antimicrobianas poderiam formular um bioinoculante capaz de inibir o crescimento do fitopatógeno. Isso pode ser possível por meio da introdução do bioinoculante na rizosfera da planta, que é o ambiente de adesão do fitopatógeno *R. solanacearum*. Assim, a produção de possíveis substâncias antimicrobianas por este(s) microrganismo(s) poderia acarretar na inibição da colonização do fitopatógeno em seu micro-habitat e, conseqüentemente, na evolução de uma fitopatologia (Köhl, Kolnaar e Ravensberg 2019).



Figura 2 – Fotos retiradas de acervo pessoal. Na imagem, capuchinha doente na casa de vegetação do Centro de Ciências da Saúde – UFRJ. Vê-se a murcha da flor, na seta em azul, assim como o amarelamento das folhas, nas setas em vermelho

2. Justificativa

A bactéria fitopatogênica *R. solanacearum* causa uma doença popularmente conhecida como murcha-bacteriana que pode afetar mais de 200 espécies de plantas diferentes. Os sintomas apresentados pelas plantas infectadas incluem a murcha e amarelamento das folhas e o apodrecimento das raízes da planta. Essa doença é de difícil controle pela grande variabilidade genética das estirpes de *R. solanacearum* e por se disseminar rapidamente entre diversas espécies de plantas. Diversos métodos são

utilizados na tentativa de controlar a disseminação da doença, como a aplicação do agrotóxico hidróxido de cobre, mas nenhum dos métodos se mostra suficientemente eficaz. Portanto, o desenvolvimento de um bioinoculante a partir de um consórcio de estirpes bacterianas promotoras de crescimento de plantas se apresenta como uma alternativa para o controle da fitopatologia (Yuliar e Toyota, 2015; Lopes e Rosatto, 2018; García, Kerns e Thiessen, 2019).

Em um estudo realizado anteriormente no laboratório (Dal’Rio, 2021), foram isoladas do interior das raízes (região endofítica) da planta *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) 245 estirpes bacterianas produtoras de substâncias antimicrobianas (SAMs). Além disso, foi observada a presença de sintomas característicos da fitopatologia causada por RSSC nas plantas de capuchinha utilizadas no estudo. Portanto, foi levantada a hipótese de que as estirpes PGPB produtoras de SAM poderiam ser testadas para uma possível aplicação nas capuchinhas doentes. Dessa forma, se fez necessário realizar o isolamento de possíveis estirpes de *R. solanacearum* das plantas de capuchinha e, posteriormente, realizar testes de antagonismo *in vitro* utilizando as PGPB previamente isoladas. Assim, será possível a seleção de estirpes PGPB com atividade contra *R. solanacearum* para futuros testes *in vivo* e para o potencial desenvolvimento de um bioinoculante.

3. Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo testar *in vitro* as bactérias promotoras de crescimento de plantas previamente isoladas da rizosfera da capuchinha contra estirpes possivelmente pertencentes à espécie *Ralstonia solanacearum*. Posteriormente, selecionar e identificar molecularmente as que apresentarem atividade antagonista ao fitopatógeno.

3.1 Objetivos Específicos

(i) Coletar as raízes de plantas de capuchinha (*Tropaeolum majus*) que apresentam sintomas característicos de murcha bacteriana;

(ii) Isolar e identificar possíveis estirpes de *Ralstonia solanacearum* das regiões rizosférica e endofítica da raiz das plantas coletadas;

(iii) Utilizar as possíveis estirpes de *R. solanacearum* em testes de antagonismo com PGPB previamente isoladas da região rizosférica da capuchinha;

(iv) Identificar as estirpes rizosféricas com possível atividade antagonista a possíveis estirpes de *R. solanacearum* através do sequenciamento de parte do gene *rrs* (que codifica para o 16S rRNA).

4. Metodologia

4.1. Amostragem

O Laboratório de Genética Microbiana compartilha uma casa de vegetação com outros laboratórios do Centro de Ciências da Saúde. Nessa casa de vegetação, o grupo mantém capuchinhas para diversos estudos. Cinco destas plantas foram selecionadas por apresentarem sintomas característicos da doença causada por *R. solanacearum*, como a necrose na base da planta e a murcha e amarelamento das folhas. Essas plantas passaram por um teste inicial que sugere a infecção por *R. solanacearum*, conforme descrito por García, Kens e Thiessen (2019). Para isso, caules recentemente cortados das capuchinhas potencialmente infectadas foram inseridos em um tubo de ensaio com água destilada. Após aproximadamente 10 minutos, foi observada a liberação de um líquido branco e viscoso pelo caule (Figura 3). A liberação desse líquido sugere a colonização de *R. solanacearum* no sistema vascular da planta. Posteriormente, as raízes das plantas testadas foram coletadas para o isolamento de possíveis estirpes de *R. solanacearum* da região endofítica e rizosférica.

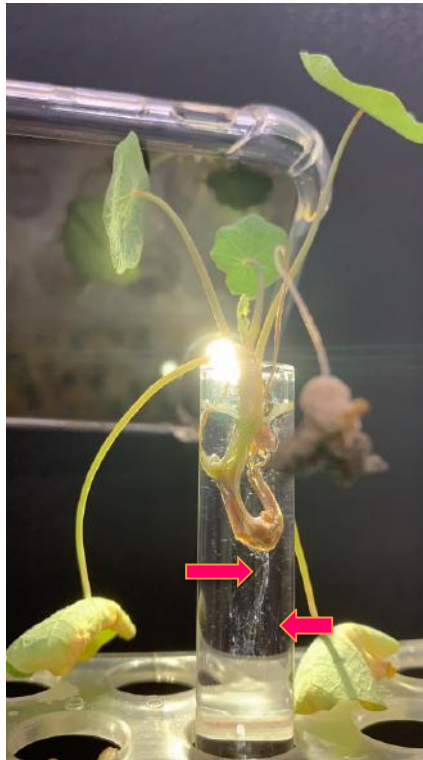


Figura 3 - Teste inicial realizado em caule de capuchinha. Na direção das setas em rosa, a secreção de muco comumente produzido por *Ralstonia*. Foto retirada de acervo pessoal.

4.2. Isolamento de *Ralstonia solanacearum* da região rizosférica de capuchinhas potencialmente infectadas

Aproximadamente 10g de raízes foram coletadas de cada uma das 5 plantas de capuchinha potencialmente infectadas por *R. solanacearum*. Essas raízes foram inseridas em Erlenmeyers acrescidos de 15ml de salina estéril (0,85%) e incubados sob agitação (100rpm) a 28°C por uma hora. Com auxílio de uma pinça estéril, as raízes foram separadas do restante do lavado para desinfecção e isolamento de bactérias endofíticas. Em seguida, o líquido resultante (contendo o solo rizosférico) foi submetido a diluições sucessivas (10^0 a 10^{-6}) também com salina estéril (0,85%). Uma alíquota de 100 μ l de cada diluição foi semeada em meio seletivo para *Ralstonia solanacearum* SMSA-E (Elphinstone *et al.*, 1996) e incubadas a 32°C por até 5 dias. Todas as sementeiras foram realizadas em triplicata (Figura 4A). Posteriormente ao período de incubação, foram selecionadas as colônias que apresentaram a morfologia colonial descrita em 2013 por Milijašević-Marčić e colaboradores (colônias brancas, leitosas, irregulares e avermelhadas no centro). A seguir, as estirpes selecionadas passaram pela técnica de coloração de Gram e as bactérias Gram-negativas foram utilizadas para extração do DNA para a realização da sua identificação molecular.

4.3. Desinfecção das raízes de capuchinhas potencialmente infectadas para isolamento de *Ralstonia solanacearum* da região endofítica

Foram utilizadas 5g das raízes, previamente separadas do restante do lavado, de cada uma das 5 plantas de capuchinha potencialmente infectadas por *R. solanacearum*. O processo de desinfecção das raízes foi realizado por exposição à luz UV por 40 minutos, seguido de imersão em álcool 70% por 4 minutos sob agitação (100rpm) e imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 5 minutos sob agitação (100rpm). Ao final, foram realizadas três lavagens subsequentes com água destilada estéril sob agitação (100rpm) por 10, 5 e 3 minutos.

Posterior ao processo de desinfecção, as raízes de cada uma das 5 plantas foram maceradas individualmente com 5ml de água destilada estéril em um pilão estéril. Cada um dos macerados foi diluído sucessivamente (10^0 a 10^{-6}) em salina estéril e 100 μ l de cada diluição foram semeados em meio seletivo SMSA-E (Elphinstone *et al.*, 1996) em triplicata. As placas foram incubadas por um período de até 5 dias a 32°C. Após o período de incubação, as colônias foram selecionadas conforme descrito no item 4.2. (Figura 4B)

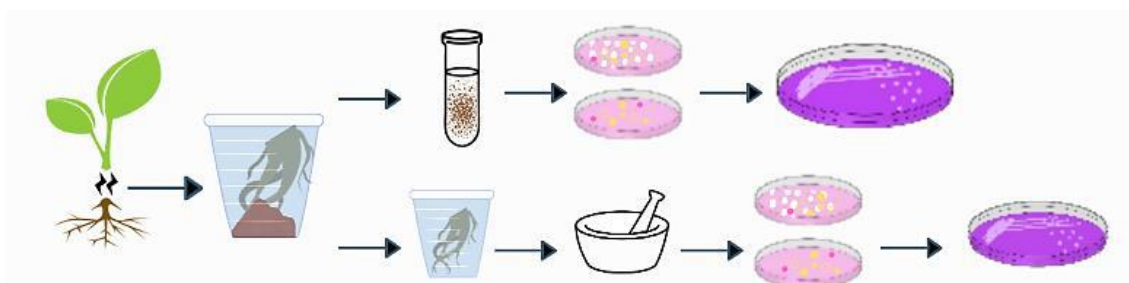


Figura 4 - - Esquema representativo do processamento de raízes para isolamento de *R. solanacearum* em meio seletivo SMSA-E. A parte “A” da figura representa o esquema do isolamento de estirpes rizoféricas, conforme descrito no tópico 4.2. A parte “B” representa o isolamento de estirpes endofíticas conforme descrito em 4.3.

4.4. Extração do DNA das possíveis estirpes de *Ralstonia solanacearum* selecionadas

As estirpes endofíticas e rizoféricas Gram-negativas com morfologia colonial similar ao descrito para *R. solanacearum* por Milijašević-Marčić e colaboradores (2013) foram submetidas à extração do DNA utilizando o kit comercial “ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™” (Zymo Research Corporation, EUA). O DNA resultante foi

quantificado (ng/ μ l) por fluorescência utilizando-se o Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific™, MA, EUA). Ainda, a integridade do DNA foi verificada através de uma eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo SYBR™ Safe DNA Gel Stain (3%), preparado em tampão TBE 1X (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989) por 2 horas a 80V. Ao final da corrida, o gel foi observado e documentado utilizando o aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System com o auxílio do software Image Lab™.

4.5. Sequenciamento de parte do gene *rrs* das possíveis estirpes de *Ralstonia* selecionadas

Após a etapa de extração do DNA das possíveis estirpes isoladas de *R. solanacearum*, estas foram identificadas através do sequenciamento de parte do gene *rrs* (que codifica o 16S rRNA). Foram realizadas reações de PCR empregando-se os iniciadores universais pA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'), conforme descrito por Massol-Deya e colaboradores (1995). Cada reação foi realizada em um volume final de 100 μ l em um tubo contendo tampão de PCR 5X da Promega® na concentração de 1X, 1,5mM de MgCl₂, 1mM de dNTP, 1 μ M de cada iniciador, 2,5U de *Taq* DNA polimerase, 1 μ l (50 a 100 ng) de DNA e água MilliQ estéril q.s.q. 100 μ l. O ciclo aplicado foi: 1X (2min a 94°C); 35X (1min e 10seg a 94°C; 30seg a 48°C; 2min e 10seg a 72°C); 1X (2min a 72°C); 4°C. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, EUA).

Os produtos da PCR foram enviados para a Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador automático SeqStudio™ (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific™).

4.6. Testes de antagonismo *in vitro* entre PGPB rizosféricas e duas estirpes de bactérias do gênero *Ralstonia*

Um total de 245 estirpes bacterianas foram isoladas da rizosfera da capuchinha (*Tropaeolum majus*) em trabalho realizado anteriormente no Laboratório de Genética Microbiana (Dal’Rio, 2021). No presente trabalho, essas estirpes passaram por testes de antagonismo contra duas estirpes de *Ralstonia* isoladas da raiz de capuchinhas doentes com sintomas de murcha-bacteriana.

4.6.1. Cultura Cruzada

O método *cross-culture* (cultura cruzada) foi o teste utilizado para a avaliação inicial do antagonismo das estirpes PGPB rizosféricas contra as duas estirpes de *Ralstonia* isoladas da capuchinha. Para a realização desse método, a estirpe de *Ralstonia* indicadora foi semeada em linha reta vertical em meio de cultura sólido CPG (*Casamino acid-Peptone-Glucose*; Cao *et al.*, 2018). Depois, de forma horizontal à primeira linha, as estirpes bacterianas a serem testadas foram também semeadas. Após 24h de incubação a 32°C, a inibição do crescimento da estirpe de *Ralstonia* em direção aos inóculos bacterianos horizontais representava um possível antagonismo (Figura 5).

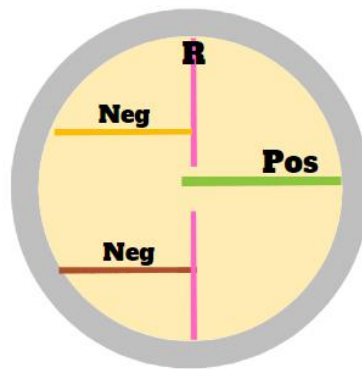


Figura 5 - Representação do teste de cultura cruzada, onde a linha rosa “R” é a estirpe de *Ralstonia* a ser testada; as linhas horizontais “Neg” mostram um resultado negativo e a linha “Pos” mostra inibição do crescimento do fitopatógeno.

4.6.2. Teste de produção de substâncias antimicrobianas

As estirpes bacterianas que inibiram as duas estirpes de *Ralstonia* no teste de cultura cruzada foram utilizadas no teste de produção de substâncias antimicrobianas segundo a metodologia descrita em Rosado e Seldin (1993). Uma alíquota de 5µl das estirpes bacterianas foi inoculada na forma de *spot* em meio CPG (*Casamino acid Peptone-Glucose*; Cao *et al.*, 2018) e as placas foram incubadas a 32°C por 48h. Após a incubação, as células foram expostas a vapor de clorofórmio por 15min e ao ar por mais 15min. As placas foram então inoculadas com uma suspensão contendo a *Ralstonia* como indicadora (1ml de suspensão do indicador em 9 ml de meio CPG semi-sólido contendo 0,7% de ágar). Os inóculos contendo as estirpes de *Ralstonia* foram previamente preparados em meio CPG líquido por 24h a 32°C. Após a inoculação, as placas foram incubadas por 48h a 32°C. A produção de substância microbiana foi indicada pela formação de zonas de inibição do crescimento da bactéria indicadora ao redor dos *spots*.

Para a documentação, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em centímetros com auxílio de uma régua (Figura 6).

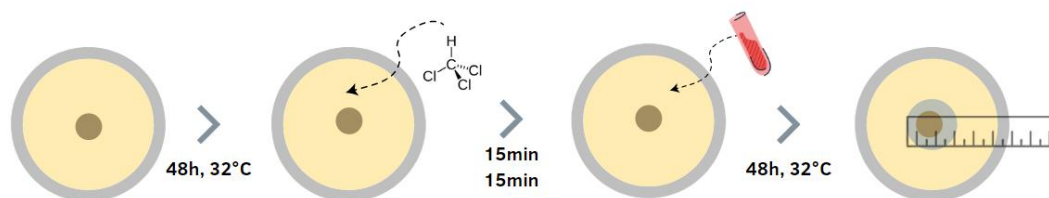


Figura 6 - Esquema representando o teste realizado para seleção de estirpes que produzem SAM contra as possíveis estirpes de *Ralstonia*

4.7. BOX-PCR

A partir da visualização de semelhança na morfologia colonial de 15 estirpes rizosféricas, foi levantada a hipótese de que estas poderiam possuir origem clonal, ou seja, serem estirpes idênticas. Estirpes bacterianas de origem clonal possuem regiões conservadas no genoma que, ao serem amplificadas, vão dar origem a um mesmo perfil de bandas. A reação de BOX-PCR permite a amplificação dessas regiões conservadas entre estirpes bacterianas, possibilitando a visualização de padrões de banda que indicam a similaridade entre estirpes. Portanto, foi realizada uma reação de BOX-PCR utilizando o iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994). Cada reação foi realizada em um volume final de 25µl em tubo contendo tampão de PCR 5X da Promega® na concentração de 1X, 3,75mM MgCl₂, 0,6mM dNTP, 1µM do iniciador, 1,25U *Taq* DNA polimerase e água MilliQ estéril q.s.p. 25µl. Uma colônia de cada uma das 15 placas de estirpes rizosféricas foi transferida diretamente para os tubos contendo a reação de PCR com auxílio de um palito estéril. Foi utilizado o seguinte ciclo: 1X (7min a 95°C); 30X (1min a 94°C; 1min a 53°C; 8min a 65°C); 1X (16min a 65°C); 4°C. Em seguida, os produtos da amplificação por PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v) preparado em tampão TBE 1X (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989) por 4 horas a 90V.

4.8. Sequenciamento de parte do gene *rrs* das estirpes selecionadas

Para a identificação molecular das estirpes produtoras de substâncias antimicrobianas foi realizado o sequenciamento de parte do gene *rrs* conforme descrito no item 4.5.

4.9. Análise filogenética

As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas através da comparação de identidades com sequências depositadas no banco de dados (“GenBank”) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) utilizando a ferramenta BLASTN (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências nucleotídicas das bactérias de maior similaridade e as sequências das estirpes bacterianas isoladas foram importadas para o programa MEGA 11 (Koichiro, Glen e Sudhir, 2021). Utilizando-se esse *software*, foi possível realizar o alinhamento das sequências por meio do método *ClustalW* (Thompson, Higgins e Gibson, 1994) e assim construir uma árvore filogenética a partir do método *Neighbor Joining*, utilizando *bootstrap* de 500.

5. Resultados

5.1. Isolamento e Identificação de estirpes de *Ralstonia*

As amostras das raízes de capuchinhas doentes foram processadas e plaqueadas em meio seletivo (*R. solanacearum* SMSA-E; Elphinstone *et al.*, 1996). A partir desse plaqueamento, foi visualizada a presença de colônias conforme à descrição de *R. solanacearum* neste meio (colônias brancas, leitosas, irregulares e avermelhadas no centro) (Figura 7). Além disso, foi utilizado o método de Coloração de Gram para confirmar a presença de bastonetes gram-negativos. As estirpes gram-negativas que apresentaram a morfologia colonial procurada foram identificadas a partir do sequenciamento de parte do gene *rrs*, conforme descrito no tópico 4.5.

Foi observada a presença de duas estirpes com identidade ao gênero *Ralstonia*. A estirpe 24A2 apresentou maior identidade com *R. solanacearum*, enquanto a estirpe 25C apresentou maior identidade com *Ralstonia pseudosolanacearum* (Tabela 1; Anexo 9.1). Sabendo que ambas as espécies fazem parte do RSSC e possuem potencial fitopatogênico, ambas as estirpes foram empregadas nos testes de antagonismo realizados no trabalho.

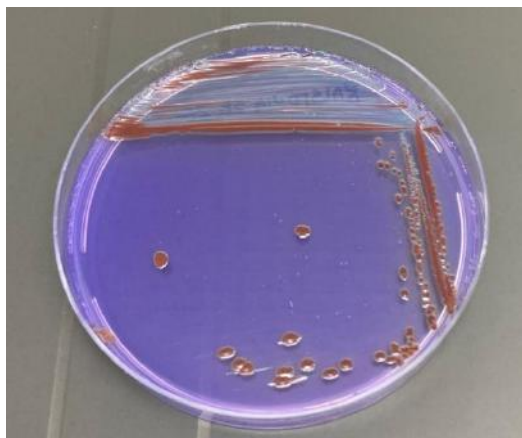


Figura 7 - Estirpe bacteriana isolada em meio SMSA-E que apresenta as características da morfologia colonial de *R. solanacearum* (colônias brancas, leitosas, irregulares e avermelhadas no centro). Imagem retirada de arquivo pessoal.

Tabela 1 – Relação das amostras de *Ralstonia* sequenciadas e seus resultados de maior identidade com sequências depositadas no banco de dados “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn

Amostra	Organismo	Identidade	Coertura	E-Value
24A2	NR_044040.1 <i>Ralstonia solanacearum</i> K60-1	98.75%	100%	0
25C	NR_134148.1 <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> UQRS 461	98.54%	100%	0

5.2. Testes de cultura-cruzada

A partir do teste de cultura cruzada, 245 estirpes rizosféricas da capuchinha que apresentam atividade PGPB (Dal’Rio, 2021) foram testadas contra as estirpes de *Ralstonia* isoladas. No total, 19 estirpes bacterianas inibiram o crescimento de ambas as estirpes - 24A2 e 25C (Figura 8).

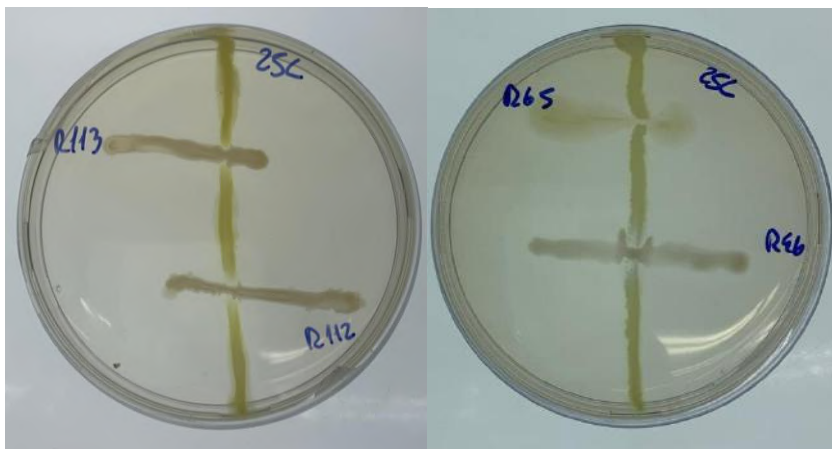


Figura 8 - Exemplos do método de cultura cruzada. Na linha vertical, a estirpe 25C e, na horizontal, estirpes rizosféricas. A interrupção do crescimento da estirpe 25C em direção às estirpes rizosféricas demonstra um possível antagonismo. Fotos retiradas do acervo pessoal.

5.3. Testes de Produção de Substâncias Antimicrobianas

As 19 estirpes bacterianas que demonstraram inibir as estirpes 24A2 e 25C no teste de cultura cruzada foram empregadas no teste de produção de substâncias antimicrobianas, conforme descrito no tópico 4.6.2. A partir desse teste, foi possível visualizar halos de inibição do crescimento das estirpes 25C e 24A2 na região do meio de cultura CPG (*Casamino acid Peptone-Glucose*) onde ocorreu a disseminação de substâncias antimicrobianas produzidas por PGPB. Os halos de inibição foram mensurados em centímetros com auxílio de uma régua (Figura 9; Tabela 2).

Tabela 2 – Halos de inibição de crescimento das estirpes de *Ralstonia* no Teste de Produção de Substâncias Antimicrobianas utilizando estirpes de PGPB

Estirpe	Tamanho do halo de inibição	
	24A2	25C
R44	++	++
R96	+++	++
R104	+	++
R112	++	++
R113	++	+
R115	++	++
R126	++	++
R144	++	+++
R148	+	++
R153	+	++
R154	+	+++
R157	++	++
R166	+	++
R221	++	++
R224	+	++
R245	+	+

As colunas mostram o tamanho aproximado dos halos de inibição do crescimento de cada estirpe de *Ralstonia* (24A2 e 25C). Para cada símbolo: + - halos de inibição (diâmetro) entre 0,5cm e 1,4cm; ++ - halos de inibição entre 1,5cm e 2,4cm; +++ - halos de inibição acima de 2,5cm.

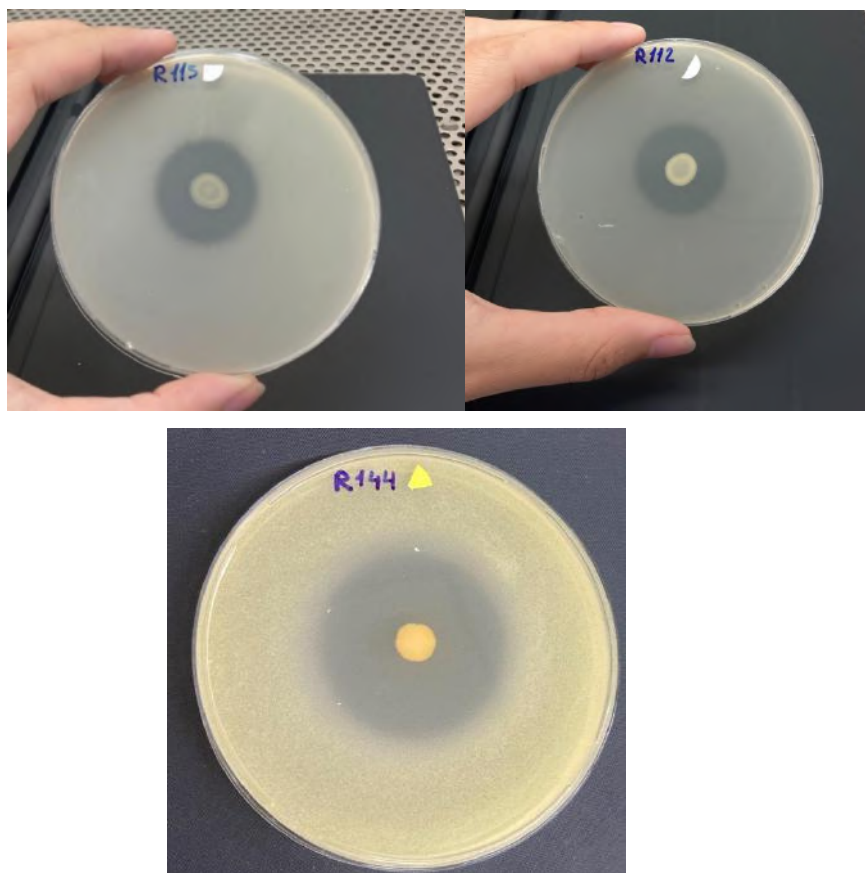


Figura 9 - Exemplos de halos de inibição obtidos após o teste de produção de substâncias antimicrobianas. Imagens retiradas do arquivo pessoal.

5.4. BOX-PCR

Para descartar possíveis estipes idênticas (de origem clonal), foi realizada uma reação de BOX-PCR utilizando o iniciador BOXA1R, conforme descrito no tópico 4.7. A estirpe R157 não foi incluída nessa reação por não apresentar semelhança na sua morfologia colonial com outros isolados. Os padrões de bandas obtidos foram analisados no *software* BIONUMERICS, gerando assim um dendrograma (Figura 10).

Considerando 70% de similaridade, as estirpes foram separadas em 7 grupos BOX: (A) R96, R113, R148, R151, R154; (B) R144, R166, R221, R104, R126; (C) R44; (D) R115; (E) R112; (F) R153; (G) R224.

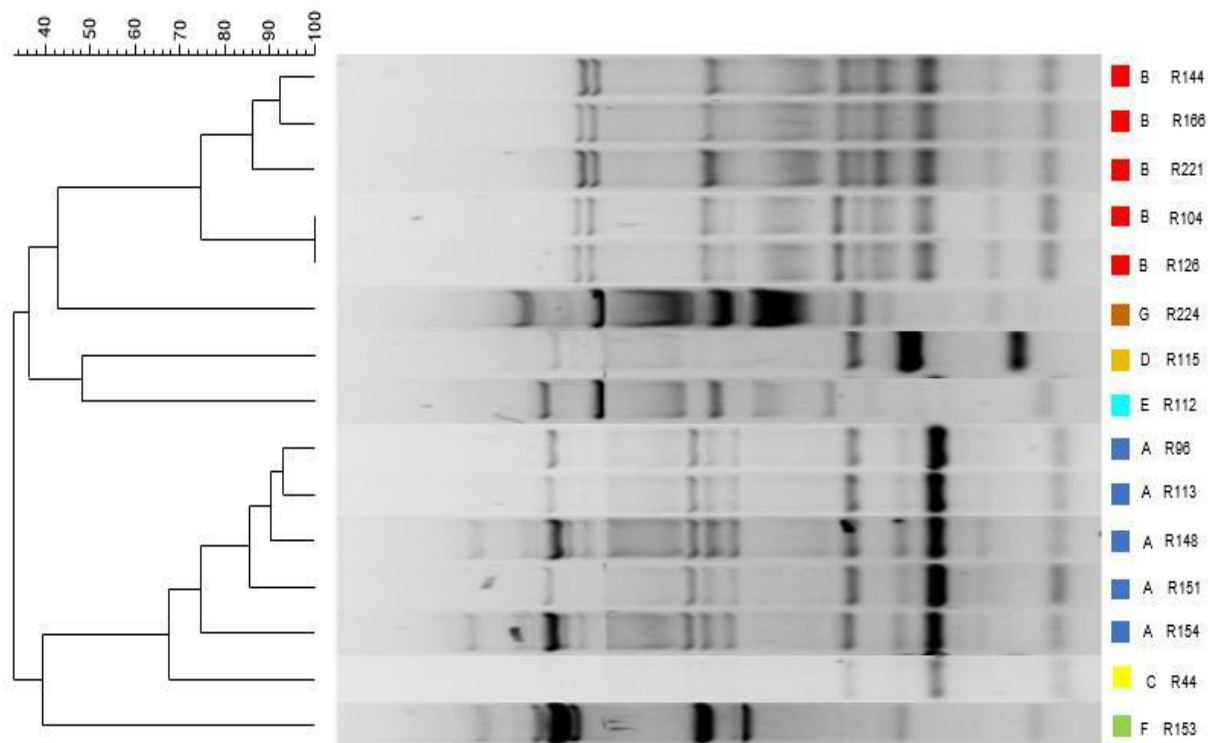


Figura 10 - Dendrograma gerado a partir de análise do gel de BOX-PCR no programa BIONUMERICS. Na imagem, padrões de bandas semelhantes foram agrupados considerando 70% de similaridade, apresentando assim 7 grupos BOX que foram nomeados de A a G

5.5. Identificação das estirpes selecionadas

Nove estirpes rizosféricas foram selecionadas para identificação molecular a partir dos seguintes parâmetros: (i) a PGPB foi capaz de inibir as duas estirpes de *Ralstonia* testadas no teste de cultura cruzada, (ii) a PGPB apresentou halos de inibição de no mínimo 0,5cm contra as duas espécies de *Ralstonia* testadas no teste de produção de SAM e (iii) pertencer a grupos BOX distintos. A identificação molecular das estirpes selecionadas foi realizada conforme descrito no item 4.5.

Uma estirpe (R157), apresentou identidade com a estirpe *Enterobacter ludwigii* EN-119. Algumas estirpes bacterianas apresentaram identidade com o gênero *Serratia*, estirpes *Serratia plymuthica* K-7, *Serratia plymuthica* NBRC 102599 e estirpe *Serratia ficaria* DSM 4569. Outras estirpes apresentaram identidade com o gênero *Pseudomonas*, estirpes *Pseudomonas synxantha* NBRC 3913, *Pseudomonas synxantha* IAM 12356, *Pseudomonas moraviensis* 1B4 e *Pseudomonas koreensis* Ps 9-14 (Tabela 3; Anexo 9.1).

Tabela 3 – Relação das amostras sequenciadas e seus resultados de maior identidade (primeiro “hit”) com sequências depositadas no banco de dados “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn

Amostra	Organismo	Identidade	Cobertura	E-Value
R157	NR_042349.1 <i>Enterobacter ludwigii</i> EN-119	99.46%	100%	0
R96	NR_037111.1 <i>Serratia plymuthica</i> K-7	99.37%	100%	0
R144	NR_041979.1 <i>Serratia ficaria</i> DSM 4569	99.59%	100%	0
R148	NR_037111.1 <i>Serratia plymuthica</i> K-7	99.59%	100%	0
R154	NR_114158.1 <i>Serratia plymuthica</i> NBRC 102599	99.49%	100%	0
R112	NR_113583.1 <i>Pseudomonas synxantha</i> NBRC 3913	99.31%	100%	0
R153	NR_043425.1 <i>Pseudomonas synxantha</i> IAM 12356	99.59%	100%	0
R224	NR_043314.1 <i>Pseudomonas moraviensis</i> 1B4	99.52%	100%	0
R245	NR_025228.1 <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14	99.38%	100%	0

5.6. Análise Filogenética

A partir dos métodos descritos no tópico 4.9, foi gerada uma árvore filogenética (Figura 11) entre as estirpes obtidas nesse estudo e suas estirpes de maior identidade no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI).

Dessa forma, as estirpes R96, R144, R148 e R154 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Serratia*. Neste grupo, as estirpes R96, R148 e R154 se agrupam com a espécie *S. plymuthica* enquanto a estirpe R144 se agrupa com a espécie *S. ficaria*. Já as estirpes R112, R153, R224, R245 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Assim, as estirpes R112 e R153 se agruparam com a espécie *P. synxantha*. As estirpes R224 e R245 se agrupam com as espécies *P. koreensis* e *P. moraviensis*. Por fim, a estirpe R157 foi identificada como pertencente ao gênero *Enterobacter*, e se agrupa com a espécie *E. ludwigii*. O gênero *Chlamydia* foi utilizado como *outgroup* na geração dessa árvore filogenética

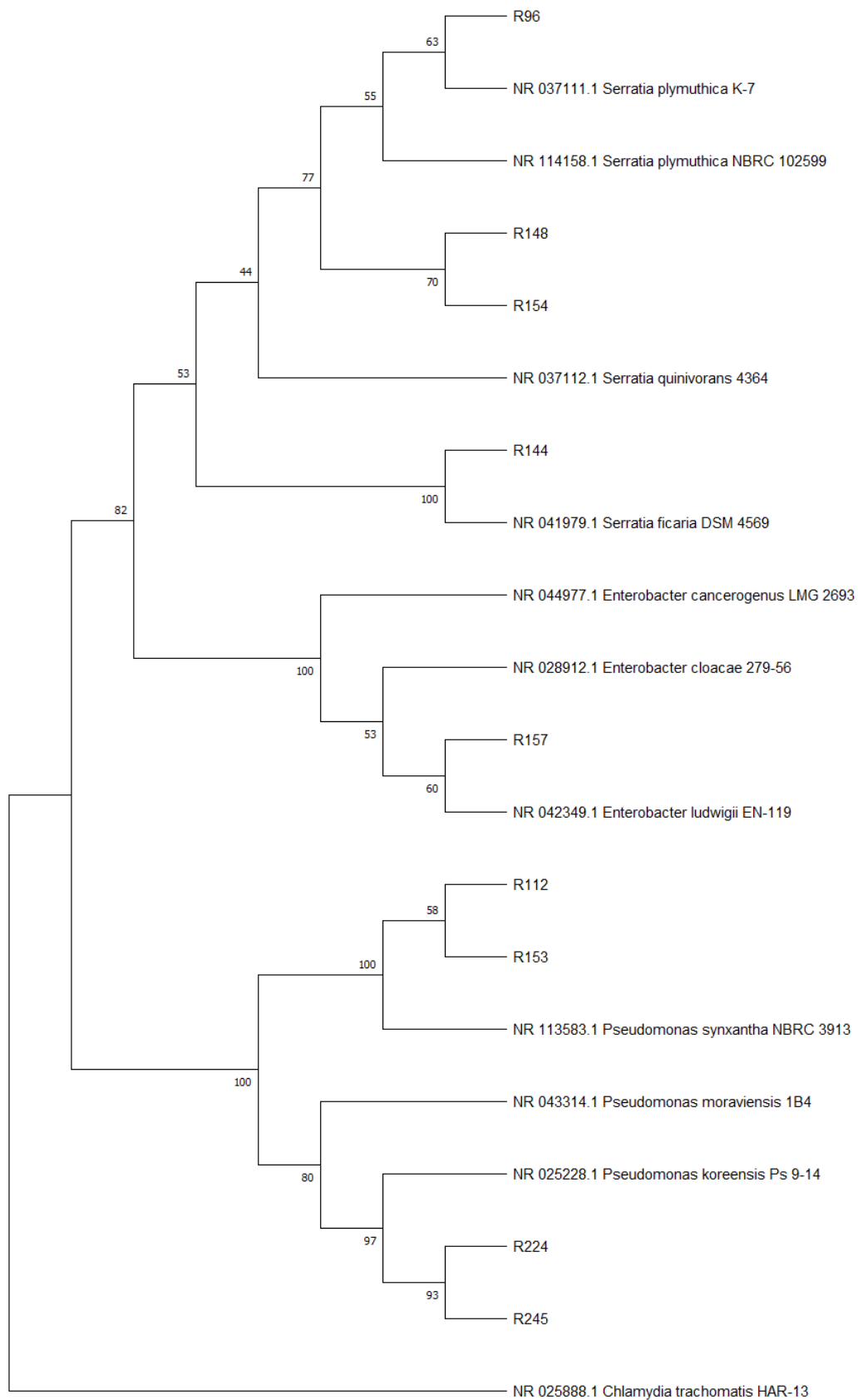


Figura 11 - Árvore filogenética gerada a partir do programa MEGA11. As estirpes foram identificadas, a partir do sequenciamento gene *rrs*, como pertencentes a três gêneros - *Serratia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*

6. Discussão

A fitopatologia causada por *Ralstonia solanacearum* é preocupante para a produção agrícola mundial. Essa bactéria se alastra rapidamente entre mais de 200 espécies diferentes de plantas, além de possuir uma alta variabilidade fenotípica e genética. A partir dessa diversidade, espécies de *R. solanacearum* são agrupadas em um complexo de espécies dividido em 5 raças fitopatogênicas e 6 biovares (Lowe-Power *et al.*, 2022). No Brasil, perdas econômicas relacionadas à *R. solanacearum* já foram relatadas em todos os estados e a presença de diferentes biovares da bactéria já foi confirmada no país. As técnicas atualmente empregadas para o controle não são mais efetivas frente à variabilidade genética, o alto número de possíveis hospedeiros e o rápido alastramento das estirpes do complexo de espécies. Campos agrícolas são levados à improdutividade, já que a bactéria possui mecanismos de resistência que possibilitam sua sobrevivência no solo mesmo sem nenhuma planta hospedeira (Yuliar e Toyota, 2015; Rossato, 2016).

A agricultura familiar é expressiva no Brasil. Isso é corroborado por pesquisas estatísticas que mostram que mais de 70% dos alimentos da mesa do brasileiro têm origem na agricultura familiar. Segundo o Censo Agropecuário, 77% dos estabelecimentos agrícolas do Brasil são de agricultura familiar. Esses números seguem tendência com o crescimento do interesse do consumidor por um alimento de origem orgânica, visto que 70% das propriedades certificadas pela Associação de Agricultura Orgânica são de agricultura familiar (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022).

O plantio de Plantas Alimentícias não Convencionais no Brasil é realizado majoritariamente por agricultores familiares de forma orgânica e, muitas vezes, em consórcio com plantas alimentícias mais popularizadas. As PANC demonstram ter um alto teor nutritivo e boa aceitação do consumidor, se mostrando assim promissoras para a diversificação alimentar do brasileiro (Bezerra e Brito, 2020). Com a importância da agricultura familiar e orgânica no país, a incidência de fitopatologias no Brasil urge por soluções que sejam acessíveis, eficazes, e pouco danosas ao ambiente. Por isso, o controle biológico é uma alternativa de interesse ao agricultor orgânico que procura recuperar sua produção de forma sustentável. Dessa forma, uma alternativa a ser aplicada em campo é a utilização de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPB) produtoras de substâncias antimicrobianas.

No presente trabalho, 245 estirpes PGPB isoladas da rizosfera da planta *Tropaeolum majus* L., popularmente conhecida como capuchinha, foram submetidas a

testes de antagonismo para determinar a atividade antagonista contra *R. solanacearum*. A partir desses testes, verificou-se que 9 estirpes apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra as duas estirpes de *Ralstonia* testadas. Observando-se os resultados da identificação molecular dessas estirpes (Tabela 3) e a análise filogenética (Figura 11) foi verificado que as estirpes estão divididas entre os gêneros *Serratia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* despertam interesse na pesquisa de PGPB (Dorjey *et al.*, 2017; Mohammed, Oloyede e Odesaye, 2020; Niem *et al.*, 2020). O gênero *Pseudomonas* possui espécies ubíquas no solo, assim possuindo diversos mecanismos que permitem sua sobrevivência nesse ambiente competitivo. Entre tais mecanismos incluem-se a produção de antibióticos e a indução de resistência sistêmica nas plantas (Dorjey *et al.*, 2017). Dessa forma, diferentes espécies desse gênero são estudadas para aplicação como agentes de biocontrole. Em 2020, Mohammed, Oloyede e Odesaye utilizaram estirpes de *Pseudomonas* para realização de testes de antagonismo *in vitro* contra *R. solanacearum*, onde isolados de *P. aeruginosa*, *P. syringae* e *P. fluorescens* apresentaram ação inibitória. Segundo Niem *et al.* (2020) uma grande variedade de estirpes do gênero *Pseudomonas* apresentaram atividade antagonista contra diferentes patógenos de videira; entre as espécies isoladas encontram-se *P. koreensis*, *P. moraviensis*, *P. fluorescens* e *P. azotoformans*.

No que diz respeito ao gênero *Serratia*, Soenens e Imperial (2020) revisam as capacidades do gênero como agentes de biocontrole. O gênero *Serratia* possui um metabolismo secundário capaz de produzir diversos compostos bioativos; entre eles, o antibiótico carbapenema. A carbapenema é um antibiótico beta-lactâmico bactericida de amplo espectro. Essa capacidade de produção de compostos bioativos chama atenção para a pesquisa acerca do uso de bactérias do gênero *Serratia* em biocontrole. Nesse sentido, estirpes de *S. plymuthica* são uma das mais estudadas por seu potencial de biocontrole. Isso é visto em Nguyen *et al.* (2021), que testou o composto *serratamid*, produzido por estirpes de *S. plymuthica*, contra diversas espécies bacterianas fitopatogênicas. O grupo utilizou *serratamid in vivo* em mudas de tomate infectadas por *Ralstonia solanaceaeum* e efetivamente reduziu os sintomas de murcha-bacteriana. Outras espécies do gênero *Serratia* também apresentam características promissoras para o biocontrole, como a *S. ficaria*. Em 2022, Yanti *et al.* testaram o efeito de diferentes PGPB contra *Ralstonia syzygii*, principal causa de murcha em tomates na Indonésia. Entre as bactérias que obtiveram ação inibitória, encontram-se *Serratia ficaria* e *S. rubidaea*.

Existem alguns exemplos na literatura da demonstração da capacidade de estirpes bacterianas do gênero *Enterobacter* serem PGPB. Em 2020, Bendaha e Belaoui verificaram que uma estirpe de *E. ludwigii* promoveu o crescimento de mudas de tomate e inibiu *in vitro* o crescimento de *Fusarium oxysporum*. Essa mesma espécie também apresentou resultados positivos para promoção de crescimento de plantas em um estudo realizado por Sarron *et al.* (2018), no qual duas estirpes de *E. ludwigii* apresentaram características de PGPB *in vitro* por meio da solubilização de fosfato e produção de ácido indolacético.

Desse modo, as estirpes bacterianas isoladas no presente trabalho apresentam potencial de atuarem na formulação de um produto bioinoculante. Para isso, é necessário a continuação desse estudo para realização de testes *in vivo* utilizando as estirpes selecionadas e, assim, averiguar *in vivo* a sobrevivência de plantas de capuchinha tratadas com o bioinoculante frente a RSSC.

7. Conclusões

- Bactérias rizosféricas isoladas da planta *Tropaeolum majus* L. apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra duas estirpes de *Ralstonia*;
- As estirpes PGPB identificadas pertencem aos gêneros *Serratia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*. Na literatura, outros autores reconhecem diversas espécies desses gêneros como PGPB.

8. Referências Bibliográficas

- Arya, N., Rana, A., Rajwar, A., Sahgal, M., Sharma, A.K. (2018). Biocontrol efficacy of siderophore producing indigenous *Pseudomonas* strains against *Fusarium* wilt in tomato. *National Academy of Science Letters* 41, 133–136.
- Bazylo, A., Parzonko, A., Jeż, W., Osińska, E., Kiss, A.K. (2014). Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. *Industrial Crops & Products* 55, 19–24.
- Bendaha, M. E. A., Belaouni, H. A. (2020). Effect of the endophytic plant growth promoting EB4B on tomato growth. *Hellenic Plant Protection Journal*, 13, 54–65.
- Bezerra, J. A., Brito, M. M. de. (2020). Potencial nutricional e antioxidantes das Plantas alimentícias não convencionais (PANCs) e o uso na alimentação: Revisão. *Research, Society and Development* 9, e369997159.
- Billah, M., Khan, M., Bano, A., Hassan, T.U., Munir, A., Gurmani, A.R. (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal* 36, 904–916.
- Cao, Y., Hualiang, P., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports* 8, 4360.
- Cesaro, P., Gamalero, E., Zhang, J., Pivato, B. (2021). Editorial: The Plant Holobiont Volume I: Microbiota as Part of the Holobiont; Challenges for Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 12, 1.
- Dal’Rio, I.N.L. (2021). Estudo da comunidade bacteriana e seleção de bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a raízes de *Tropaeolum majus* L. (capuchinha). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Das, J., Yadav, S. K., Ghosh, S., Tyagi, K., Magotra, A., Krishnan, A., Jha, G. (2021). Enzymatic and non-enzymatic functional attributes of plant microbiome. *Current Opinion in Biotechnology* 69, 162–171.
- Dorjey, S., Dolkar, D., & Sharma, R. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 1335–1344.
- Ebert, E.F., Sivinski, E.A., Pelisser, C., Endres, C.M., Mattia, J.L. (2021). Capuchinha (*Tropaeolum majus*) compostos bioativos e sua funcionalidade no organismo. *Research, Society and Development* 10, e05101622623.
- Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K., Stead, D.E. (1996). Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 26, 663–678.
- Fonseca, M.C. (2020). Avaliação quantitativa e taxonômica de bactérias mobilizadoras de fósforo na rizosfera do feijoeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências: Biologia na agricultura e no Ambiente). Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- García, R., Kerns, J., Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* species complex: A quick diagnostic guide. *Plant Health Progress* 20, 7–13.
- Grey, B.E., Steck, T.R. (2001). The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3866–3872.
- Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29, 65–87.
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Koichiro, T., Glen S., Sudhir K. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022-3027.

- Li, C.H., Wang, K.C., Hong, Y.H., Chu, T.H., Chu, Y.J., Chou, I.C., Lu, D.K., Chen, C.Y., Yang, W.C., Lin, Y.M., Cheng, C.P. (2014). Roles of different forms of lipopolysaccharides in *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. *International Society for Plant-Microbe Interactions* 27, 471–478.
- Lindström, K., Mousavi, S.A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology* 13, 1314–1335.
- Lopes, C.A., Rossato, M. (2018). History and status of selected hosts of the *Ralstonia solanacearum* species complex causing bacterial wilt in Brazil. *Frontiers in Microbiology* 9, 1228.
- Lowe-Power, T., Avalos, J., Bai, Y., Munoz, M. C., Chipman, K., Tom, C. E., & Williams, D. (2022). A Meta-analysis of the known Global Distribution and Host Range of the *Ralstonia* Species Complex bioRxiv 2020.07.13.189936
- Lowe-Power, T., Khokhani, D., Allen, C. (2018). How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. *Trends in Microbiology* 26, 929–942.
- Lyu, D., Zajonc, J., Pagé, A., Tanney, C.A.S., Shah, A., Monjezi, N., Msimbira, L.A., Antar, M., Nazari, M., Backer, R., Smith, D.L. (2021). Plant Holobiont Theory: The phytomicrobiome plays a central role in evolution and success. *Microorganisms* 9, 675.
- Margulis, L., Fester, R. (1991). *Symbiosis as a source of evolutionary innovation*. (Massachusetts: The MIT Press).
- Massol-Deya, A.A., Odelson, D.A., Hickey, R.F., Tiedje, J.M. (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *Molecular microbial ecology manual*. In: Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D., De Bruijn, F.J., eds. (Dordrecht: Springer). pp. 289–296.
- Milijašević-Marčić, S., Todorović, B., Potocnik, I., Rekanovic, E., Stepanovic, M., Mitrovic, J., Duduk, B. (2013). *Ralstonia solanacearum* – a New Threat to Potato Production in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina* 28, 229–237.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2022). *Agricultura Familiar*. <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/agricultura-familiar-1>>
- Mohammed, A. F., Oloyede, A. R., Odeseye, A. O. (2020). Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* using *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of tomato plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 53, 1–16.
- Moraes, A., Vieira, M., Zárate, N., Teixeira, I., & Rodrigues, E. (2008). Produção da capuchinha em cultivo solteiro e consorciado com os repolhos verde e roxo sob dois arranjos de plantas. *Ciência E Agrotecnologia*, 32.
- Nguyen, H. T., Kim, H.-G., Yu, N. H., Hwang, I. M., Kim, H., Kim, Y. C., & Kim, J.-C. (2021). In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of Serratamid, a Novel Peptide–Polyketide Antibiotic Isolated from *Serratia plymuthica* C1, against Phytopathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 5471–5480
- Niem, J. M., Billones-Baaijens, R., Stodart, B., Savocchia, S. (2020). Diversity Profiling of Grapevine Microbial Endosphere and Antagonistic Potential of Endophytic *Pseudomonas* Against Grapevine Trunk Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 11
- Pathania, P., Rajta, A., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2020). Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101842.
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 13, 63–77.
- Romantschuk, M. (1992). Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 30, 225–243.
- Rosado, A.S., Seldin, L. (1993). Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 521–528.
- Rossato, M. (2016). Espécies de *Ralstonia* no Brasil: Caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro. Doutorado do programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2. ed. (Nova Iorque: Cold Spring Harbor Press).
- Santos, L.F., Olivares, F.L. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology* 26, 100198.
- Sarron, E., Clément, N., Pawlicki-Jullian, N., Gaillard, I., Boitel-Conti, M. (2018). Stimulating effects of two plant growth-promoting bacteria, *Enterobacter ludwigii* Ez-185-17 and *Raoultella terrigena* Ez-555-6, on flax culture. *AIP Conference Proceedings*, 1954, 020003.
- Silva, I., Campelo, L.H.B.P., Padilha, M.R.F., Shinohara, N.K.S. (2018). Mecanismos de resistência das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) e benefícios para a saúde humana. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 15, 77–91.
- Soenens, A., Imperial, J. (2020). Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochemistry Reviews* 19, 577–587.
- Souza, H. de A., Nascimento, A.L.A.A., Stringheta, P.C., Barros, F. (2020). Capacidade antioxidante de flores de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). *Revista Ponto de Vista* 9, 73–84.
- Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38, 401–419.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–80.
- Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 18, 607–621.
- United Nations (2022). World population to reach 8 billion on 15 November 2022. <<https://www.un.org/en/desa/world-population-reach-8-billion-15-november-2022>>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206, 1196–1206.
- Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F. J. D., Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.
- Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., José, J. F. B. de S., Beneduzi, A., Granada, C. E., & Vargas, L. K. (2022). Soil-plant-microbiota interactions to enhance plant growth. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo* 46, e0210098.
- Yanti, Y., Hamid, H., Reflin, R., Yaherwandi, Y., Suhendra, D., Hariandi, D., Suriani, N. L. (2022). Evaluation of the Effect of PGPR Strains on Tomato Growth and Suppression of *Ralstonia* Wilt Disease. *KnE Life Sciences*, 664–671.
- Yuliar, N., Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments* 30, 1–11.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 32, 723–735.

9. Anexos

9.1 Sequências do gene *rrs*

➤ 25C

G T A C T C C C C A G G C G G T C A A C T T C A C G C G T T A G C T A C G T T A C T A A G G A
 A A T G A A T C C C C A A C A A C T A G T T G A C A T C G T T T A G G G C G T G G A C T A C C
 A G G G T A T C T A A T C C T G T T T G C T C C C C A C G C T T T C G T G C A T G A G C G T C A
 G T G T T A T C C C A G G A G G C T G C C T T C G C C A T C G G T A T T C C T C C A C A T C T C
 T A C G C A T T T C A C T G C T A C A C G T G G A A T T C T A C C C C C C T C T G A C A C A C T
 C T A G C C G T G C A G T C A C C A A T G C A A T T C C C A A G T T A A G C C C G G G G A T T
 T C A C A T C G G T C T T G C A C A A C C G C C T G C G C A C G C T T T A C G C C C A G T A A
 T T C C G A T T A A C G C T T G G A C C T A C G T A T T A C C G C G G C T G C T G G C A C G T
 A G T T A G C C G G T C C T T A T T C T T C C G G T A C C G T C A T C C A C A C C A G G T A T T
 A A C C A G A G C G A T T T C T T T C C G G A C A A A A G T G C T T T A C A A C C C G A A G G
 C C T T C T T C A C A C A C G C G G C A T T G C T G G A T C A G G C T T G C C C C C A T T G T C
 C A A A A T T C C C C A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T C T G G G C C G T G T C T C A
 G T C C C A G T G T G G C T G A T C G T C C T C T C A G A C C A G C T A C T G A T C G T C G C C
 T T G G T G A G C C T T T A C C C C A C C A A C T A G C T A A T C A G A C A T C G G C C G C T
 C T A T A G C A T G A G G C T T G G C G T C C C C C A C T T T C A C C T C A G T C G T A T G C G
 G T A T T A G C T A A T C T T T C G A C T A G T T A T C C C C C A C T

➤ 24A2

G C C G T G G T A A T C G C C C C C C T T A C G G T T A G G C T A A C T A C T T C T G G C A A
 A A C C C A C T C C C A T G G T G T G A C G G G C G G T G T G T A C A A G A C C C G G G A A C
 G T A T T C A C C G C G G C A T G C T G A T C C G C G A T T A C T A G C G A T T C C A G C T T C
 A C G T A G T C G A G T T G C A G A C T A C G A T C C G G A C T A C G A T G C A T T T T C T G
 G G A T T A G C T C C A C C T C G C G G C T T G G C A A C C C T C T G T A T G C A C C A T T G T
 A T G A C G T G T G A A G C C C T A C C C A T A A G G G C C A T G A G G A C T T G A C G T C A
 T C C C C A C C T T C C T C C G G T T T G T C A C C G G C A G T C T C T C T A G A G T G C C C T
 T T C G T A G C A A C T A G A G A C A A G G G T T G C G C T C G T T G C G G G A C T T A A C C
 C A A C A T C T C A C G A C A C G A G C T G A C G A C A G C C A T G C A G C A C C T G T G T C
 C A C T T T C T C T T T C G A G C A C C T A A T G C A T C T C T G C T T C G T T A G T G G C A T
 G T C A A G G G T A G G T A A G G T T T T C G C G T T G C A T C G A A T T A A T C C A C A T
 C A T C C A C C G C T T G T G C G G G T C C C C G T C A A T T C C T T T G A G T T T T A A T C T
 T G C G A C C G T A C T C C C C A G G C G G T C A A C T T C A C G C G T T A G C T A C G T T A
 C T A A G G A A T G A A T C C C C A A C A A C T A G T T G A C A T C G T T T A A G C T G T G
 A C T A C A C G T A T C T A A T C C T G G T T T G C T C C C C A C G C T T T C G T G C A T G A G
 C G T C A

➤ R245

C A C C C C A G T C A T G A A T C A C A C C G T G G T A A C C G T C C T C C C G A A G G T T A
 G A C T A G C T A C T T C T G G T G C A A C C C A C T C C C A T G G T G T G A C G G G C G G T
 G T G T A C A A G G C C C G G G A A C G T A T T C A C C G C G A C A T T C T G A T T C G C G A
 T T A C T A G C G A T T C C G A C T T C A C G C A G T C G A G T T G C A G A C T G C G A T C C

GGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCA
 ACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAG
 GGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGATTTGTCACCG
 GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACA
 AGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
 CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCA
 ATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTT
 CGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
 CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
 TCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAAC
 GGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
 TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGT
 GGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCG
 CTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCGCCAGTT
 TTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCAACCTTA
 ACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCT
 TGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC
 TTATTCTGTGCGTAACGTCAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACACT
 TCCTCCAACCTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTGCACACAC
 GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAGTATTCCCA
 CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGAC
 TGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATT
 ACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAG
 GCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGC
 GTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCAT
 TACTCACCCGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCG
 CTCGACTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGC

➤ R224

CACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTA
 GACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGT
 GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGA
 TTAGTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCC
 GGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCA
 ACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAG
 GGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCG
 GCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACA
 AGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
 CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCA
 ATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTT
 CGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
 CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
 TCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAAC
 GGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
 TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGT
 GGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCG
 CTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCGCCAGTT
 TTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCAACCTTA
 ACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCT
 TGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC

TTATTCTGTCGGTAAACGTCAA AATTGCATTAGTATTAATCTACAACAC
 TTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTGCACACA
 CGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAAGTATTCCCC
 ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG
 ACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCC
 ATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGC
 AAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATT
 AGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCCCTAG
 GCATTACTACCCGTCGCGCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCTTTCA
 TCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGC

➤ R153

GCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTACC
 CGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCC
 ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCCG
 GACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGA
 GTTGACAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTC
 CACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGT
 GTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCT
 TCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGT
 GCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCA
 ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAA
 TGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCAATTGGATGTCA
 AGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA AACCACATGCTCC
 ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGG
 CCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAG
 AGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACT
 ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGCACCTCAGTG
 TCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCCTAT
 ATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCAT
 ACTCTAGTCCGTCAGTTTTGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGG
 CTTTCACATCCA ACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGT
 AATCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
 AGAGTTATCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTAAAAATTGCAGAGT
 ATTAATCTACAACCCTTCCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAA
 GACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCAT
 GTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT
 CAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTC
 GCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCT
 CATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGA
 CGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAACGTTATCCCCACTACCAG
 GCAGATTCTTAGGCATTACTACCCGTCGCGCGCTCTCAAGAGAAGC
 AAGCTTCTCTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGC

➤ R112

CTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGG
 TTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGC
 GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCG
 CGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCCA

TCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGG
 CAACCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTA
 AGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCAC
 CGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGA
 CAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
 AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCAC
 CAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTT
 CTTGCGGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
 CCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGC
 GGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCA
 ACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT
 CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAAGTATCAGTCCAG
 GTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTAC
 CGCTACACAGGAAATTCCACCACCTCTACCATACTCTAGTCAGACA
 GTTTTGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCA
 TAACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACG
 CTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCAGGT
 GCTTATTCTTGTGCGGTAACGTCAAATTGCAGAGTATTAATCTACAAC
 CCTTCCCTCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGAACTTCTTACA
 CACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATAGTCCC
 CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG
 ACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCTTGGTGAGCC
 ATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGC
 AAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATT
 AGCGTCCGTTTCCGAACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAG
 GCATTACTACCCGTCGCGGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTCT
 ACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCC

➤ R96

GTTACCTTGTTAGGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAA
 GCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCC
 ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGT
 AGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGA
 GTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTT
 GCTCTCGCGAGTTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTG
 TAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
 CTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCT
 GGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC
 ATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAG
 TTCCCGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAG
 AGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCA
 CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGC
 CGTACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACG
 CCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTA
 CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT
 CAGTCTTTGTCCAGGGGCCGCTTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCT
 CTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGAC
 TCTAGCTTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCACGTTAAGCGCGGGATTT
 CACATCTGACTTAAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAA
 TTCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGG

AGTTAGCCCGTGCTTCCTCTGCGAGTAACGTCAATGCAATGTGCTAT
 AAACACACTGCCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCTAAG
 GCCTTCTTCACACACGC

➤ R144

GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTA
 AGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCC
 CATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 TAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGA
 GTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTT
 GCTCTCGCGAGTTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTG
 TAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
 CTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCT
 GCCAACAAAGGATAACGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA
 TTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGT
 TCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGA
 GTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCAC
 CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCC
 GTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGC
 CTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTAC
 CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTC
 AGTCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCT
 CTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAGAC
 TCTAGCTTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCACGTTAAGCGCGGGGAT
 TTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTA
 ATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGC
 GAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATGCGATGCCGTA
 TTAAGACATCGCCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAA
 GGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATT
 GTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT
 CAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTC
 GCCTAGGTGAGCCATTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCA
 CATCTGATGGCGTGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCCGTAGAC
 GTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAG
 GCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCAGAG
 AGCAAGCTCTCCTGTGCTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCC

➤ R148

CTTGTTAGGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCC
 CTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGT
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCAT
 TCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCA
 GACTCCAATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCG
 CGAGTTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCT
 ACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGT
 TTATCACCCGGCAGTCTCCTCTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAAC
 AAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTAC
 AACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGA
 AGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGT

AAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
 GCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCC
 CCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGG
 GCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTA
 TCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTT
 GTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGC
 ATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGC
 TTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCACGTTAAGCGCGGGGATTTACA
 TCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCG
 ATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTT
 AGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATGCAATGTGCTATTAAC
 ACATTACCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTGTACAACCCTAAGGCCTT
 CTTACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTGGCGCCCATTGTGCAA
 TATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC
 CAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAG
 GTGAGCCATTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTG
 ATGGCGTGAGGCCCGAAGGTCCCCACTTTGGTCCGTAGACGTTATG
 CGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTT
 TCCAGACATTACTACCCCGTCCGCGCTCGTCACCCAGAGAGCAAG
 CTCTCCCGTGCTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCC

➤ R154

TCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTG
 TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTAGCATT
 CTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCA
 GACTCCAATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCG
 CGAGTTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCT
 ACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACATTCTCCGG
 TTTATACCGGCAGTCTCCATTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAA
 CAAAGGATAAAGGGTAGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCA
 CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCG
 AAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGG
 TAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG
 TGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTC
 CCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAG
 GGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGT
 ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTT
 TGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGC
 ATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGC
 TTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCACGTTAAGCGCGGGGATTTACA
 TCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCG
 ATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTT
 AGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATGCAATGTGCTATTAAC
 ACATTACCCTTCCTCCTCACTGAAAGTGCTTTACAACCCTAAGGCCTT
 CTTACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTTCGCGCCCATTGTGCAA
 TATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC
 CAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAG
 GTGAGCCATTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTG
 ATGGCGTGAGGCCCGAAGGTCCCCACTTTGGTCCGTAGACGTTATG
 CGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTT

TCCCAGACATTACTCACCCCTCCGCCGCTCGTCACCCAGAGAGC

➤ R157

CGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGT
AAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTC
CCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC
GTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCCG
AGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCT
TGCTCTCGCGAGTTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGT
GTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCG
CTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGA
GTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAA
GAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCC
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGG
CCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCAC
GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCG
TCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCCTCAGAT
CTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAG
ACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGG
ATTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGT
AATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGAGGTT
ATTAACCACAACACCTTCCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGA
AGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCAA
TGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTC
TCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGT
CGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGC
ACATCTGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCGA
CGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCA
GGCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCGAG
CAAGCTCCCTGTGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCC
A