



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIA PEZARINI BAPTISTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus velezensis*
LABIM40 NO BIOCONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Londrina
2019

JULIA PEZARINI BAPTISTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus velezensis*
LABIM40 NO BIOCONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Co-orientadora: Prof. Dr. Maria Isabel Balbi-Peña

Londrina
2019

B222A Baptista, Julia Pezarini.

Avaliação do potencial de *Bacillus velezensis* labim40 no biocontrole de fungos fitopatogênicos / Julia Pezarini Baptista. – Londrina, 2019.
76 f. : il.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

Co-orientadora: Maria Isabel Balbi Peña

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. *Bacillus* sp – Teses. 2. Caracterização biológica – Teses. 3. Antimicrobianos – Teses. 4. Antagonismo – Teses. 5. Produção sustentável – Teses. I. Oliveira Junior, Admilton Gonçalves de. II. Peña, Maria Isabel Balbi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.8

JULIA PEZARINI BAPTISTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus velezensis* LABIM40 NO
BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de
Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luis Eduardo Azevedo Marques
Lescano
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de Fevereiro de 2019

Dedico esse trabalho aos meus pais e a sociedade

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar nessa jornada e por me dar força para lutar pelos meus ideais.

A minha família, Osvaldecir, Luciana, Stefano e Lucas por estar sempre me apoiando e compartilhando das minhas experiências acadêmicas, além da paciência que tiveram comigo nessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Admilton Junior pela excelente orientação, paciência e por disponibilizar seu tempo e condições para o desenvolvimento dessa pesquisa

Aos colegas de trabalho Larissa, Mirela, Allan, Boi, Maria e Rosiana por estarem sempre comigo, sempre me escutando quando eu precisava e sempre me ajudando em todas as questões possíveis, obrigada pelo companherismo e pela amizade. Obrigada equipe!

Gostaria de agradecer também ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM), a CAPES e a empresa SIMBIOSE por subsidiar a pesquisa. Além dos parceiros do laboratório Labbep.

BAPTISTA, Julia Pezarini. **Avaliação do potencial de *Bacillus velezensis* LABIM40 no biocontrole de fungos fitopatogênicos.** 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O desenvolvimento de produtos biológicos vem crescendo devido a vários fatores, entre eles a conscientização ambiental, a preocupação com a saúde humana e a seleção cada vez mais comum de patógenos resistentes aos produtos químicos sintéticos. Dentre os gêneros estudados para o desenvolvimento de produtos biológicos, o gênero *Bacillus* spp. tem se destacado devido a produção de muitas moléculas antimicrobianas e a resistência em condições ambientais adversas pela formação de endósporos. Nesse contexto o objetivo do estudo foi identificar a cepa *B. velezensis* LABIM40 para realizar análises *in silico*, envolvendo comparações filogenômicas e a predição dos metabólicos secundários. Paralelamente, análises *in vitro* também foram realizadas para caracterização da atividade antifúngica de LABIM40, para isso, os ensaios foram conduzidos com os fungos: *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolia* (MP) e *Botrytis cinerea* (BC). As melhores condições de cultivo, a estabilidade aos valores de temperatura, pH e luz e a concentração inibitória mínima (CIM) foram avaliadas. Além dessas análises, o efeito do sobrenadante de LABIM40 no micélio fúngico de SS foi visualizado em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O resultado do sequenciamento indicou que LABIM40 pertence ao grupo *B.velezensis* e as análises de comparação mostraram uma alta similaridade com outras cepas com potencial biotecnológico já descrito. Os dados de predição do genoma de LABIM40 indicaram a presença de 33 BGCs (Biosynthetic Gene Clusters), dessas, 11 apresentaram algum nível de similaridade com alguma BGC já depositada na base de dados do Minimum Information about Biosynthetic Gene clusters (MiBiG). O sobrenadante de LABIM40 apresentou ter grande potencial antifúngico ao inibir mais de 60 % os fungos testados, não perdendo a atividade nos parâmetros de temperatura, pH e luz, no entanto a atividade caiu ao ser submetido as temperaturas de 70, 100 e 121 °C. Os dados da CIM foram 1,2% para SS, 2,5% MP e 20% para BC e alterações estruturais nas hifas de SS ao ser tratada com o sobrenadante livre de células também foram visualizadas, concluindo que *B. velezensis* LABIM40 produz metabólitos antifúngicos com estabilidade nos parâmetros testados, caracterizando os seus compostos para o uso em diferentes condições ambientais, sendo, portanto, um bom agente de biocontrole. Contudo muitas pesquisas ainda devem ser realizadas para otimizar a produção dos metabólitos antifúngicos, para identificar o princípio ativo e caracterizar a atividade *in vivo*.

Palavras-chave: *Bacillus* sp. Caracterização biológica. Antimicrobianos. Antagonismo. Produção sustentável.

BAPTISTA, Julia Pezarini. **Evaluation of the potential of *Bacillus velezensis* LABIM40 in the biocontrol of phytopathogenic fungi.** 2019. 76 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The development of biological products has been growing due to various factors, such as environmental awareness, the concern for human health and the increasingly common selection of pathogens resistant to synthetic chemicals. Among the studied genera related to the development of biological products, the *Bacillus* spp. genus stood out for its production of many antimicrobial molecules, as well as its resistance to adverse conditions by forming endospores. In this context, the objective of the study was to identify the antifungal agent *B. velezensis* LABIM40 in order to perform *in silico* analysis, with phylogenomic comparisons and predictions regarding secondary metabolites. At the same time, *in vitro* tests were performed for the characterization of LABIM40's antifungal activity. In order to do that, the experiment was conducted with the fungi: *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolia* (MP) and *Botrytis cinerea* (BC). The best growth conditions, the stability of temperature, pH and light values as well as the minimal inhibition concentration (MIC) were evaluated. Aside from those tests, the effect of LABIM40's supernatant on SS's mycelium was observed in Scanning Electron Microscopy (SEM). The results of the sequencing pointed that LABIM40 belongs to the group *B. velezensis*, and the comparison analysis showed a high similarity with other strains, already described as with biotechnological potential. The prediction data indicated the presence of 33 BGCs (Biosynthetic Gene Clusters) in the genome. Of those, 11 presented some level of similarity with a BGC already included in the Minimum Information about Biosynthetic Gene clusters (MiBiG) database. LABIM40's supernatant showed great antifungal potential when inhibiting more than 60% of the tested fungi, not lowering its activity on the parameters of temperature, pH and light. However, the activity lowered when submitted to temperature levels of 70, 100 and 121°C. The MIC data was 1,2% for SS, 2,5% for MP and 20% for BC, and it was possible to visualize alterations on the structure of SS's hypha when treated with the supernatant free of cells, leading to the conclusion that *B. velezensis* LABIM40 produces antifungal metabolites stable on the tested parameters, characterizing its components as viable for use in different environmental conditions, therefore being a good biocontrol agent. Nevertheless, there are still many researches that must be done to optimize the production of antifungal metabolites, to identify its active principle and characterize the *in vivo* activity.

Keywords: *Bacillus* sp. Biological characterization. Antimicrobials. Antagonism. Sustainable production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Relação filogenômica de LABIM40 com as cepas FZB42, CC178, TrigoCor 1448, NKG-1, SQR9, QST713, DSM7, TA208, 168 e B3610, todas disponíveis no GenBank38
- Figura 2-** Representação circular e comparação do genoma da cepa LABIM40 com outras cepas de *Bacillus velezensis*, utilizando o programa BRIG. Onde segue de dentro para fora: representação do tamanho do genoma de LABIM40, GC Skew, GC Conteúdo, posições dos clusters da cepa LABIM40, descrito na Tabela 2 e respectivamente as cepas FZB42, QST713, SQR9 e TrigoCor 144839
- Figura 3-** Ensaio de cultura dupla entre LABIM40 e os fungos fitopatogênicos. (a) *S. sclerotiorum* (SS), *M. phaseolina* (MP) e *B. cinerea* (BC). Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (b) Fotografia do teste de cultura dupla, em (A) está representado os controles e em (B) os respectivos fungos confrontados com LABIM4043
- Figura 4-** Produção de metabólitos antifúngicos em diferentes meios, (A) representa o meio M1 e (B) o meio M2, para os respectivos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolina* (MP) e *Botrytis cinerea* (BC)44
- Figura 5-** Cinética do crescimento celular e atividade antifúngica do sobrenadante livre de células de *Bacillus velezensis* LABIM40. Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (ICM %), Unidade Formadora de colônias por mililitro (UFC/mL)44
- Figura 6-** Avaliação da estabilidade do sobrenadante livre de células de *B.velezensis* cepa LABIM40 quando submetido a diferentes temperaturas. (a) *S. sclerotiorum* (SS), *M. phaseolina* (MP) e *B. cinerea* (BC). Porcentagem de Inibição do crescimento Micelial (ICM %). (b) Fotografia do teste de termoestabilidade. Nas linhas estão representados os respectivos fungos descritos acima e nas colunas os tratamentos em 28, 70, 100 e 121 °C45

Figura 7-	Avaliação da estabilidade do sobrenadante livre de células em diferentes pH (3-11). <i>S. sclerotiorum</i> (SS), <i>M. phaseolina</i> (MP) e <i>B. cinerea</i> (BC), Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (ICM %).....	46
Figura 8-	Avaliação da fotoestabilidade do sobrenadante livre de células de <i>B. velezensis</i> cepa LABIM40 exposto por 12 horas na luz ultravioleta (UV) com o comprimento de onda de 365 nm e luz visível (LV), testado contra os fungos <i>S. sclerotiorum</i> (SS), <i>M. phaseolina</i> (MP) e <i>B. cinerea</i> (BC). Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (ICM %). Letras iguais não diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)	46
Figura 9-	Concentração inibitória mínima em meio solidificado. Nas linhas está representado os fungos <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (SS), <i>Macrophomina phaseolin</i> (MP) e <i>Botrytis cinerea</i> (BC) e nas colunas as concentrações testadas, indo de 40% á 0,07% do sobrenadante de LABIM40.....	47
Figura 10-	Estimativa da dose efetiva para inibir 50 e 90 % dos fungos: <i>S. sclerotiorum</i> , <i>M. phaseolina</i> e <i>B. cinerea</i> . Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (ICM).....	48
Figura 11-	Microscopia eletrônica de varredura, imagens do efeito antifúngico do sobrenadante livre de células de <i>B. velezensis</i> cepa LABIM40 contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . O controle é referente ao spot fúngico sem tratamento (A-C). O tratamento (D-F), é referente a área de transição entre o crescimento fúngico e a região de inibição. Magnitudes de (A) 45X, (B) 800X, (C) 3000X, (D) 45X, (E) 800X, (F) 3000X	49
Figura 1 complementar-	Microscopia eletrônica de varredura da colônia de <i>B.velezensis</i> cepa LABIM40. Magnitudes de (A) 50X, (B) 100X, (C) 200X, (D) 400X, (E) 800X, (F) 1600X, (G) 3000X, (H) 6000X, (I) 12000X.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Comparação do genoma de LABIM 40 com cepas do gênero <i>Bacillus</i>	38
Tabela 2-	Análise de genômica comparativa de <i>Bacillus velezensis</i> LABIM40 com outros genomas de <i>B. velezensis</i>	40
Tabela 3-	Atividade antifúngica em dois diferentes meios de cultivo	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitros
ANI	Average Nucleotide Identity
AntiSMASH	Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell
BC	<i>Botrytis cinerea</i>
BDA	Batata Dextrose Agar
BGCs	Biosynthetic Gene Clusters
BLAST	Basic Local Alignment Search Too
CIM	Concentração Inibitória Mínima
dc	diâmetro médio da colônia no controle
dDDH	digital DNA-DNA Hybridization
DDH	digital DNA-DNA Hybridization
dt	diâmetro médio da colônia no tratamento
ED	Dose efetiva
g	força g
GC	Guanina e Citosina
h	Horas
ICM	Inibição do Crescimento Micelial
LB	LuriaBertani
LV	Luz visível
M	Molar
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mL	Mililitro
MP	Macrophomina phaseolina
MYP	Manitol extrato de levedura e ágar
NCBI	National Center foe Biotechnology Information
NRPS	Non-Robosomal Peptide Synthetase
pH	potential hidrogeniônico
SLC	Sobrenadante livre de células
SS	Sclerotinia sclerotiorum
TransATPKS	trans-Acyl Transferase Polyketide Synthetase
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	15
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
3.1	PRODUÇÃO AGRÍCOLA NO BRASIL.....	16
3.2	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	17
3.2.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	17
3.2.2	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid	18
3.2.3	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr	19
3.3	CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	20
3.3.1	Controle químico.....	22
3.3.2	Controle biológico	23
3.4	GÊNERO <i>BACILLUS</i>	24
3.4.1	<i>Bacillus velezensis</i>	26
4	ARTIGOS	28
ARTIGO 1-	Complete genome sequence of <i>Bacillus velezensis</i> LABIM40 na effective antagonist of fungal plant pathogens	28
ARTIGO 2-	Potencial de <i>Bacillus velezensis</i> LABIM40 no controle de fungos fitopatogênicos: Uma abordagem <i>in silico</i> e avaliação <i>in</i> <i>vitro</i>	30
	MATERIAL SUPLEMENTAR	60
5	CONCLUSÕES	61
6	REFERÊNCIAS	62
7	ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 33.9 % de áreas agricultáveis (Banco mundial, 2016), no entanto ele é o 4º país com participação nas exportações de produtos agrícolas e dentre os produtos de origem vegetal os complexos de soja lideram o *ranking* das exportações (JAMBOR e BABU, 2016; MAPA, 2018).

Esse desenvolvimento econômico gerado pela agricultura proporcionou maior atenção para a produtividade agrícola. Porém para manter a produtividade, é necessário o controle integrado de doenças, pois se tratando de um país tropical a incidência de doenças no campo é muito comum.

Dentre as doenças, os fungos *Macrophomia phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* causam prejuízos em muitas culturas, principalmente na soja (GODOY et al., 2016). *M. phaseolina* é capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas (GUPTA et al., 2012). Já *S. sclerotinia*, mais de 400 espécies (BOLAND e HALL, 1994; BOLTON et al., 2006).

Mas se tratando de horticulturas, *Botrytis cinerea* é um dos agentes patogênicos mais comum em morangos no Brasil e demais países (REIS et al., 2011; JANISIEWICZ et al., 2016). Esse patógeno pode infectar mais de 200 espécies de planta, estando entre elas uva, morango, tomate, pepino e flores ornamentais (SCHUMACHER et al., 2012).

Dessa forma, o uso de defensivos químicos é amplamente utilizado para controlar as perdas causadas por doenças no campo. No entanto, a longo prazo esses defensivos se tornaram prejudiciais em inúmeros aspectos, por contaminar o meio ambiente (ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008), selecionar espécies resistentes (MA et al., 2009; GEPP et al., 2012), atuar em organismos não-alvo (TOSI et al., 2018) e até mesmo por prejudicar a saúde humana (CREMONESE et al., 2017).

Sendo assim, para evitar o uso desses defensivos sintéticos, outras estratégias foram desempenhadas, entre elas a utilização de plantas geneticamente modificadas, resistentes à patógenos (MCCAGHEY et al., 2018). No entanto, esse manejo também possui impacto negativo na biodiversidade (ANDOW e ZWAHLEN, 2006), e a longo prazo os riscos a saúde humana ainda não estão bem estabelecidos.

Portanto, uma alternativa que está cada vez mais sendo utilizada, devido aos seus benefícios agregados é o uso de microrganismos como agentes de

controle (TIMMUSK et al., 2017). Atualmente há 209 cepas microbianas sendo utilizadas em produtos comerciais no Brasil, Austrália, Canadá, União Européia, Japão, Nova Zelândia e Estados Unidos da América (VAN LENTEREN et al., 2018).

A maioria dos produtos biológicos registrados segundo van Lenteren (2018), são constituídos por bactérias e dentre os diferentes gêneros desse grupo, *Bacillus spp.* se destacam, principalmente por apresentarem a capacidade de formação de endósporos, produção de grande variedade de compostos antimicrobianos, propriedades surfactantes, indução de respostas de defesa em plantas, entre outros (ETESAMI e ALIKHANI, 2017; PEREZ, 2017, VERMA, 2015).

O desenvolvimento destes produtos, tem dependido, na maioria dos casos, de procedimentos tradicionais de isolamento microbiano e produção de bioativos, sem o conhecimento genético do potencial antimicrobiano. No entanto, dada a rapidez da propagação das doenças e da necessidade de novas tecnologias, é necessária uma abordagem mais rápida à bioprospecção tradicional. Desta forma, as tecnologias de sequenciamento de DNA de “nova geração” são ferramentas indispensáveis para o desenvolvimento de novos inoculantes para proteção de plantas (KIM et al., 2016).

Nesse sentido, o objetivo geral deste estudo foi explorar o potencial biotecnológico e caracterizar a atividade dos compostos antifúngicos produzidos pela cepa *Bacillus velezensis* LABIM40, utilizando uma abordagem *in silico* e estudos *in vitro* contra fungos patogênicos de plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Explorar o potencial biotecnológico e caracterizar a atividade dos compostos antifúngicos produzidos pela cepa *Bacillus velezensis* LABIM40, utilizando uma abordagem *in silico* e estudos *in vitro* contra fungos patogênicos de plantas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Sequenciar o genoma completo de LABIM40;
- 2- Realizar uma predição dos metabólitos secundários, através de uma abordagem *in silico*;
- 3- Avaliar o potencial de antagonismo da cepa LABIM40 contra fungos fitopatogênicos;
- 4- Desenvolver meios de cultivo para melhor biossíntese dos compostos antifúngicos pela cepa LABIM40;
- 5- Avaliar o efeito, concentração e estabilidades dos metabólitos antifúngicos produzidos pela cepa LABIM40.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA NO BRASIL

A colonização do Brasil pelos Portugueses e demais europeus iniciada no século XVI, até a metade do século XIX, foi marcada pela produção de cana-de-açúcar em praticamente todo litoral Brasileiro, tendo início em Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro. O clima quente e úmido e a mão de obra dos indígenas dessas regiões favoreceram a expansão da agricultura (JUNIOR, 1945).

Com o passar dos anos todos os estados desenvolveram uma forte produção agrícola, despertando o interesse de estrangeiros, fortalecendo ainda mais a agricultura no Brasil. Segundo Sauer et al (2012), o estado do Paraná obteve 5.130 imóveis rurais sob a propriedade de estrangeiros em 2010, perdendo apenas para São Paulo com 12.291.

O crescente interesse por terras agricultáveis e a intensa produção de produtos de origem vegetal, impulsionou a balança comercial, pois segundo dados do Ministério da Agricultura (MAPA, 2018), o saldo de exportação e importação de julho de 2017 foi de 6.715.699 milhões de dólares, na mesma época em 2018 o Brasil obteve um saldo de 7.296.287 em produtos de origem vegetal.

Dos produtos de origem vegetal, os complexos de soja lideraram o *ranking*, sendo os mais exportados em 2018 (MAPA, 2018), e a produção de soja no país segundo dados do IBGE (2018) atingiu 117.225.703 toneladas na safra, perdendo apenas para cana-de-açúcar.

Apesar do rendimento econômico, há também muitas perdas na produção agrícola, podendo ser provocadas por adversidades bióticas, abióticas e por questões de ordem econômica, ocorrendo em qualquer momento, do plantio a pós-colheita (IBEGE, 2004).

Se tratando das condições bióticas, muitos representantes do filo Ascomycota são patógenos de plantas, esses geralmente apresentam características necrotróficas e os principais mecanismos de patogenicidade na planta estão relacionados com a produção de enzimas e toxinas (BERBEE, 2001).

3.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os fungos desempenham diferentes estratégias para obtenção de nutrientes e sobrevivência na planta hospedeira. Segundo Kabbage et al., (2015) podem ser classificados como necrotrófico (levam a morte do tecido de seus hospedeiros, obtendo nutrientes provenientes do material em decomposição), biotróficos (não levam a morte do tecido, mas manipulam o metabolismo da planta a seu favor) e hemibiotróficos que combinam ambas as estratégias.

Sclerotinia sclerotiorum, *Macrophomina phaseolina* e *Botrytis cinerea* se enquadram como fungos necrotróficos (PRESTI et al. 2015), *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, podem causar prejuízos em grandes áreas cultivadas com soja e diferente deles, *B. cinerea* atinge principalmente horticulturas como uva, morango e tomate (FILLINGER e ELAD, 2016).

3.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Esse agente, pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Família Sclerotiniaceae e Gênero *Sclerotinia* (MYCOBANK, 2018). Segundo Kreyci et al. (2016), existem 263 espécies reconhecidas, entre as espécies *S. sclerotiorum* foi identificada pela primeira vez em Ontário, Canadá em 1946 (BOLAND e HALL, 1988). No entanto *S. sclerotiorum* já era estudado desde 1837 (KREYCI et al., 2016).

O patógeno ataca uma variedade de culturas, entre elas destacam-se soja, feijão, ervilha, canola, girassol, alfafa, batata e tomate (BOLTON et al., 2006). Sendo um fungo de patogenicidade inespecífica.

S. sclerotiorum é o agente etiológico do mofo branco da soja e do feijão. A doença causada por esse patógeno também pode ser chamada de podridão branca pois possui um aspecto plumoso e branco, levando ao apodrecimento dos tecidos, causando a necrose e morte das plantas hospedeiras (SAHARAN e MEHTA, 2008; KREYCI, 2016).

Esse agente etiológico pode causar grandes prejuízos no campo. No estudo de meta-análise realizada por Lehner et al. (2017), os autores avaliaram uma perda de 172 Kg ha⁻¹ a cada 10 % de aumento da doença, além disso em todos os tratamentos havia a presença de escleródios.

Os escleródios são agregados de micélios de *S. sclerotiorum*, com capacidade de germinar miceliogenicamente através de um substrato ou hospedeiro, esses são resistentes a condições adversas, mas quando o ambiente está favorável entram em processo de germinação (BARDIN e HUANG, 2001). Esse fungo também germina carpogênicamente, emitindo apotécios que emergem na superfície do solo formando ascas, que liberam ascósporos em condições de alta umidade e temperatura de 20°C (SUMIDA, 2012).

A infecção do tecido foliar e do tronco de plantas saudáveis ocorrem apenas quando os ascósporos germinam e colonizam os tecidos mortos ou senescentes, geralmente partes de flores, como pétalas (HEGEDUS e RIMMER, 2005). Essa infecção por esporos, ocorrem com maior frequência após o início da floração, uma vez que as pétalas são uma fonte de nutrientes e um caminho para a infecção (ROTHMANN et al., 2018).

Além da fácil propagação dos esporos, o que auxilia esse fungo a ter sucesso na colonização, são os escleródios, que sobrevivem no solo em condições adversas, garantindo a presença do patógeno nas safras futuras, sendo um fungo de difícil controle (RAHMAN et al., 2016).

A principal medida de controle da doença consiste na prevenção, evitando a entrada do patógeno na área (PAULA JÚNIOR et al. 2010). Mas, quando o fungo já está no campo, muitas medidas são necessárias para o seu controle, como por exemplo, rotação de culturas, controle químico, biológico e utilização de sementes tratadas com fungicidas (FERRAZ et al., 2003).

3.2.2 *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

Este patógeno pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2018), constituído por apenas uma espécie *M. phaseolina* nomeado por Goidanish (1947). No entanto apresenta uma grande diversidade genética, sendo relatado pela primeira vez em 1927 no Sri Lanka em cultura de girassol (Khan et al., 2007; KHAN et al., 2017).

M. phaseolina é um patógeno fúngico, cosmopolita, necrotrófico que acomete muitas culturas, tais como, soja, feijão, sorgo, milho, algodão e girassol, entre outros (KHAN, 2007; GUPTA, 2012; SHRIVASTAVA, 2017). É o agente da doença podridão de carvão da soja, nomeado assim pelos sintomas na planta em

condições mais severas, pelo escurecimento de raízes e folhas (HEMMATI et al., 2018).

No geral, os sintomas das plantas acometidas por esse patógeno são, escurecimento e avermelhamento das folhas, colo das plantas e tecidos vasculares internos com secagem da folhagem (POPOVIĆ, T. et al., 2018; DOUBLEDEE et al., 2018). A infecção pode ser associada ao modo de reprodução do fungo no ambiente, podendo ocorrer no início da germinação das sementes uma vez que esse patógeno pode estar presente naturalmente no solo (GODOY et al., 2016).

Segundo Sobrinho et al. (2004), *M. phaseolina* se reproduz tanto pelos esporos gerados pelos picnídios quanto pelo desenvolvimento de hifas no estágio esclerocial. Nesse estágio surgem os microesclerócios, que são estruturas de resistência formados por um aglomerado de micélios fúngicos, resistentes a condições adversas e facilmente encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex da planta, sendo de fácil proliferação quando esse tecido se decompõe liberando essas estruturas no solo (ALMEIDA et al., 2014).

Por se tratar de um patógeno com desenvolvimento inicial no solo, a detecção da doença no campo é prejudicada. Para controlar a incidência de doenças, algumas estratégias são necessárias, como o plantio direto e a seleção de cultivares mais resistentes (ISHIKAWA et al., 2018). Contudo, no Brasil não há fungicidas registrados para controle dessa doença e nenhum genótipo foi registrado com sendo resistente, embora haja ocorrências de tolerância (ALMEIDA et al., 2014; BIZARI et al., 2018), o que torna o desenvolvimento de produtos de origem biológica uma alternativa de controle promissora.

3.2.3 *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.

B. cinerea é um fungo pertencente ao Filo Ascomycota, Família Sclerotiniaceae e Gênero *Botrytis* (MYCOBANK, 2018). O gênero foi descoberto por Pier Antonio Micheli em 1729 (ELAD et al., 2007).

Este é um patógeno necrotrófico que coloniza principalmente tecidos de plantas senescentes ou mortas, é o agente causador da doença do mofo cinzento que acomete várias culturas (JARVIS, 1989). Dentre elas, morango, tomate, (KONSTANTINOOU et al., 2014), uva (KOCISIS et al., 2018) e pepino (SANTÍSSIMA-TRINIDAD et al., 2018). Considerado um dos principais problemas em pós-colheita

do morango no Brasil (PARISI et al., 2016). Sendo também encontrado nas flores, folhas, pecíolos e frutos (YU e SUTTON 1998).

No ciclo de vida dos fungos desse gênero pode haver várias fases, se reproduzindo de forma assexuada (Anamorfo), através do desenvolvimento das hifas, produzindo conídios e assim esporos por mitose e uma fase sexuada (Telemorfo) produzindo apotécios, resultando em ascósporos por meiose, nessa fase o fungo é denominado como *Botryotinia* (ELAD et al., 2007).

Um dos estágios de *B. cinerea* é o estado sexual telemorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (ROJAS et al., 2016). No entanto essa conclusão surgiu quando Gregory (1949) localizou no museu internacional de Londres um material original de *Peziza funckeliana*, recoletado por De Bary, ao realizar um estudo, comparou a similaridade dessa espécie com *B. cinerea* (ROJAS et al., 2016).

Segundo Dowling et al. (2018) os esporos sexuais raramente são uma fonte de inóculo que causam a doença do mofo cinzento. Os principais propágulos de *B. cinerea* são conídios produzidos em conidióforos ramificados e as formas de resistência são denominadas de escleródios que podem em condições favoráveis emitir hifas e iniciar uma infecção.

Além da complexidade do ciclo reprodutivo de *B. cinerea* que proporcionam diferentes formas de propagação, a espécie apresenta uma grande variabilidade fenotípica, tanto quanto morfológica, produção de enzimas, patogenicidades e resistência (ROJAS et al., 2016). Esses mecanismos podem proporcionar capacidade de desenvolver rapidamente resistência a fungicidas, tornando cada vez mais difícil o seu controle.

Se tratando do controle desse patógeno, é recomendado a limpeza e destruição das folhas, frutose e folhas infectadas, seguindo de aplicação de fungicidas na pré-colheira (REIS e COSTA, 2011).

3.3 CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Para prevenir a perda da produção agrícola por patógenos muitas técnicas são utilizadas, entre elas, duas se destacam, o uso de sementes transgênicas e a utilização de defensivos agrícolas que são comumente utilizadas de forma complementar, em um sistema de manejo integrado.

Os defensivos agrícolas podem ser classificados em dois grandes grupos, sintéticos ou não sintéticos, provenientes de organismos ou de elementos da natureza. Ambos podem ser introduzidos no cultivo convencional, mas o uso restrito de defensivos biológicos ou não sintéticos é a característica principal de uma produção orgânica.

Durante a primeira metade do século XX, agrotóxicos, fertilizantes químicos, mecanização e melhoramento genético fomentaram mudanças consideráveis na agricultura e no setor produtor de insumos, mas foi na chamada “Revolução Verde” em que houve uma transformação, diminuindo o uso dessas técnicas convencionais para utilizar técnicas mais sustentáveis e inovadoras (MORO, 2012).

Segundo Prabhu (2012) no período da revolução verde entre 1961-2000, houve um grande incremento da produtividade agrícola mundial em várias culturas. Devido a isso, as tecnologias envolvidas nessa conquista vêm sendo desenvolvidas até hoje.

Com o passar do tempo a incidência de resistência de patógenos no campo, a contaminação ambiental e a conscientização da sociedade impulsionaram o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável o que resultou em 1972 na Federação Internacional de Movimentos da Agricultura Orgânica (IFOAM), reunindo mais de 750 organizações em 108 países (MORGERA et al., 2012).

Contudo, demorou um pouco mais para os países começarem a organizar leis, decretos e programas que apoiassem a causa. A Dinamarca, em 1987, foi o primeiro país a introduzir um programa de apoio ao cultivo orgânico, mas o avanço ocorreu mesmo em 1996, quando todos os Estados-Membros da União Europeia, com exceção a Luxemburgo, introduziram políticas de apoio à agricultura biológica (LAMPKIN et al., 1999)

No Brasil, apenas em 2003 foi criada a lei que aprovam o cultivo e a comercialização de produtos orgânicos, e segundo ela, considera-se sistema orgânico de produção a utilização de métodos culturais, biológicos e mecânicos, defendendo a eliminação do uso de materiais sintéticos e organismos geneticamente modificados (BRASIL, 2003).

3.3.1 Controle Químico

Conforme os fungos patogênicos se tornaram um grande problema para os agricultores, a sociedade caminhou para o desenvolvimento de mecanismos que impedisse a sua proliferação e assim para combater esses organismos, inicialmente foi abordado a utilização de minerais como o enxofre e cobre, caindo-se em desuso pelo desenvolvimento de fungicidas sintéticos (GIANESSI e REIGNER, 2005).

Segundo os dados de “*Fungicide Resistance Action Committe*” (FRAC, 2016), há aproximadamente 177 nomes comuns de fungicidas químicos no mercado. E os grupos químicos mais comuns, pertencentes a eles são triazol, carboxamida, cabendazim e estrobirulina.

Esses fungicidas podem ser classificados conforme a sua mobilidade na planta (contato ou sistêmicos), de proteção (preventivos ou curativos) e pelo espectro de ação (Sítio-específico ou múltiplo-sítio). McGrath (2004) descreveu fungicidas de contato como sendo aqueles que permanecem na superfície da planta, sistêmicos para aqueles que penetram no tecido vegetal, sem retornar ao local de aplicação, preventivos como o próprio nome já diz, usados para prevenir uma doença, e curativos para utilizar após a infestação da doença.

Fungicidas sítio-específico possuem um único mecanismo de ação, podendo atingir por exemplo um único ponto da via metabólica de um patógeno. Devido a essa especificidade, os patógenos tendem a desenvolver com mais facilidade resistência e para diminuir esse problema, foi desenvolvido os fungicidas multissítios, que através da combinação de diferentes mecanismos de ação se tornam mais eficazes no controle de doenças (MCGRATH et al. 2004; LIU et al. 2016; RUPP et al. 2017; POPKO et al. 2018).

O grupo químico dos triazóis atuam na biossíntese de esteróis e como consequência, levam ao desequilíbrio dos lipídios na membrana, provocando alterações na sua permeabilidade (RODRIGUES, 2006). Em relação a resistência dos triazóis, Bowyer et al. (2012) elencou alguns fungos resistentes a eles e entre as cepas fúngicas, *Botrytis cinerea* era uma delas.

Apesar dos fungicidas multissítios de origem sintética serem os mais indicados, eles também trazem muitos prejuízos, podendo ser tóxicos para os microrganismos benéficos, para as plantas, animais e humanos. Araujo et al. (2007), analisaram a saúde de agricultores que utilizavam uma variedade de agrotóxicos,

inclusive Mancozeb, e encontraram problemas relacionados com a intoxicação, cefaleia, síndromes neurocomportamentais, entre outros.

Pandey e Mohanty (2015), observaram alterações morfológicas e disfunções da produção de hormônios da tireoide de pássaros selvagens Bangali-vermelho (*Amandava amandava*) após a ingestão de Mancozeb. Por esse motivo, a utilização de produtos de origem biológica é uma alternativa promissora para o controle de fungos fitopatogênicos, por apresentarem baixa ou nenhuma toxicidade, não recalitrância e serem considerados naturalmente multissítios.

3.3.2 Controle Biológico

Controle biológico é o uso de uma população de um organismo para reduzir a população de outro organismo (VAN LENTEREN et al., 2018). Os agentes de controle biológico (ACB), são representados pelos insetos, microrganismos e plantas. Esses agentes podem exercer vários mecanismos de controle, mas os principais são: antibiose (produção de compostos antimicrobianos), competição por nutrientes e espaço, indução de resistência, parasitismo e predação (DI FRANCESCO et al., 2016).

Dentre os ACB, os microrganismos são frequentemente utilizados e estudados, pelos inúmeros benefícios gerados na associação com o vegetal, favorecendo o crescimento de plantas por fornecer nutrientes e fatores de crescimento, ou por produzir antibióticos que antagonizam os microrganismos fitopatogênicos (BULGARI et al. 2011; BONATELLI 2012; PASSARI et al. 2017)

Devido aos benefícios gerados pela utilização dos ACB, e pelo crescente desenvolvimento do mercado em relação a produção de biológicos, se tem atualmente cerca de 209 cepas microbianas sendo, 94 espécies pertencentes a produtos comerciais registrados no Brasil, Austrália, Canadá, União Européia, Japão, Nova Zelândia e Estados Unidos da América (VAN LENTEREN et al., 2018).

Das cepas microbianas registradas, a maioria são bactérias e muitos gêneros são encontrados com frequência na rizosfera e dentro das plantas exercendo um papel de simbiose harmônica, como é o caso dos gêneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* (AZEVEDO 1998; COMPANT et al. 2005; HAO, et al. 2016).

O gênero *Pseudomonas spp* são comumente agentes de biocontrole devido a diversidade de metabólitos produzidos com atividade antimicrobiana. Como, por exemplo, o ácido fenazina-1-carboxílica, responsável pela inibição de *Botrytis cinerea* (SIMONATO et al. 2017) e o composto do tipo pirole responsável pela inibição de *S. sclerotiorum* (BAJPAI et al., 2017).

De forma similar *Burkholderia spp.* também tem-se destacado no controle de doenças agrícolas. A partir de uma bioprospecção, JUNG et al. (2018) isolou o ABC, *Burkholderia cepacia* cepa JBK9, como sendo responsável pela produção de pirrolnitrina, principal molécula inibidora dos fungos *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*.

Assim como os gêneros comentados acima, *Bacillus spp.* produzem vários metabólitos secundários, sendo a grande maioria de origem peptídica. Essas são divididas em dois grupos sendo aquelas sintetizadas pelos ribossomos e de forma não ribossômica (FIRA et al., 2018). No entanto a maioria dos metabólitos antifúngicos se enquadram como não ribossomais, como os lipopeptídeos (ZHAO et al., 2013). Além destes, outros compostos também podem ser produzidos com ação antifúngica como por exemplo os voláteis (GOTOR-VILA et al., 2017).

3.4 GÊNERO *BACILLUS*

De acordo com o banco de dados “*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*”, existem atualmente 377 espécies do gênero *Bacillus* e 8 subespécies. Esse gênero pertence ao reino Bacteria, filo Firmicutes, classe Bacilli e ordem Bacillales, foi descrito primariamente por Cohn (1872), quem nomeou a espécie tipo como *Bacillus subtilis* (DORIGHELLO et al., 2017).

Estes microrganismos são caracterizados como Gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, produtores de enzima catalase, crescem em substratos com variadas fontes de carbono e formam endósporos como estrutura de resistência em períodos de estresse ambiental (MADIGAN et al., 2016).

Esse gênero possui uma ampla distribuição, sendo possível encontrá-los em ambientes variados e em condições abióticas distintas. Souza et al. (2011), isolaram 64 microrganismos de ambientes da Antártica, com potencial para biocontrole. Destes, 43.75 % corresponderam ao gênero *Bacillus*. Já Romano (2015) prospectou na região do Cerrado microrganismos com interesse biotecnológico para produção

de antimicrobianos, antitumorais e antiparasitários, dos 20 isolados de interesse, 15 eram *Bacillus* endofíticos.

Na região do Himalaia Indiana, em 3979-5359 metros de altitude, com temperatura entre -10 e 15°C, pH de 6.5-8.9, Yadav et al. (2016) recuperou 247 *Bacillus* de amostras de solo e água, para avaliar a promoção de crescimento de plantas.

O desenvolvimento de produtos a partir desses microrganismos estão cada vez mais ganhando espaço nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e agrícola. Este gênero contém uma grande variedade de espécies de interesse biotecnológico, tais como: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* e *B. velezensis*, que são as espécies mais estudadas para produção de antimicrobianos (LOPES et al., 2018).

No estudo de Vinodkumar et al. (2017), duas cepas de *B. amyloliquefaciens* e uma de *B. subtilis* inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum*. Já no estudo de Masmoud et al. (2017), através da otimização do meio de cultura para *B. amyloliquefaciens* BLB371, conseguiram resultados promissores no controle de vários fungos fitopatogênicos.

Esse gênero, contempla a capacidade de produção de uma variedade de metabolitos antifúngicos, dentre eles, os mais encontrados na literatura são lipopeptídeos, tais como surfactinas, iturinas e fengincinas (YU et al. 2002; JI et al. 2013; VELANDIA 2018).

Além dos lipopeptídeos, espécies desse gênero podem produzir enzimas, peptídeos entre outros compostos antifúngicos. Liu et al. (2011) isolaram uma cepa de *B. subtilis* com capacidade para inibir o fungo *Rhizoctonia solani* no tomate pela ação da quitinase. Já Mora et al. (2011) demonstraram que, entre os 184 isolados de *Bacillus*, a maioria apresentou genes associados a produção de peptídeos antifúngicos.

Gacitúa et al. (2009), ao isolar algumas espécies de *Bacillus*, notaram que quatro se destacavam pela a inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* e que, os metabolitos responsáveis pela inibição, estavam relacionados com compostos voláteis.

B. velezensis possui uma ampla atividade metabólica e de grande interesse biotecnológico, devido a capacidade antimicrobiana pela produção de lipopeptídeos

e biosurfactantes, além de auxiliar no crescimento de plantas (CAO et al. 2018, LIU et al. 2010).

3.4.1 *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis foi identificado pela primeira vez por Garcia- Ruiz et al. (2005), em Málaga no sul da Espanha. Vélez é o rio onde foi encontrado e deu inspiração ao nome. A espécie *B. velezensis* sp. nov. foi caracterizada como sendo uma bactéria Gram-positiva, que cresce bem em temperatura de 15 á 45 C° e pH entre 5 e 10, produtora de endósporos, quimiorganotrófica e sem crescimento em anaerobiose.

Em 2005 a bactéria foi registrada pela primeira vez, no entanto com os avanços da tecnologia de sequenciamento e com a otimização das ferramentas de bioinformática, pode-se observar que algumas bactérias registradas antes como outra espécie na verdade eram *B. velezensis* (WANG et al. 2008; DUNLAP et al. 2016; PAN et al. 2017; CAI et al. 2017).

Em análises de predição do genoma a espécie possui genes relacionados a produção de metabólitos antimicrobianos, como fengicina, iturina, Bacilaene, surfactina, bacilibactin entre outras, mostrando um potencial biotecnológico (CAI et al. 2017). Além disso, dois isolados de *B. velezensis*, Y6 e F7, demonstraram atividade contra *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* associada aos lipopeptídeos fengincina e iturina, sendo esse último o principal responsável pela ação antifúngica (CAO et al., 2018).

Em experimentos de campo, *B. velezensis* RC 218, controlou *Fusarium graminearum* no cultivo de trigo. Através das análises do genoma e de purificação, ericina foi identificada como sendo o metabólito responsável por essa inibição (PALAZZINI et al., 2016)

Gao et al. (2016), observaram compostos voláteis inibindo um espectro maior de fungos fitopatogênicos, como: *Alternaria solani*, *B. cinerea*, *Valsa mali*, *Monilinia fructicola*, *F. oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Dos 29 compostos voláteis encontrados, pirazina (2,5-dimetil) foi o mais efetivo contra *B. cinerea* e *A. solani*.

Um resultado similar foi encontrado por Lim et al. (2017). No entanto, além dos compostos voláteis, metabólitos difusíveis também foram registrados como

antifúngicos em experimentos *in vivo* com *B. velezensis* G341, controlando os agentes: *Magnaporthe oryzae* em plantas de arroz, *R. solani* em plantas de arroz; *B. cinerea* em tomateiro; *Phytophthora infestans* também em tomateiro; *Puccinia recondita* em plantas de trigo; *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* em plantas de cevada e *Colletotrichum coccodes*, em plantas de pimenta vermelha. Os compostos voláteis foram avaliados *in vitro*, e entre eles dimetilsulfóxido, 1-butanol e 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), foram produzidos por essa cepa.

B. velezensis pode também produzir enzimas com atividade antifúngica, Xu et al. (2016), conseguiram purificar β -1, 3-1, 4-glucanase, enzima que apresentou atividade antifúngica contra *Cryphonectria parasítica*, *Helicobasidium purpureum* e *Cylindrocladium quinquesepatum*.

Além da capacidade de inibir fungos fitopatogênicos, espécies de *Bacillus* podem ser associadas a promoção de crescimento de plantas. Meng et al. (2016), aplicaram *B. velezensis* BAC03 em rabanete, beterraba, cenoura, pepino, abóbora e tomate. Em todas as plantas testadas houve uma melhora no crescimento, sendo a produção de ácido indol-3-acético (AIA) e NH_3 responsável pelo resultado.

Alguns produtos biológicos utilizando *B. velezensis* já existem no mercado, o produto comercial para controle biológico Serenade® (Bayer CropScience Inc., Monheim, Alemanha) anteriormente referido como *B. subtilis* é um deles (PANDIN et al., 2018), além de RhizoVital42® (ABiTEP GmbH Inc., Berlim, Alemanha), anteriormente conhecido como sendo *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 (DUNLAP et al., 2016).

4. ARTIGOS

ARTIGO 1



genomeAnnouncements™

PROKARYOTES



Complete Genome Sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an Effective Antagonist of Fungal Plant Pathogens

Julia Pezarini Baptista,^a Paula Pinheiro Sanches,^a Gustavo Manoel Teixeira,^a Alexandre Tadachi Morey,^a Eliandro Reis Tavares,^a Sueli Fumie Yamada-Ogatta,^a Sérgio Paulo Dejato da Rocha,^a Mariangela Hungria,^b Renan Augusto Ribeiro,^b Maria Isabel Balbi-Peña,^c Roberta Torres Chideroli,^d Ulisses de Padua Pereira,^d Admilton Gonçalves de Oliveira^{a,e}

^aDepartment of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

^bEmbrapa Soja, Soil Biotechnology Laboratory, Londrina, Paraná, Brazil

^cDepartment of Agronomy, UEL, Londrina, Paraná, Brazil

^dDepartment of Preventive Veterinary Medicine, UEL, Londrina, Paraná, Brazil

^eLaboratory of Electron Microscopy and Microanalysis, UEL, Londrina, Paraná, Brazil

ABSTRACT *Bacillus velezensis* strain LABIM40 holds high potential for biological control of plant pathogens. Its complete genome contains one chromosome of 3,972,310 bp with 3,777 DNA coding sequences and displays 33 gene clusters potentially involved in the suppression of fungal pathogens.

The increasing demand for safe and sustainable food supplies requires an efficient control of the major plant diseases. Current management practices are largely based on the application of synthetic pesticides, but their massive use has caused serious environmental impact and human and animal health concerns. Therefore, there is need for new environmentally friendly technologies and products to replace partly or fully chemical-based pesticides, contributing to safer crop disease control (1).

The use of plant pathogen antagonists for biological control has increased significantly, particularly in the last decade. Aerobic endospore-forming bacteria, such as *Bacillus* spp., are present in soil microbial communities and are known to produce structurally diverse metabolites with various biological effects, including antimicrobial activity against plant pathogens and other plant growth-promoting properties (2). The metabolites produced by *Bacillus* spp. include aminoglycosides, polyketides, and several small ribosomally and nonribosomally synthesized peptides, such as bacteriocins, oligopeptides, and lipopeptides, all of which have important roles in suppressing fungal diseases (3–5).

In this study, we report the complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, isolated as an antagonist contaminant of *Fusarium oxysporum* *in vitro* in the city of Londrina, Brazil; the strain was deposited at the Microbial Collection of the Microbial Biotechnology Laboratory, Universidade Estadual de Londrina. The cell-free supernatant of the bacterium strongly inhibits the growth of the important fungal plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, and *Macrophoma phaseolina* (6), confirming its high biotechnological potential for biological control.

The Gentra Puregene genomic DNA kit (Qiagen, Brazil) was used for genomic DNA extraction. The *B. velezensis* LABIM40 genome was sequenced on the MiSeq platform, using a MiSeq version 3 reagent kit (600-cycle, Illumina, Brazil) at Embrapa Soja, Londrina. After we sequenced them, the reads were subjected to trimming and filtering using CLC Genomics Workbench version 10.0. Reads with an average Phred quality value of less than 30 and with one or more ambiguities were removed; reads smaller than 50 bp, as well as the last 10 nucleotides of the 3' end of each read, were also

Received 25 May 2018 Accepted 25 May 2018 Published 21 June 2018

Citation Baptista JP, Sanches PP, Teixeira GM, Morey AT, Tavares ER, Yamada-Ogatta SF, da Rocha SPD, Hungria M, Ribeiro RA, Balbi-Peña MI, Chideroli RT, Pereira UDP, de Oliveira AG. 2018. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an effective antagonist of fungal plant pathogens. *Genome Announc* 6:e00595-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00595-18>.

Copyright © 2018 Baptista et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Admilton Gonçalves de Oliveira, admilton@uel.br.

Downloaded from <http://genomea.asm.org/> on June 21, 2018 by guest

removed. Sequencing allowed a genome coverage of 212-fold, assembled into 19 contigs with CONTIGuator software (7). The genome was compared with other genomes of the same species, and the gaps were removed with recursive rounds of short reads mapped against the scaffold (8). The annotation was created using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). The genome was estimated at 3,972,310 bp, with a G+C content of 46.5%, and the average nucleotide identity with its closest strain, *B. velezensis* S141 (9), was 99.1%. The genome of LABIM40 harbors 3,777 DNA coding sequences, 7 rRNA operons, 75 tRNAs, and 105 pseudogenes. Thirty-three putative gene clusters responsible for secondary metabolite biosynthesis were identified by using antiSMASH version 4.1.0 (10). Among them, we can highlight thiopeptides, polyketide synthase antibiotics, nonribosomal peptide synthetase antibiotics, bacteriocins, and terpenes, which may be responsible for the antifungal activity. The genome of *B. velezensis* LABIM40 may help to explore the metabolic pathways related to its antimicrobial activity, emphasizing its biotechnological potential.

Accession number(s). This whole-genome project was deposited at the DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number [CP023748](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty023) (BioProject PRJNA412668, BioSample SAMN07722662). The version described in this paper is the first version, CP023748.1.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the financial support from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), the Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FAPPR), and the Simbiose-Agro Company. S. F. Yamada-Ogatta and M. Hungria were supported by a research fellowship from CNPq. E. R. Tavares was supported by a postdoctoral fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture. *Curr Opin Biotech* 22:187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>.
- McSpadden Gardener BB. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94:1252–1258. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>.
- Finking R, Marahiel MA. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* 58:453–488. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615>.
- Tareq FS, Lee MA, Lee H-S, Lee Y-J, Lee JS, Hasan CM, Islam MT, Shin HJ. 2014. Non-cytotoxic antifungal agents: isolation and structures of gageopeptides A–D from a *Bacillus* strain 109GGC020. *J Agric Food Chem* 62:5565–5572. <https://doi.org/10.1021/jf502436r>.
- Walsh CT. 2008. The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Acc Chem Res* 41:4–10. <https://doi.org/10.1021/ar7000414>.
- Baptista JP, Sanches PP, Higashi A, Gonçalves RM, Balbi-Peña MI, de Oliveira AG. 2017. Biocontrol potential of *Bacillus* sp. LABIM40 strain against plants pathogenic fungi, abstr 0542. Abstr 50th Brazilian Congress of Phytopathology, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, 21–23 August 2017.
- Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. 2011. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med* 6:11. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11>.
- Tsai IJ, Otto TD, Berriman M. 2010. Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. *Genome Biol* 11:R41. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-4-r41>.
- Sibponkrung S, Kondo T, Tanaka K, Tittabutr P, Boonkerd N, Teaumroong N, Yoshida K. 2017. Genome sequence of *Bacillus velezensis* S141, a new strain of plant growth-promoting rhizobacterium isolated from soybean rhizosphere. *Genome Announc* 5(48):e01312-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01312-17>.
- Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. 2015. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 43:W237–W243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv437>.

ARTIGO 2

Potencial de *Bacillus velezensis* LABIM40 no controle de fungos fitopatogênicos: Uma abordagem *in silico* e avaliação *in vitro*

Julia Pezarini¹; Maria Isabel Balbi Peña²; Admilton Gonçalves de Oliveira¹ *

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

* Autor para correspondência: Admilton Gonçalves de Oliveira, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. CEP 86051-990, Londrina, Brasil. admilton@uel.br

Resumo

O desenvolvimento de produtos biológicos vem crescendo devido a vários fatores, entre eles a conscientização ambiental e a resistência de patógenos causada por muitos produtos químicos sintéticos. Dentre os gêneros estudados para o desenvolvimento de produtos biológicos. *Bacillus* spp. tem se destacado pela produção de muitas moléculas antimicrobianas. Nesse contexto, o potencial antifúngico de *B.velezensis* LABIM40 foi explorado pela predição *in silico* dos metabólitos secundários e pelos testes de atividade *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos: *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolina* (MP) e *Botrytis cinerea* (BC). As melhores condições de cultivo, a estabilidade aos valores de temperatura, pH e luz e a concentração inibitória mínima (CIM) foram parâmetros avaliados pelos testes *in vitro* e para visualizar o efeito do sobrenadante de LABIM40, um disco de micélio fúngico de SS foi analisado em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados *in silico* indicaram que LABIM40 possui metabolitos com potencial antifúngico. Os dados dos testes *in vitro* reforçaram o observado no teste anterior, com atividade antifúngica ao inibir mais de 60 % os fungos testados, não perdendo a atividade nos ensaios de estabilidade. Os dados da CIM foram 1,2% para SS, 2,5% MP e 20% para BC e alterações estruturais nas hifas de SS ao ser tratada com o sobrenadante livre de células também foram visualizadas, concluindo que *B. velezensis* LABIM40 é um agente de biocontrole que pode ser utilizado no controle de fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: *Bacillus* sp. Caracterização biológica. Antimicrobianos. Antagonismo. Predição

ABSTRACT

The development of biological products has been growing due to various factors, among which are environmental awareness, the search for healthier products and the resistance to pathogens caused by many synthetic chemical products. Among the studied genera related to the development of biological products, the *Bacillus* spp. have been standing out for its production of many antimicrobial molecules. In this context, the *B.velezensis* LABIM40's antifungal potential was explored by *in silico* prediction of the secondary metabolites and by *in vitro* activity tests against the phytopathogenic fungi: *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolina* (MP) and *Botrytis cinerea* (BC). The best cultivation conditions and stability of values of temperature, pH and light, as well as the minimal inhibition concentration (MIC), were parameters evaluated by *in vitro* tests. To visualize the effect of LABIM40's supernatant, a disk of SS fungal mycelium was analyzed in Scanning Electron Microscopy (SEM). The results *in silico* indicated that LABIM40 has metabolites with antifungal potential. The data from the tests *in vitro* reinforced the data above, showing antifungal activity by inhibiting more than 60% of the tested fungi, not losing activity on the stability tests. The MIC data was 1,2% for SS, 2,5% for MP and 20% for BC. Structural alterations on SS's hyphae when treated with free supernatant from cells was also observed, concluding that *B. velezensis* LABIM40 is a biocontrol agent that can be utilized in the control of phytopathogenic fungi.

Keywords: *Bacillus* sp. Biological characterization. Antimicrobials. Antagonism. Prediction

1 Introdução

O aumento do uso de pesticidas químicos se deve principalmente pela necessidade de controlar doenças de plantas cada vez mais agressivas, estratégia muito usada durante anos para evitar as perdas na produtividade agrícola (ECOBICHON et al. 2001; OERKE, et al. 2005). No entanto, com o passar do tempo, inúmeros fatores como, a resistência de patógenos (MA et al. 2009; GEPP et al. 2012) a contaminação do meio ambiente, (ESTÉVEZ et al. 2007; TOSI et al. 2018), e os prejuízos para a saúde humana (CREMONESE et al., 2017), incentivaram o desenvolvimento de pesticidas orgânicos.

Dentre os pesticidas orgânicos, os microrganismos por estarem naturalmente no ambiente, se tornaram uma alternativa promissora para o biocontrole (TIMMUSK et al., 2017). São vários os gêneros estudados para atuar como agentes de biocontrole, no entanto, o gênero *Bacillus* se destaca devido a sua capacidade de sintetizar uma vasta gama de substâncias benéficas para fins agrônômicos e industriais além de serem resistentes a altas temperaturas ao formar endósporos (FRITZE, et al., 2004; PEREZ, et al., 2017).

Bacillus velezensis possui a capacidade de produzir vários compostos antifúngicos, como lipopeptídeos (MEENA et al., 2018), enzimas (XU et al., 2016) e compostos voláteis (LIM et al., 2017), além de promover o crescimento em plantas (FAN et al., 2018), sendo um importante agente com potencial biotecnológico.

O processo de identificação desse gênero está evoluindo (DUNLAP et al., 2016), pois novos métodos de sequenciamento e comparações estão sendo utilizados (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013), além de ferramentas que possibilitam o conhecimento dos metabólitos envolvidos em aplicações biotecnológicas (WEBER et al., 2015). Nesse contexto, temos como objetivo, explorar o potencial biotecnológico e caracterizar a atividade dos compostos antifúngicos produzidos pela cepa *Bacillus velezensis* LABIM40, utilizando uma abordagem *in silico* e estudos *in vitro* contra fungos patogênicos de plantas.

2 Materiais e métodos

2.1 Microrganismos e condições de crescimento

A cepa bacteriana LABIM40 foi isolada como sendo um contaminante antagonista em uma placa de cultivo fúngico. O genoma foi sequenciado e anunciado por

Baptista et al., (2018) como sendo *Bacillus velezensis* e o cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen foi registrado sob nº A7DAEBE (Anexo). A cepa, foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB), (Acumedia, EUA) a 28 °C e armazenada no mesmo meio com 40% de glicerol (Synth, BRASIL) a -80 °C. Os isolados fúngicos de *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) *Macrophomina phaseolina* (MP) e *Botrytis cinerea* (BC), foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (Acumedia, EUA) a 25 °C com fotoperíodo de 12h e armazenados no mesmo meio á 4 °C. Todos os microorganismos estão armazenados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (Londrina, Paraná, Brasil).

2.2 Comparação do genoma e predição de metabólicos secundários

Uma análise filogenômica foi realizada utilizando o programa *Gegenees*, os dados de similaridade obtidos por essa análise foram exportados para o programa *SplitsTree4* para montagem da árvore filogenômica.

A comparação do genoma entre LABIM40 (BAPTISTA et al. 2018) e outros genomas de *Bacillus* foram realizadas utilizando ANI (Average Nucleotide Identity), através da *web server ANI Calculator* fornecido pelo servidor Kostas Lab (RODRIGUEZ & KONSTANTINIDIS, 2016) e pelo parâmetro de dDDH % (DNA-DNA digital hybridization) através do *web server GGDC* (Genome-to-Genome Distance Calculator) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2014).

Para representar o genoma circular da cepa LABIM40 e comparar com o genoma de 4 cepas com potencial biotecnológico já descrito na literatura (FZB42, QST713, SQR9 e TrigoCor 1448), foi utilizado o programa BRIG (ALIKHAN et al., 2011). A identificação das possíveis BGCs (*Biosynthetic gene clusters*) foram obtidos através do *web server antiSMASH 4.0* (WEBER et al., 2015).

2.3 Ensaio de cultura dupla

Em um ensaio de cultura dupla *in vitro*, LABIM40 foi submetida a avaliação da antibiose contra SS, MP e BC, em meio BDA, (Acumedia, EUA). Para isso, uma amostra de 0,6 cm de diâmetro contendo micélio dos fungos indicadores foram adicionados no centro de uma placa de petri. A cepa antagonista LABIM40 foi inoculada na placa a uma distância de 2,5 cm do fungo. A percentagem de inibição do crescimento foi avaliada após 3-5 dias usando o seguinte cálculo:

$$\text{ICM (\%)} = \left[\frac{dc - dt}{dc} \right] \times 100$$

Onde, 'ICM' representa a porcentagem de inibição do crescimento micelial, 'dc' diâmetro médio da colônia no controle e 'dt', diâmetro médio da colônia de cada tratamento, todos medidos em mm (YAHYAZADEH et al., 2008). Para cada fungo, quatro repetições foram realizadas em dois experimentos independentes e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4 Produção de metabólitos antifúngicos

LABIM40 foi ativada e subcultivada em meio LBA (Luria Bertani ágar), (Acumedia, USA) a 28 °C por 24 h. Para o preparo do pré-inóculo, colônias foram suspensas em solução salina (cloreto de sódio a 0,85%, p / v) e ajustadas em uma suspensão de 0,5 McFarland, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia mL⁻¹ (UFC mL⁻¹). Para o preparo do inóculo, 0,1% (v / v) dessa suspensão de células foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de caldo LB (Acumedia, EUA), esses foram incubados por 24 horas a 25 °C em 125 rpm (agitador orbital Thoth 6430B, Brasil). Após esse período, para produção dos metabólitos de interesse uma alíquota de 1% (v / v) foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL do meio em estudo:

M1 (g/l): triptona, 10; extrato de levedura 5; NaCl 5, pH 7,1.

M2 (g/l): triptona 12,4; glicose 20; NaCl 5; K₂HPO₄ · 3H₂O 1,5; MnSO₄ · H₂O 0,04; FeSO₄ · 7H₂O 1,67; MgCl₂ · 6H₂O 1,22; pH 7,1.

Todos os meios de cultura foram da marca Acumedia (EUA) e os reagentes da marca Synth (BRASIL). A cepa LABIM40, foi cultivada nesses meios por 72 horas, 25 °C a 150 rpm (agitador orbital Thoth 6430B, Brasil). Após esse período, a cultura foi centrifugada por 15 min, 6450 g a 4 °C (Hitachi, CR21G Himac) para obtenção do sobrenadante livre de centrifugado (SC). Para avaliar a atividade antifúngica do sobrenadante, amostras foram testadas pelo método de difusão em ágar contra SS, MP e BC.

2.5 Atividade antifúngica do sobrenadante livre de células

Para avaliação da atividade antifúngica, alíquotas do SC foram esterilizadas por filtração em filtro de celulose com tamanho de poro de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA). Um disco de ágar contendo micélio fúngico (0,6 cm de diâmetro) foi retirado de

placas com 6 dias de cultivo, o disco foi transferido ao centro de placas com BDA (Acumedia, USA). Simetricamente, em uma distância de 2,5 cm do centro da placa, quatro poços receberam 200 µl do SLC (sobrenadante livre de células) obtido por filtração. O meio de cultura estudado foi considerado controle. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h e a porcentagem de inibição do crescimento foi medida após 3 - 5 dias avaliadas de acordo com o item 2.3. Para cada fungo oito repetições foram realizadas em três experimentos independentes e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.6 Avaliação da atividade antifúngica durante o crescimento de *B. velezensis* LABIM40

Todos os procedimentos antecedentes a produção dos metabólitos de interesse, como ativação, subcultivo, preparo do pré- inóculo e inóculo, descrito no item 2.5, se repete para a avaliação da cinética do crescimento microbiano e atividade da cepa LABIM40, no entanto para esse teste e os demais, o meio M2 foi escolhido para produção dos metabólitos de interesse.

Para determinação da atividade antifúngica e do crescimento bacteriano, as amostras foram removidas em intervalos de 12 horas por um período de 72 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado por contagem celular (UFC / mL) de alíquotas de diluições seriadas no fator 1:10, em solução salina a 0,85% e cultivadas em ágar MYP (Acumedia, USA), não suplementado, a 28 °C por 24h. Foram realizadas 3 repetições por tempo em 2 experimentos independentes.

Para avaliar a atividade antifúngica, um disco de ágar contendo micélio dos fungos de interesse, foram retirados de placas com 6 dias de cultivo, o disco foi transferido para o centro de placas com BDA (Acumedia, EUA). Simetricamente, em uma distância de 2,5 cm do centro da placa, poços foram feitos e 200 µl do SLC foram transferidos para os poços. As placas então, foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h e a % ICM foi medida após 3 - 5 dias, avaliadas de acordo com o item 2.3. Para cada fungo oito repetições foram realizadas em dois experimentos independentes.

2.7 Efeito da temperatura, pH e luz no sobrenadante de *B. velezensis* LABIM40

Para determinar a estabilidade térmica, alíquotas do SC foram mantidas a temperaturas constantes de 70 (Banho Maria, TECNAL, Brasil) e 100 °C, por 30 minutos e 121 °C por 15 min (Autoclave, Primatec, Brasil), uma alíquota sem tratamento térmico foi considerada como controle. Após o tratamento, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente (28 °C), esterilizadas com filtro de celulose com poro de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e testadas de acordo com o item 2.3. O experimento foi realizado três vezes com oito repetições cada e uma análise de regressão linear ($p < 0,05$) foi utilizada para representação dos dados

Para avaliar a estabilidade as variações de pH, foi utilizado a metodologia descrita por Liu et al. (2007). Alíquotas do SC foram ajustadas na faixa de pH 3,0-11,0 usando HCl 2 M ou NaOH 2 M, mantidos a 4 °C por 24 h, após esse período, as amostras foram reajustadas para 7,0, filtradas para esterilização e testadas de acordo com o item 2.3. O teste foi conduzido em 2 experimentos independentes com 4 réplicas cada, com análise descritiva.

A estabilidade do sobrenadante a radiação ultravioleta (365 nm) e luz branca, foi avaliada de acordo com Ji et al. (2013) com adaptações, utilizando uma placa de petri com 20 mL do SC, exposto nos respectivos comprimentos de luz por 12 horas a uma distância de 15 cm. O sobrenadante estocado ao abrigo da luz serviu como controle e após os tratamentos as amostras foram esterilizadas por filtração e testadas de acordo com o item 2.3. Seis repetições foram realizadas em dois experimentos independentes. O experimento foi avaliado de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

2.8 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pelo teste de macrodiluição em ágar, para isso, após a produção em meio M2, o sobrenadante foi incorporado separadamente em meio BDA (Acumedia, EUA) nas concentrações de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,15 e 0,07%, placas sem o sobrenadante foram consideradas como controle. Para esterilização, as soluções foram autoclavadas e em seguida, vertidas em placas de 60 mm, um disco de micélio fúngico foi adicionado ao centro. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h e avaliadas de acordo com o item 2.3. O ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos distintos e os dados foram

submetidos a uma regressão logística para avaliar a dose efetiva (ED) de 50 e 90% da inibição do crescimento micelial.

2.9 Avaliação estrutural

Para caracterização estrutural da colônia e das células de *B. velezensis* LABIM40, uma colônia inteira crescida em meio LB ágar (Acumedia, EUA) por 48 h foi fixada por imersão em solução fixadora (glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2), pós-fixadas em OsO₄ a 1% e desidratadas em série de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%).

Para avaliar a morfologia dos micélios fúngicos tratados com o SLC, amostras de 0,7 mm foram retiradas da região entre o crescimento fúngico e a zona de inibição (ensaio 2.5). As amostras foram fixadas por imersão em solução fixadora (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (Electron Microscopy Sciences, USA), pós-fixadas em OsO₄ (Electron Microscopy Sciences, USA) a 1% e desidratadas em série de etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (Synth, Brasil). Todas as amostras (colônia bacteriana e micélio fúngico) foram secas ao ponto crítico com CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer, Holanda), revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater, Holanda) e observadas em MEV (microscópio electrónico de varredura), (FEI Quanta 200, Holanda).

3 Resultados

3.1 Comparação do genoma e predição de grupos metabólicos secundários

O resultado da análise filogenômica mostrou que *B. velezensis* LABIM40 (Figura 1) e outras cepas dessa mesma espécie estão próximas ao grupo *B. amyloliquefaciens* e ambos estão relacionados ao grupo dos *B. subtilis*. Entre as cepas de *Bacillus* selecionadas para análise de similaridade dDDH e ANI apresentados na Tabela 1, demonstraram que, a cepa S141 e NKG-1, são as mais similares com LABIM40, e as cepas NCIB3610 e 168, as mais divergentes pelos mesmos parâmetros de comparação. O DNA circular de LABIM40 (Figura 2), foi comparado com cepas de potencial biotecnológica já descrito. Sendo possível observar muitas regiões similares e lacunas de regiões distintas, demonstrando sequencias exclusivas de LABIM40 quando comparado com as cepas de referência.

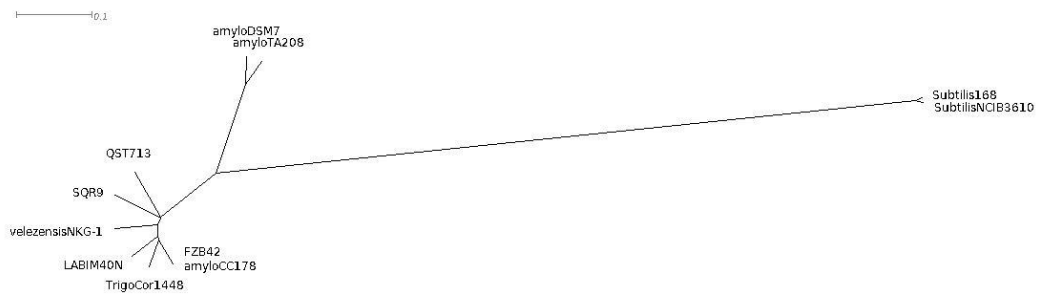


Figura 1: Relação filogenômica de LABIM40 com as cepas FZB42, CC178, TrigoCor 1448, NKG-1, SQR9, QST713, DSM7, TA208, 168 e B3610, todas disponíveis no *GenBank*.

Tabela 1: Comparação do genoma de LABIM40 com cepas do gênero *Bacillus*

Cepas	Nº de acesso no <i>GenBank</i>	dDDH %	ANI (%)	GC (%)	Bp (Gb)	Fonte
<i>B. velezensis</i>						
LABIM40	NZ_CP023748.1	100	100	46.50	3.97	Contaminante (Baptista et al. 2018)
S141	AP018402.1	92.30	99.10	46.50	4.03	Rizosfera de soja (Sibponkrung et al. 2017)
TrigoCor1448	CP007244.1	90.70	98.95	46.50	3.95	Rizosfera de trigo (Nelson et al. 2014)
NKG-1	CP024203.1	91.10	98.95	46.30	4.19	Solos vulcânicos nas montanhas de Changbai (Ge et al. 2016)
FZB42	NC_009725.1	91.00	98.87	46.50	3.91	Rizosfera de beterraba (Chen et al. 2009)
QST713	NZ_CP025079.1	88.10	98.64	45.90	4.23	Cepa comercial usada no produto (Serenade® : Bayer, SERENE100/40) (Pandín et al. 2018)
SQR9	CP006890.1	86.00	98.29	46.10	4.11	Rizosfera do milho (N. Zhang et al. 2015)
UCMB5033	NC_022075.1	90.40	98.82	46.20	4.07	Região endofítica de algodão (Niazi et al. 2014)
UCMB5036	NC_020410.1	89.00	98.64	46.20	3.91	Região endofítica de algodão (Manzoor et al. 2013)
Y2	NC_017912.1	85.10	98.26	45.90	4.23	Rizosfera de trigo (Hao et al. 2012)
<i>B. amyloliquefaciens</i>						
CC178	NC_022653.1	91.00	98.88	46.50	3.91	Filosfera de pepino (Kim et al. 2015)
DSM7T	NC_014551.1	55.60	93.61	46.10	3.98	Não especificado (Rückert et al. 2011)
TA208	CP002627.1	55.20	93.56	45.80	3.93	Gerado por Mutagênese convencional (Zhang et al. 2011)
<i>B. subtilis</i>						
NCIB 3610	CP020102.1	20.70	80.16	43.34	4.29	Solo (Nye et al. 2017)
168	NC_000964.3	20.70	80.11	43.50	4.21	Microrganismo modelo (Kunst et al. 1997)

Legenda: dDDH= Hibridização digital DNA-DNA, ANI = Identidade média de nucleotídeos, GC = Guanina e Citosina, Bp= Pares de bases, Gb = Gigabase.

Os dados provenientes das análises de antiSMASH mostraram 33 BGCs identificadas no genoma da cepa LABIM40 (Tabela 2 e Figura 2). Entre esses, dois clusters codificadores da TransATPKS (trans-Acyl Transferase Polyketide Synthetase), um NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase), dois codificadores Trans ATPKS-NRPS, dois Terpenos, um Tiopeptídeo, um cluster codificando Bacteriocina-NRPS. Além de 11 clusters possivelmente relacionados a síntese de Surfactina, Butirosina, Citrulina, Macrolactina, Bacillaene, Fengicina, Dificidina, Bacilibactina, Bacilisina, Ácido Teucurônico e Molibdênio e 13 BGCs relacionados a biossíntese de metabólitos secundários ainda não identificado pela base de dados.

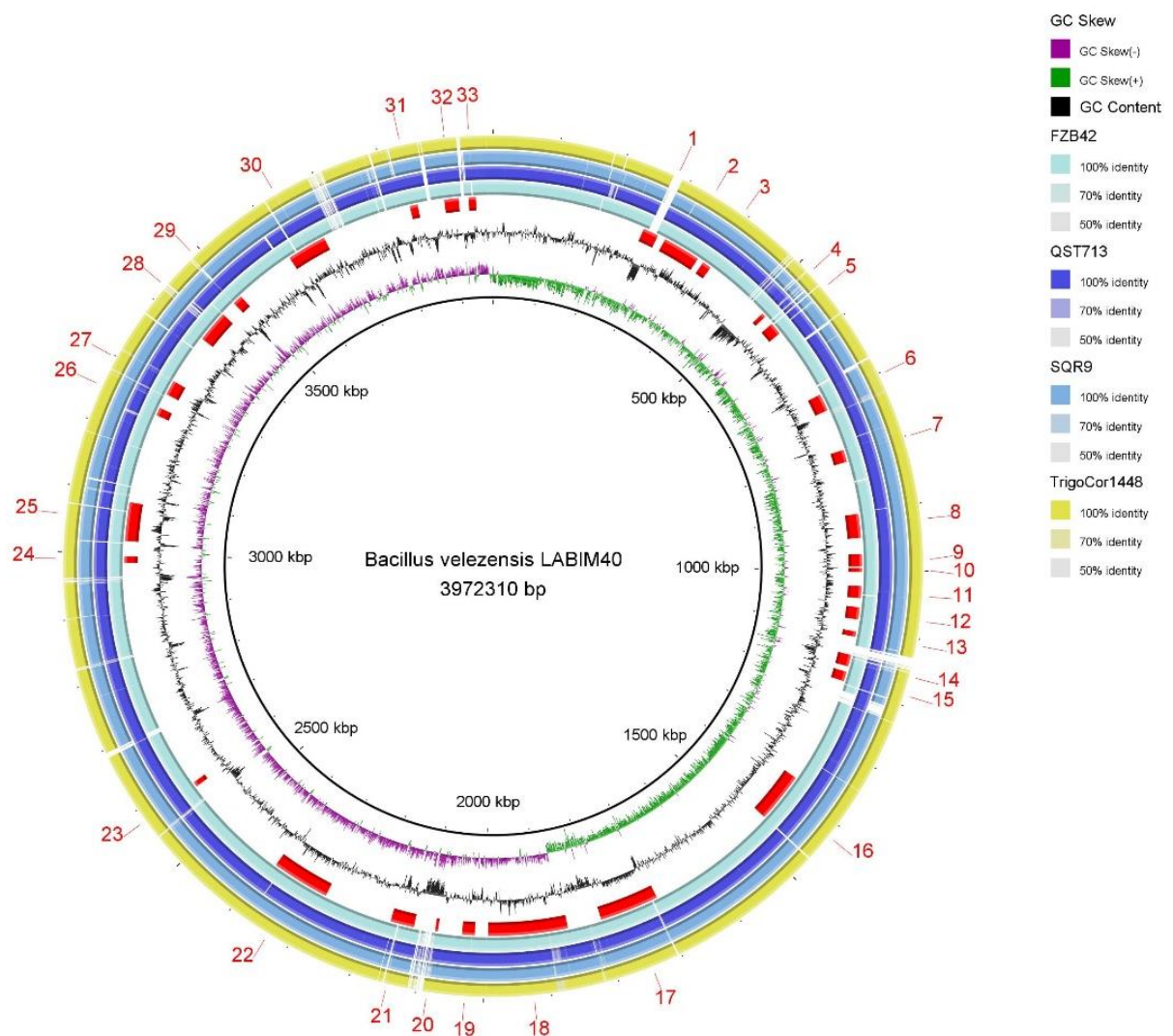


Figura 2: Representação circular e comparação do genoma da cepa LABIM40 com outras cepas de *Bacillus velezensis*, utilizando o programa BRIG. Onde segue de dentro para fora: representação do tamanho do genoma de LABIM40, GC Skew, GC Conteúdo, posições dos clusters da cepa LABIM40, descrito na Tabela 2 e respectivamente as cepas FZB42, QST713, SQR9 e TrigoCor 1448.

Tabela 2: Análise de genômica comparativa de *Bacillus velezensis* LABIM40 com outros genomas de *B. velezensis*

Clus ter	BGC	Posição predita dos clusters		Metaból itos	% de similaridad e com o cluster já depositado no MIBIG	Presença (+) ou ausência (-) de cluster relacionados a biossíntese de metabolitos secundários			
		SQ R9	QST 713			FZB 42	TrigoCor 1448		
1	Tiopeptí deo	2662 13	2930 32	-	-	-	-	-	-
2	NRPS	3066 86	3720 93	Surfacti na	BGC00004 33_c1 (86%)	+	+	+	+
3	Cf_ hipotétic o	3829 63	3985 45	-	-	+	+	+	+
4	Cf_ hipotétic o	5173 44	5248 68	-	-	-	-	-	+
5	Cf_ácido graxo	5411 01	5623 36	-	-	+	+	+	+
6	Cf_ sacaríde o	6878 73	7174 64	-	-	-	+	+	+
7	Cf_ hipotétic o	7906 15	8117 66	-	-	+	+	+	+
8	Outros KS	9031 92	9444 36	Butirosi na	BGC00006 93_c1 (7%)	+	+	+	+
9	Cf_ ácido graxo	9724 98	9934 75	-	-	+	+	+	+
10	Cf_ hipotétic o	9960 50	1003 185	-	-	+	+	+	+
11	Terpeno	1027 237	1047 977	-	-	+	+	+	+
12	Cf_ ácido graxo	1063 674	1084 612	Citrulin a	BGC00008 95_c1 (18%)	+	+	+	+
13	Cf_ hipotétic o	1105 561	1114 472	-	-	+	+	+	+

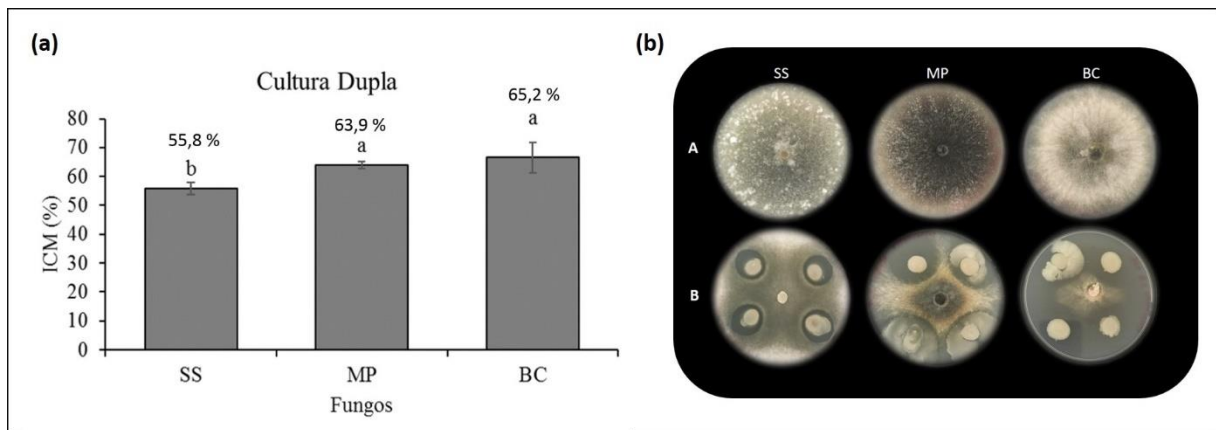
14	Cf_ hipotético	1146 564	1166 735	Cofacto r Molibdê nio	BGC00009 16_c1 (11%)	+	-	+	+
15	Cf_ hipotético	1176 466	1193 040	-	-	+	+	+	+
16	TransAT PKS	1378 274	1464 182	Macrola ctina	BGC00001 81_c1 (100%)	+	+	+	-
17	TransAT PKS- NRPS	1695 415	1798 110	Bacilae ne	BGC00010 89_c1 (100%)	+	+	+	+
18	TransAT PKS- NRPS	1856 920	1994 574	Fengici na	BGC00010 95_c1 (100%)	+	+	+	+
19	Terpeno	2017 590	2039 473	-	-	+	+	+	+
20	Cf_ hipotético	2081 428	2086 147	-	-	-	+	+	+
21	T3PKS	2123 150	2164 250	-	-	-	+	+	+
22	TransAT PKS	2283 763	2384 213	Dificidin a	BGC00001 76_c1 (100%)	+	+	+	-
23	Cf_ hipotético	2575 986	2584 405	-	-	+	+	+	+
24	Cf_ hipotético	2985 223	2995 951	-	-	+	+	+	+
25	Bacterio cina- NRPS	3022 525	3089 313	Baciliba ctina	BGC00003 09_c1 (100%)	+	+	+	+
26	Cf_ hipotético	3245 424	3259 212	-	-	+	-	+	+
27	Cf_ sacaríde o	3285 318	3310 729	-	-	+	+	+	+
28	Cf_ sacaríde o	3398 202	3453 048	Ácido Teicurô nico	BGC00008 68_c1 (100%)	+	+	+	+
29	Cf_ hipotético	3479 521	3496 267	-	-	+	+	+	+
30	Cf_	3602	3671	Bacilisi	BGC00011	+	+	+	+

	sacarídeo	828	079	na	84_c1 (100%)				
31	Cf_ hipotético	3828 167	3841 831	-	-	+	+	+	+
32	Cf_ sacarídeo	3888 090	3912 964	-	-	+	+	+	+
33	Cf_ hipotético	3930 024	3942 622	-	-	-	+	+	+

BGC: Cluster de genes Biossintéticos; MIBiG ID: Código de identidade do cluster no MiBiG; PKS: Policetídeo Sintase; TransATPKS: Trans AT Policetídeo Sintase; NRPS: Síntese de peptídeo não ribossomal; OtherKS: Outros tipos de cluster PKS

3.2 Ensaio de cultura dupla

O ensaio de cultura dupla foi utilizado para avaliar a atividade inibitória de LABIM40 contra os fungos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *B. cinerea*. Os resultados representados na (Figura 3) demonstraram 55,8 % de inibição em SS, 63,95 % MP e 66,56 % para BC. A cepa LABIM 40 inibiu todos os fungos testados, sendo BC e MP os mais sensíveis com mais de 60 % de inibição.



10

Figura 3: Ensaio de cultura dupla entre LABIM40 e os fungos fitopatogênicos. (a) *S. sclerotiorum* (SS), *M. phaseolina* (MP) e *B. cinerea* (BC). Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (b) Fotografia do teste de cultura dupla, em (A) está representado os controles e em (B) os respectivos fungos confrontados com LABIM40.

17

3.3 Atividade antifúngica do sobrenadante livre de células

Ao avaliar a influência do meio de cultura na atividade antifúngica, o meio M2 apresentou ser ideal, pois a atividade do SLC inibiu 72,87 % do fungo BC, 68,31% MP e 65,31% em SS, sendo mais ativo em BC, no entanto, quando avaliado o meio M1 a menor atividade foi para BC, com 36,76% de inibição, (Tabela 3 e Figura 4).

Sobre a atividade ao longo da curva de crescimento de LABIM40 (Figura 5), foi possível observar que, em 12 horas de cultivo houve uma menor inibição para os fungos MP e BC e nenhuma atividade contra SS. Mas em 24 horas, o SLC de LABIM40 apresentou ser ativo em todos os fungos testados, tornando-se constante após esse período, iniciando a fase estacionária em 36 horas de cultivo.

28

29

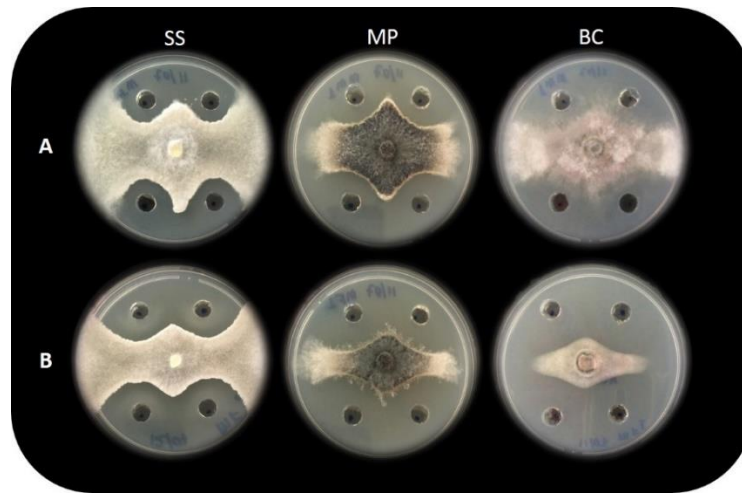
30

Tabela 3: Atividade antifúngica em dois diferentes meios de cultivo

Fungos	%ICM	M1	%ICM	M2
<i>Macrophomina phaseolina</i>	57,27	aA	68,31	bB
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	54,36	bA	65,31	cB
<i>Botrytis cinerea</i>	36,76	cA	72,87	aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e Maiúscula na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados transformados de acordo com Box-Cox (1964).

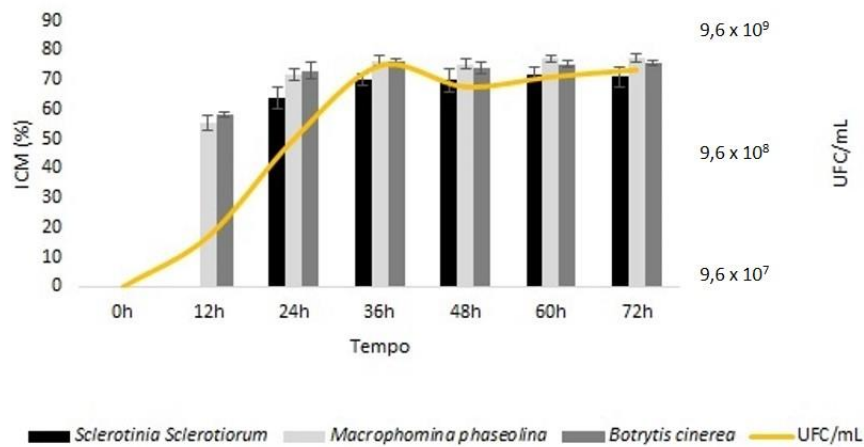
31



32

Figura 4: Produção de metabólitos antifúngicos em diferentes meios, (A) representa o meio M1 e (B) o meio M2, para os respectivos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolina* (MP) e *Botrytis cinerea* (BC)

36



37

Figura 5: Cinética do crescimento celular e atividade antifúngica do sobrenadante livre de células de *Bacillus velezensis* LABIM40. Porcentagem de Inibição do

40 Crescimento Micelial (ICM %), Unidade Formadora de colônias por mililitro
41 (UFC/mL).

42

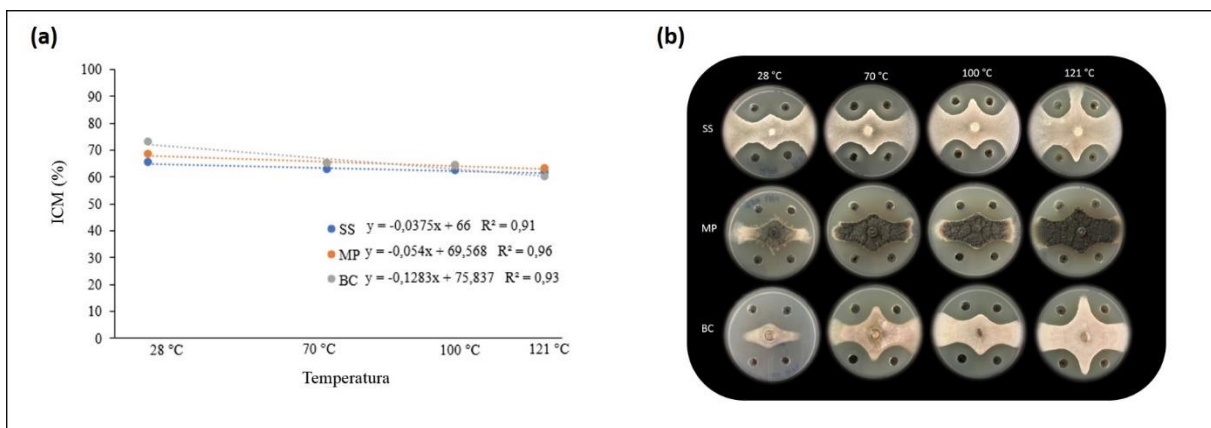
43 3.4 Efeito da temperatura, pH e luz no sobrenadante de *B. velezensis* LABIM40

44 O sobrenadante continuou ativo mesmo sendo submetido a temperatura elevada
45 (Figura 6), no entanto a atividade foi menor após a autoclavagem, sendo mais
46 evidente em BC, com ICM de 73, 65, 64, 60 %, SS 65, 63, 63, 62 e MP 68, 62, 64,
47 63 nas respectivas temperaturas 28 (sem tratamento), 70, 100 e 121 °C.

48 Sobre o teste de estabilidade nas variações de pH, o sobrenadante apresentou ser
49 estável, sem mudanças significativas para todos os fungos testados (Figura 7).

50 De forma similar, a estabilidade do sobrenadante ao ser expostos na luz UV
51 (ultravioleta) e LV (luz visível), também apresentou ser estável, com pouca diferença
52 entre os tratamentos de cada fungo (Figura 8).

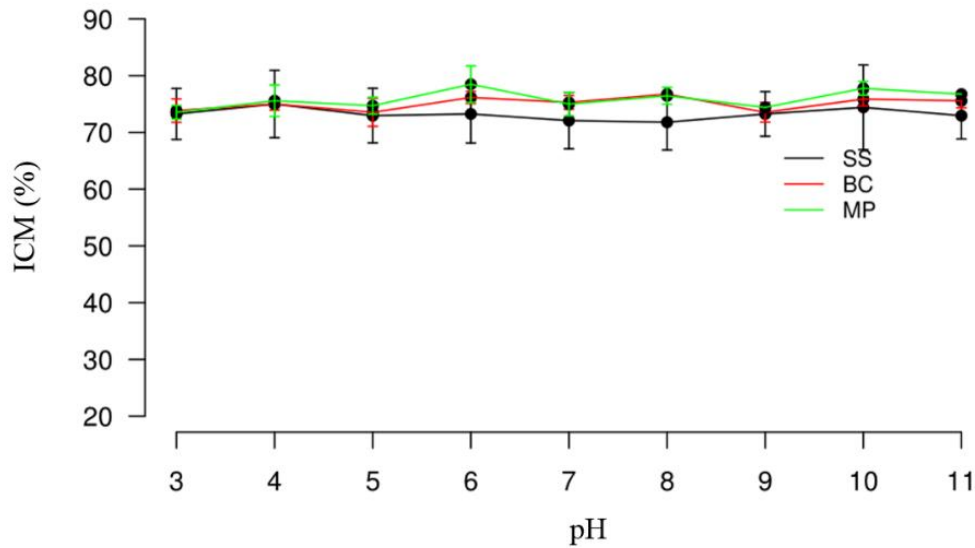
53



54

55 **Figura 6:** Avaliação da estabilidade do sobrenadante livre de células de *B.*
56 *velezensis* cepa LABIM40 quando submetido a diferentes temperaturas. (a) *S.*
57 *sclerotiorum* (SS), *M. phaseolina* (MP) e *B. cinerea* (BC). Porcentagem de Inibição
58 do crescimento Micelial (ICM %). (b) Fotografia do teste de termoestabilidade. Nas
59 linhas estão representados os respectivos fungos descritos acima e nas colunas os
60 tratamentos em 28 (sem tratamento), 70, 100 e 121 °C.

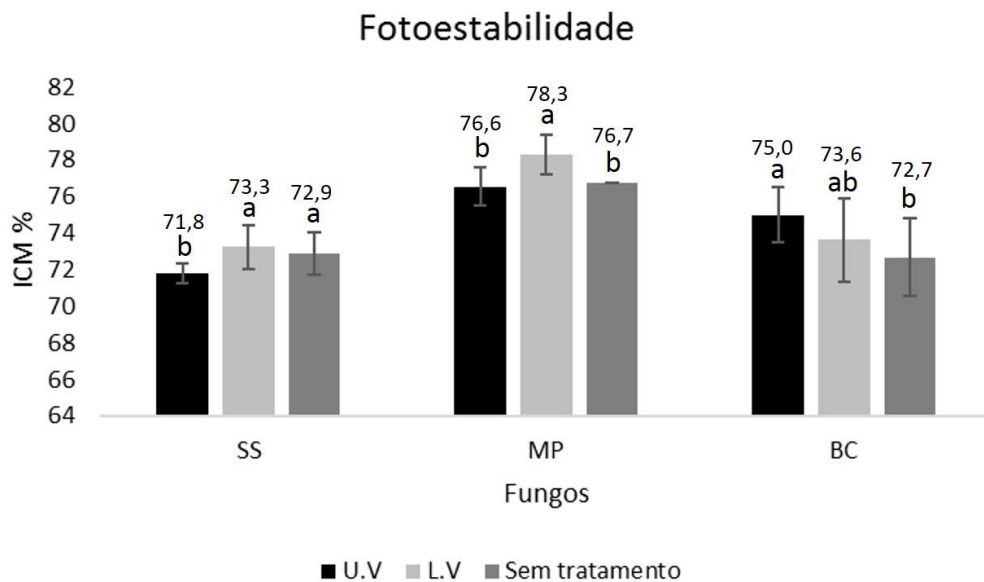
61



62

63 **Figura 7:** Avaliação da estabilidade do sobrenadante livre de células em diferentes
 64 pH (3-11). *S. sclerotiorum* (SS), *M. phaseolina* (MP) e *B. cinerea* (BC), Porcentagem
 65 de Inibição do Crescimento Micelial (ICM %).

66



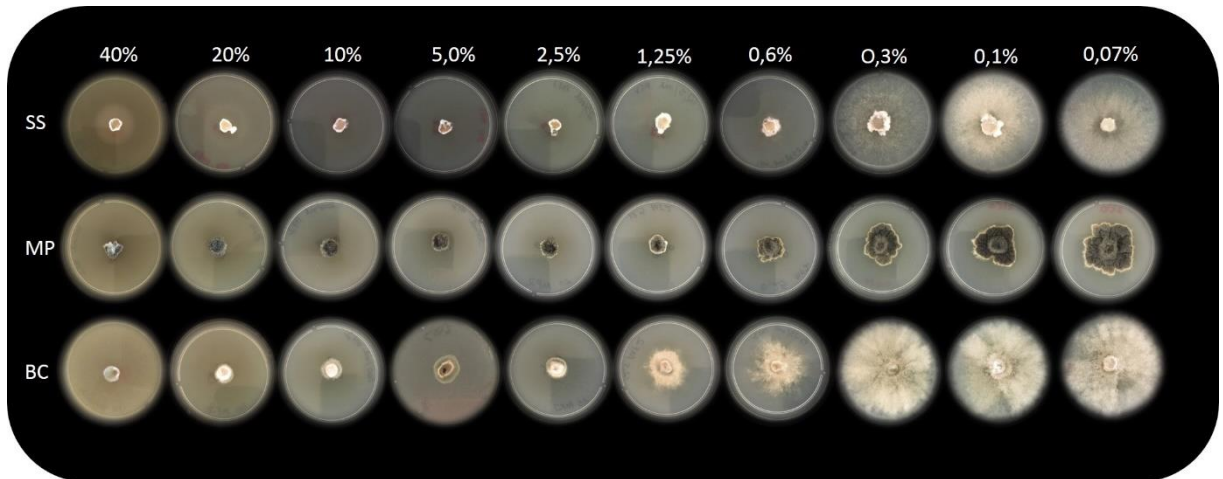
67

68 **Figura 8:** Avaliação da fotoestabilidade do sobrenadante livre de células de *B.*
 69 *velezensis* cepa LABIM40 exposto por 12 horas na luz ultravioleta (UV) com o
 70 comprimento de onda de 365 nm e luz visível (LV), testado contra os fungos *S.*
 71 *sclerotiorum* (SS), *M. phaseolina* (MP) e *B. cinerea* (BC). Porcentagem de Inibição
 72 do Crescimento Micelial (ICM %). Letras iguais não diferem pelo teste de Kruskal-
 73 Wallis ($p < 0,05$).

74 3.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

75 A concentração inibitória mínima encontrada para SS foi de 1,2%, MP foi de 2,5% e
 76 para BC 20% (Figura 9). A estimativa da dose efetiva para inibir 50 e 90% dos
 77 fungos foram: 0,55 e 1,0 para SS, 0,08 e 1,9 para MP e 0,7 e 6,2 para BC,
 78 respectivamente (Figura 10).

79

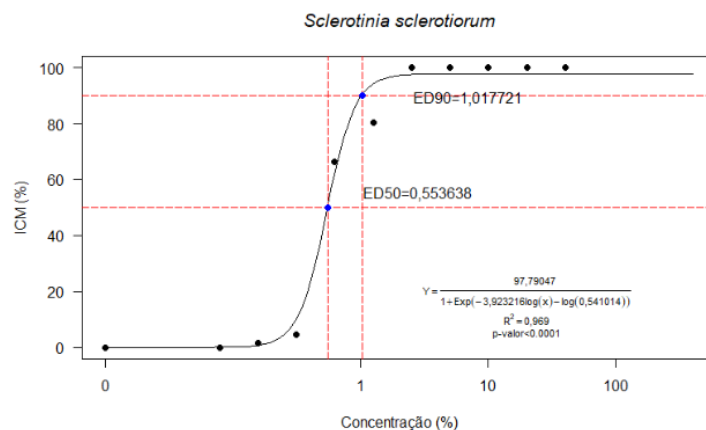


80

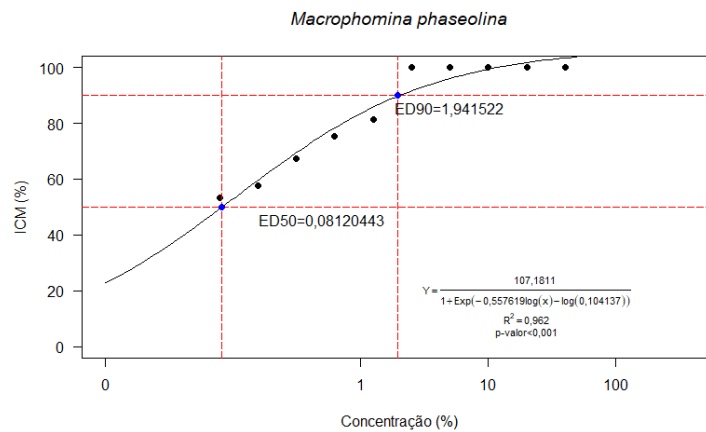
81

82 **Figura 9:** Concentração inibitória mínima em meio solidificado. Nas linhas está
 83 representado os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Macrophomina phaseolin* (MP)
 84 e *Botrytis cinerea* (BC) e nas colunas as concentrações testadas, indo de 40% á
 85 0,07% do sobrenadante de LABIM40

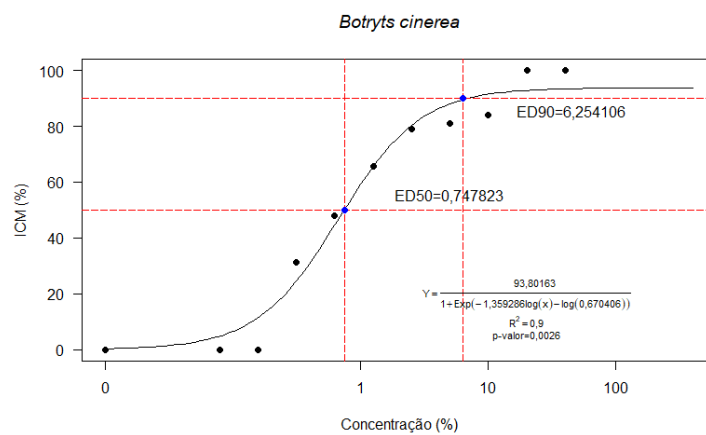
86



87



88



89

90 **Figura 10:** Estimativa da dose efetiva para inibir 50 e 90 % dos fungos: *S.*
 91 *sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *B. cinerea*. Porcentagem de Inibição do Crescimento
 92 Micelial (ICM %).

93

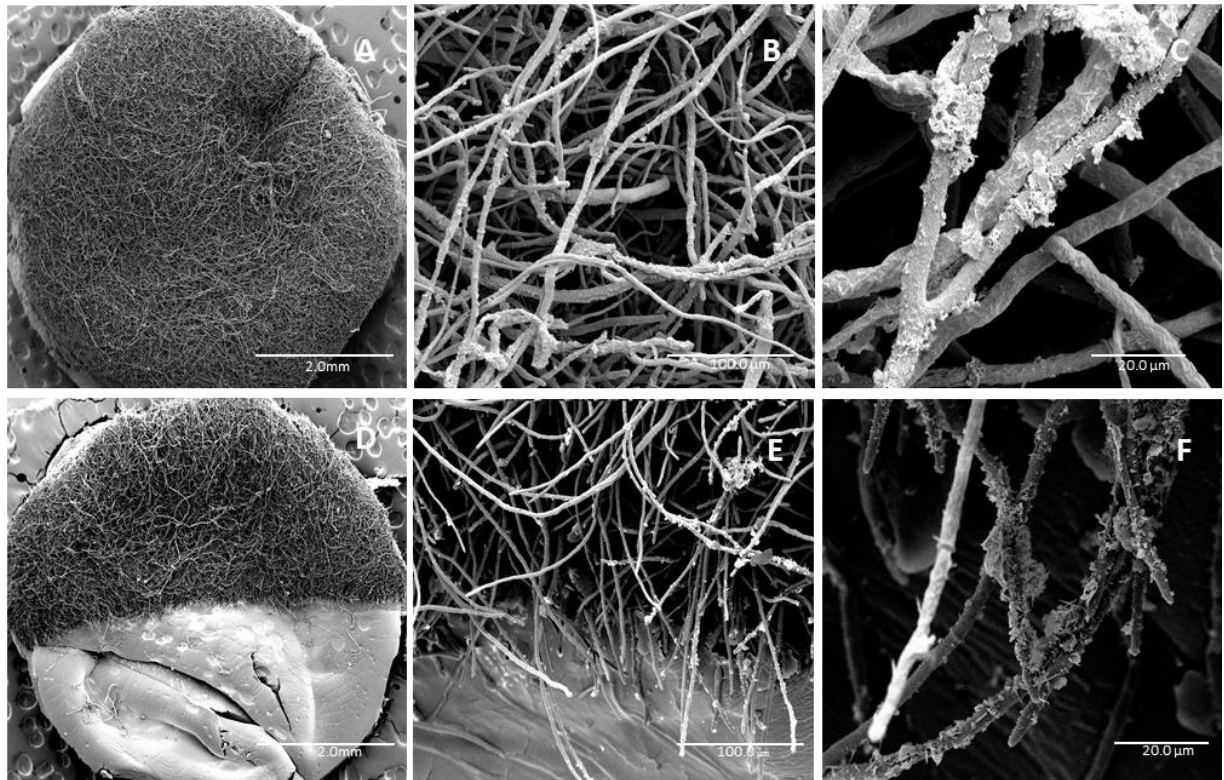
94 3.6 Avaliações morfológicas

95 Para caracterizar a morfologia de LABIM40, uma observação da colônia foi realizada
 96 (Figura suplementar 1). Com maiores aumentos da região da borda da colônia
 97 (Figura suplementar 1 B-E) foi possível visualizar uma grande massa celular (Figura
 98 suplementar 1 F-G), caracterizada em arranjos espirais (Figura suplementar 1 H), e
 99 com células em formato de bacilo.

100 Para investigar o efeito antifúngico do SLC contra SS, uma região entre a zona de
 101 inibição e as hifas do fungo foram retiradas e observadas em MEV. No controle
 102 (Figura 11 A-C), foi possível observar uma intensa massa de micélios fúngico, com
 103 hifas septadas e volumosas (Figura 11 B), e produção de exopolissacarídeo (Figura
 104 11 C). No tratamento a região entre a zona de inibição e o fungo foi observada
 105 (Figura 11 D), e em maiores aumentos foi possível visualizar hifas mais finas e com

106 septos mais destacados (Figura 11 E), com redução de exopolissacarídeos, mas
 107 com presença de cristais provenientes da produção dos metabólitos de LABIM40
 108 (Figura 11 F).

109



110

111 **Figura 11:** Microscopia eletrônica de varredura, imagens do efeito antifúngico do
 112 sobrenadante livre de células de *B. velezensis* cepa LABIM40 contra *Sclerotinia*
 113 *sclerotiorum*. O controle é referente ao *spot* fúngico sem tratamento (A-C). O
 114 tratamento (D-F), é referente a área de transição entre o crescimento fúngico e a
 115 região de inibição. Magnitudes de (A) 45X, (B) 800X, (C) 3000X, (D) 45X, (E) 800X,
 116 (F) 3000X.

117

118 **4 Discussão**

119 Na natureza os microrganismos fazem parte dos serviços ecossistêmicos,
 120 disponibilizando nutrientes para as plantas, participando dos processos de ciclagem
 121 nutrientes, antibiose, entre outros (BENDER et al., 2016). Existe vários métodos para
 122 avaliar a capacidade de antibiose de um microrganismo em situações *in vitro* e a
 123 base desses métodos pode ser relacionada com o estresse abiótico e biótico. Esse
 124 último é caracterizado como um confronto direto entre dois microrganismos

125 diferentes (BERTRAND et al., 2014), como observado no teste de cultura dupla entre
126 LABIM40 e os fungos fitopatogênicos.

127 No entanto, conhecer a espécie antagônica, seu genoma e as melhores condições
128 abióticas de cultivo, são fatores importantes que também devem ser levados em
129 consideração quando o interesse é a produção de metabólitos secundários
130 (BERTRAND et al., 2014).

131 Em um estudo anterior o genoma de *B. velezensis* LABIM40 foi sequenciado
132 (BAPTISTA et al., 2018). Através do sequenciamento uma análise filogenômica foi
133 realizada, sendo possível observar a similaridade de *B. velezensis* com cepas do
134 grupo *amyloliquefaciens* e a relação de ambos ao grupo *subtilis*. Essa similaridade
135 entre esses grupos, proporcionou anteriormente a classificação errônea de vários
136 isolados de *B. velezensis*. No entanto, com os avanços das técnicas de
137 sequenciamento e das ferramentas de bioinformática muitos isolados dessa espécie
138 estão sendo reclassificados (DUNLAP et al. 2016; FAN et al. 2017).

139 Quando analisado a similaridade entre as cepas da árvore filogenômica e outras
140 cepas depositadas no *GenBank* utilizando os parâmetros de comparação dDDH e
141 ANI, foi possível observar que a cepa S141 foi a mais similar com a bactéria em
142 estudo. Porém, S141 é uma rizobactéria promotora de crescimento de plantas
143 (SIBPONKRUNG et al., 2017), característica essa ainda não avaliada em LABIM40.
144 A segunda bactéria mais similar é a cepa NKG-1 que segundo Liu et al. (2018) além
145 da atividade de promoção de crescimento de plantas, também apresenta capacidade
146 de inibir fungos fitopatogênicos, entre eles *B. cinerea* (GE et al., 2016).

147 O terceiro isolado mais similar é a cepa *B. amyloliquefaciens* CC178, antagonista de
148 vários patógenos de plantas, inclusive *S. sclerotiorum* (KIM et al., 2015). Essa cepa
149 devido aos valores de dDDH e ANI, possivelmente pertence ao grupo dos *B.*
150 *velezensis*.

151 Sobre a relação das BGCs encontradas no genoma de *Bacillus* spp, os NRPSs e
152 PKSs são os mais comuns (GRUBBS et al, 2017), sendo também observados no
153 genoma de *B. velezensis* LABIM40 Esses e outros BGCs, são responsáveis pela
154 produção de vários metabólitos secundários de interesse biotecnológico, sendo
155 caracterizados de acordo com a sua composição química, podendo ser peptídeo
156 (bacteriocinas, bacilisina), lipopeptídeos (surfactina, iturina, fengicina), policetídeos
157 (difidicina, bacilaene, macrolactina) entre outros (SANSINENEA e ORTIZ, 2011).

158 A cepa LABIM40, possui vários clusters ainda não identificados, e outros já
159 identificados, compartilhados com outros isolados com potencial biotecnológico já
160 descrito na literatura, (Figura 2 e Tabela 2), como é o caso de bacilibactina,
161 macrolactina, surfactina e bacilisina, presentes na cepa QST713 do produto
162 comercial Serenade® (PANDIN et al., 2018) e na cepa FZB42 do produto comercial
163 RhizoVital® (CHEN et al. 2009; FAN et al 2018). Isso indica que LABIM40 também
164 tem grande potencial biotecnológico e pode fazer parte de um produto comercial no
165 futuro.

166 No entanto, há clusters que não foram compartilhados com as cepas de referência
167 (Figura 2, lacunas), sendo o cluster 1 (Tiopeptídeo) o principal, pois toda sequência
168 desse cluster não apresentou similaridade com as cepas de referência.

169 Os Tiopeptídeos são encontrados no genoma de muitas bactérias, são peptídeos
170 sintetizados por ribossomos e modificados após a tradução (BOGART e BOWERS.,
171 2019). Esses podem estar relacionados a formação de biofilme, ação antibacteriana
172 (BLEICH et al., 2015), antifúngica (MIZUHARA et al., 2011), dentre outras. Segundo
173 Just-Baringo et al. (2014) há mais de cem famílias desse cluster.

174 Porém para ativação desses e de outros genes responsáveis pela ação
175 antimicrobiana, o meio de cultivo é de extrema importância (BERTRAND et al. 2014).
176 Por isso muitos estudos estão sendo desenvolvidos para formular meios mais
177 adequados para produção de metabólitos secundários (GU et al. 2005; YI et al.
178 2015; KILANI-FEKI et al. 2016; SHAFI et al. 2017).

179 Nesse contexto, o meio M2, suplementado com micronutrientes proporcionou
180 condições mais adequadas para LABIM40 produzir compostos antifúngicos.
181 Utilizando uma proposta similar a esse meio, com fontes de carbono, nitrogênio e
182 micronutrientes, Mosquera et al. (2014) e Chen et al. (2018) identificaram atividade
183 antifúngica em cepas de *Bacillus* sp.

184 Contudo, em alguns casos dependendo do microrganismo estudado, um meio
185 simples também pode proporcionar a produção desses compostos, como avaliado
186 no meio M1 e pelos autores Zouari et al. (2016) e Torres et al. (2016) ao utilizar
187 respectivamente os meios LB e Mueller Hinton.

188 Além das fontes de nutrientes, o crescimento microbiano também influencia na
189 síntese de biomoléculas, pois as moléculas provenientes do metabolismo secundário
190 são mais expressas na fase exponencial e estacionária, como observado no

191 presente estudo e similar ao estudo de Lim et al. (2017) com atividade antifúngica na
192 fase estacionária.

193 Nesse teste houve atividade para MP e BC e nenhuma atividade para SS em 12
194 horas de cultivo. Esse resultado possivelmente está relacionado com a produção de
195 mais de uma molécula ou grupo de moléculas ativas, ou a concentração da molécula
196 ativa não era suficiente para inibir SS.

197 Na técnica de separação de moléculas por tamanho, utilizando membranas de
198 ultrafiltração AMICON® (Millipore, USA) foi possível observar dois grupos de
199 compostos ativos (Dados não mostrados). Além disso, o gênero *Bacillus* sintetizam
200 vários compostos antifúngicos (MOSQUEIRA et al 2014; ARROYAVE-TORO et al.
201 2017) e LABIM40 possui vários clusters relacionados com a biossíntese dessas
202 moléculas, como surfactina, fengicina e outras ainda não identificadas

203 O resultado do teste de termoestabilidade também demonstrou relação com a
204 primeira hipótese. Nesse teste foi possível observar que houve uma queda da
205 atividade conforme o aumento da temperatura, no entanto os compostos presentes
206 não perderam atividade e dentre os fungos, BC foi o que apresentou menor inibição
207 no tratamento, confirmando a primeira hipótese de haver mais de uma molécula
208 ativa.

209 Sobre a estabilidade desses compostos, houve pouca variação de atividade na faixa
210 de pH testado, sendo, portanto, o sobrenadante de LABIM40 estável a faixa de pH
211 testado Similar ao teste de termoestabilidade e pH, Yu et al. (2002), também
212 observaram estabilidade nos compostos produzidos por uma cepa de *Bacillus* sp.
213 Porém, Zhao et al. (2010) ao avaliar uma cepa de *Bacillus*, obtiveram grande
214 redução da atividade nos parâmetros de temperatura e pH.

215 Já na fotoestabilidade ao comprimento de onda de 365 nm e Luz visível, houve
216 variações na atividade entre os tratamentos e os fungos, em alguns casos com
217 pequeno incremento de atividade na luz UV e visível. Portanto, em 12 horas de
218 exposição no comprimento de onda testado, o sobrenadante foi estável. Similar a
219 esse resultado, os compostos de *B. amyloliquefacies* cepa CNU114001, também
220 foram estáveis na exposição a luz UV, no entanto, com tempo de exposição de 30
221 minutos (Jl et al., 2013).

222 Após os testes de estabilidade, foi avaliado a CIM do sobrenadante de LABIM40
223 contra os fungos SS, MP e BC. Para isso, o sobrenadante foi autoclavado para

224 esterilização, devido a inibição de mais de 50% apresentada no teste de
225 termoestabilidade.

226 Todos os testes realizados foram essenciais para a caracterização da atividade,
227 sendo o seu efeito avaliado nas alterações morfológicas nas hifas de SS, mostrando
228 o potencial de LABIM40 como agente de controle biológico.

229

230 **5 Conclusão**

231 *B. velezensis* LABIM40 é um agente de controle biológico pois apresentou nas
232 análises *in silico* clusters relacionados a inibição de patógenos fúngicos, sendo
233 comprovado a atividade nos testes *in vitro*, com a inibição de todos os fungos
234 testados.

235 Além disso, os compostos produzidos por essa cepa não perdem atividade em
236 temperaturas elevadas, sendo estáveis em variações de pH e nos comprimentos de
237 onda de 365 nm e luz visível. Portanto, esses estudos serviram para indicar o
238 potencial biotecnológico da cepa LABIM40 e prospectar novas pesquisas a caminho
239 de um produto comercial.

240

241 **6 Referências**

242

243 ALIKHAN, NABIL-FAREED, NICOLA K. PETTY, NOURI L. BEN ZAKOUR, AND
244 SCOTT A. BEATSON. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple Prokaryote
245 Genome Comparisons.” **BMC genomics** v.12 n.402, 2011.
246 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824423> (December 4, 2018).

247 ARROYAVE-TORO, J. J.; MOSQUERA, S.; & VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol
248 activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest
249 fungal pathogens. **Biological Control**, v.114, p.195–200, 2017.
250 doi:10.1016/j.biocontrol.2017.08.014

251 BAPTISTA J.P.; SANCHES P.P.; TEIXEIRA G.M.; MOREY A.T.; TAVARES E.R,
252 YAMADA-OGATTA S.F.; DA ROCHA S.P.D.; HUNGRIA M.; RIBEIRO R.A.; BALBI-
253 PEÑA M.I.; CHIDEROLI R.T.; PEREIRA U.D.P, DE OLIVEIRA A.G. Complete
254 genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an effective antagonist of fungal
255 plant pathogens. **Genome Announ**, 2018. [https://doi.org/10.1128/genomeA.00595-](https://doi.org/10.1128/genomeA.00595-18)
256 18.

257 BENDER S. F.; WAGG C. AND VAN DER HEIJDEN M.G.A. An Underground
258 Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural
259 Sustainability. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 6, 2016

260 BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; &
261 WOLFENDER, J.-L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential
262 way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**,
263 v.32, n.6, p.1180–1204, 2014. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.001

264 BLEICHA R. et al. Thiopeptide antibiotics stimulate biofilm formation in *Bacillus*
265 *subtilis*. **PNSA**, v. 112, n.10, p. 3086–3091, 2015

266 BOGART JONATHAN W and BOWERS ALBERT A. Thiopeptide Pyridine Synthase
267 TbtD Catalyzes an Intermolecular Formal Aza-Diels-Alder Reaction. **J. Am. Chem.**
268 **Soc.** 2019.

269 CHEN L.; HENG J.; QIN S.; BIAN K. A comprehensive understanding of the
270 biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight.
271 **PLoS ONE** v.13, n.6, 2018

272 CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.;
273 SÜSSMUTH, R.; BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens*
274 FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of**
275 **Biotechnology**, 2009 doi:10.1016/j.jbiotec.2008.10.011

276

- 277 CREMONESE, C.; PICCOLI, C.; PASQUALOTTO, F.; CLAPAUCH, R.; KOIFMAN,
278 R. J.; KOIFMAN, S.; & FREIRE, C. Occupational exposure to pesticides, reproductive
279 hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. **Reproductive**
280 **Toxicology**, v.67, p.174–185, 2017. doi:10.1016/j.reprotox.2017.01.001
- 281 DUNLAP. C. A.; KIM, S. J.; KOWN, S.W. ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a
282 later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*,
283 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later
284 heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International**
285 **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p.1212–1217, 2016
- 286 ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, n.1-3,
287 p.27–33, 2001. doi:10.1016/s0300-483x(00)00452-2
- 288 ESTÉVEZ-ARIAS M. et al. The mobility and degradation of pesticides in soils and the
289 pollution of groundwater resources Agriculture, **Ecosystems & Environment**. v.123,
290 n.4, p. 247-260, 2008
- 291 FAN B.; BLOM J.; KLENK H-PAND BORRISS R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus*
292 *velezensis*, and *Bacillus siamensis* Forman “Operational Group *B. amyloliquefaciens*”
293 with in the *B. subtilis* Species Complex. **Front. Microbiol.** v. 8, v.22, doi:
294 10.3389/fmicb.2017.00022
- 295 FAN, B.; WANG, C.; SONG, X.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; GAO, X and BORRISS,
296 R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant
297 Growth Promotion and Biocontrol. **Front. Microbiol**, 2018. doi:
298 10.3389/fmicb.2018.02491
- 299 FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic
300 endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v.94, p.1245-1248, 2004
- 301 GE B.; LIU B.; NWET T.T.; ZHAO W.; SHI L.; ZHANG K. *Bacillus methylotrophicus*
302 Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications
303 as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. **PLoS ONE** v.11, n.11, 2016.
304 doi:10.1371/journal.pone.0166079
- 305 GEPP V.; VERO S.; CASSANELLO M. E.; ROMERO G.; SILVERA E.; GONZÁLEZ
306 P.; REBELLATO J.; FERREIRA Y.; BENTANCUR O. Resistencia a fungicidas en
307 *Botrytis cinerea* en el Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, v. 16, n.1, p.97-107, 2012
- 308 GRUBBS K. J.; BLEICH R. M.; SANTA MARIA K.C.; ALLEN S. E.; FARAG S,
309 AGBIOME TEAM; SHANK E. A.; BOWERS A. A. Large-scale bioinformatics analysis
310 of *Bacillus* genomes uncovers conserved roles of natural products in bacterial
311 physiology. **MSystems**, 2017

- 312 GU, X. B.; ZHENG, Z. M.; YU, H. Q.; WANG, J.; LIANG, F. L.; LIU, R.L. Optimization
313 of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01
314 by a response surface method. **Process Biochemistry** v.40, p.3196–3201, 2005
- 315 HAO et.al. The Genome of Plant Growth-Promoting *Bacillus amyloliquefaciens*
316 subsp. plantarum strain YAU B9601-Y2 Contains a Gene Cluster for Mersacidin
317 Synthesis. **Journal of Bacteriology**, p.3264 –3265, 2012
- 318 JI et al. Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal
319 Plant Diseases. **Mycobiology**, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.
- 320 JUST-BARINGO X.; ALBERICIO F. and ÁLVAREZ M. Thiopeptide Antibiotics:
321 Retrospective and Recent Advances. **Mar. Drugs**, n.12, p.317-351, 2014
- 322 KILANI-FEKI O.et al. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus*
323 *subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control** n.95
324 p.73–82, 2016
- 325 KIM B-Y, LEE S-Y, AHN J-H, SONG J, KIM W-G, WEON H-Y. Complete genome
326 sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum CC178, a phyllosphere
327 bacterium antagonistic to plant pathogenic fungi. **Genome Announc** v. 3, n. 1, 2015
- 328 KUNST et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium
329 *Bacillus subtilis*. **Nature**, v.390, p. 249-256, 1997.
330 <https://doi.org/10.1038/3678610.1038/36786>
- 331 LIM, S. M.; YOON, M. Y.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; SHIN, T. S.; PARK,
332 H. W.; YU, N. H.; KIM, Y. H.; KIM, J. C. Diffusible and Volatile Antifungal Compounds
333 Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various
334 Phytopathogenic Fungi. **The plant pathology journal**, v.33, n.5, p.488-498, 2017
- 335 LIU B.; GE B.; AZHAR N.; ZHAO W.; CUI H.; ZHANG K. Complete genome
336 sequence of *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from the Changbai
337 Mountains, China. **Genome Announc**, 2018. [https://doi.org/10.1128/
338 genomeA.01454-17](https://doi.org/10.1128/genomeA.01454-17).
- 339 MA, H.-X., CHEN, Y., WANG, J.-X., YU, W.-Y., TANG, Z.-H., CHEN, C.-J., & ZHOU,
340 M.-G. Activity of carbendazim, dimethachlon, iprodione, procymidone and boscalid
341 against *Sclerotinia* stem rot in Jiangsu Province of China. **Phytoparasitica**, v.37, n.
342 5, p.421–429, 2009. doi:10.1007/s12600-009-0057-0
- 343 MANZOOR S, NIAZI A, BEJAI S, MEIJER J, BONGCAM-RUDLOFF E. Genome
344 sequence of a plant-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* strain
345 UCMB5036. **Genome Announc.**, 2013

- 346 MEENA, K.R.; TANDON T.; SHARMA, A.; KANWAR, S.S. Lipopeptide antibiotic
347 production by *Bacillus velezensis* KLP2016. **Journal of Applied Pharmaceutical**
348 **Science**, v. 8, n.03, p.091-098, 2018
- 349 MEIER-KOLTHOFF J.P.; AUCH A. F.; KLENK H.P.; GÖKER M. Genome sequence-
350 based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions
351 **BMC Bioinf.**, v.14, p. 60, 2013
- 352 MEIER-KOLTHOFF, J.P., GÖKER, M., KLENK, H.-P. Taxonomic use of DNA G+C
353 content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. **Int J Syst Evol Microbiol**
354 v.64, p.352-356, 2014
- 355 MIZUHARA N. et al. Antifungal thiopeptide cyclothiazomycin B1 exhibits growth
356 inhibition accompanying morphological changes via binding to fungal cell wall chitin.
357 **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 5300–5310, 2011
- 358 MOSQUERA, S.; GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M.; ORDUZ, S.; & VILLEGAS-
359 ESCOBAR, V. Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture
360 and identification of antifungal metabolites. **Biocatalysis and Agricultural**
361 **Biotechnology**, v.3, n.4, p.378–385, 2014. doi:10.1016/j.bcab.2014.09.004
- 362 NELSON B. A.; RAMAIYA P.; LOPEZ DE LEON; AKUMAR R.; CRINKLAW A.;
363 JOLKOVSKY E.; CRANE J.M.; BERGSTROM G.C.; REY M.W. Complete genome
364 sequence for the Fusarium head blight antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* strain
365 TrigoCor 1448. **Genome Announc.** 2014
- 366 NIAZI A.; MANZOOR S.; BEJAI S.; MEIJER J.; BONGCAM-RUDLOFF E. Complete
367 genome sequence of a plant associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.
368 plantarum UCMB5033. **Standards in Genomic Sciences**, v.9, p.718-725, 2014
- 369 NYE T. M.; SCHROEDER J. W.; KEARNS D. B.; SIMMONS L. A. Complete genome
370 sequence of undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610, 2007. **Genome**
371 **Announc** 5: e00364-17
- 372 OERKE, E.-C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, 2005.
373 doi:10.1017/s0021859605005708
- 374 ONGENA MARC e JACQUES PHILIPPE. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for
375 plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology** v.16, n.3, 2008.
- 376 PANDIN C.; LE COQ. D.; DESCHAMPS J.; VÉDIE R.; ROUSSEAU T.; AYMERICH
377 S.; BRIANDET R. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a
378 biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould
379 disease. **Journal of Biotechnology**, 2018.
380 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.014>

- 381 PEREZ, KARLA J. et al. *Bacillus* spp. Isolated from Puba as a Source of
382 Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides, **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.61,
383 2017
- 384 RODRIGUEZ-R LM & KONSTANTINIDIS KT. The enveomics collection: a toolbox for
385 specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. **Peer J Preprints**
386 2016
- 387 RÜCKERT et al. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T
388 reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42 **J Biotechnol.**
389 v.20, p.78-85, 2011
- 390 SANSINEREA ESTIBALIZ e ORTIZ AURELIO. Secondary metabolites of soil
391 *Bacillus* spp. **Biotechnol Lett**, v.33, p.1523–1538, 2011
- 392 SHAFI JAMIL et al. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its
393 antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology. **Arch**
394 **Biol Sci.** v. 69, n. 3, p. 469-480, 2017
- 395 SIBPONKRUNG, S.; KONDO, T.; TANAKA, K.; TITABUTR, P.; BOONKERD, N.;
396 TEAUMROONG, N.; YOSHIDA, K. Genome Sequence of *Bacillus velezensis* S141, a
397 New Strain of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Isolated from Soybean
398 Rhizosphere. **Genome Announcements**, 2017
- 399 TIMMUSK SALME; BEHERS LAWRENCE; MUTHONI JULIA; MURAYA ANTHONY;
400 ARONSSON ANNE-CHARLOTTE. Perspectives and Challenges of Microbial
401 Application for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**, 2017
- 402 TORRES M.J.; BRANDAN C. P.; PETROSELLI G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO
403 M.C. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens*
404 against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-
405 TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research** v.182, p.
406 31–39, 2016
- 407 TOSI, S.; COSTA, C.; VESCO, U.; QUAGLIA, G.; GUIDO, G. A 3-year survey of
408 Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural
409 pesticides, **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 208-218, 2018
- 410 WEBER, TILMANN. “In Silico Tools for the Analysis of Antibiotic Biosynthetic
411 Pathways.” **International Journal of Medical Microbiology** v.304, n.3–4, p. 230–
412 35, 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631213>
- 413 XU T.; Zhu T.; Li S. b-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts
414 antifungal effect on plant pathogenic fungi. **World J Microbiol Biotechnol.** 2016

- 415 YAHYAZADEH, M., OMIDBAIGI, R., ZARE, R., AND TAHERI, H. Effects of some
416 essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. World J. **Microbiol.**
417 **Biotechnol.** V.24, p;1445–1450, 2008. doi: 10.1007/s11274-007-9636-8
- 418 YI YOU-JIN et al. Optimization of medium composition and culture conditions for
419 antifungal activity of a tomato endophytic bacterium. **Biological Control** v. 82, p. 69–
420 75, 2015
- 421 YU, G. Y. SINCLAIR, G.L. BERTAGNOLLI, H. B.L Production of iturin A by *Bacillus*
422 *amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology e Biochemistry.**
423 v.34, 2002
- 424 ZHANG et al. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium
425 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by
426 maize root exudates. **BMC Genomics**, v. 16, p. 685, 2015.
- 427 ZHANG, G., DENG, A., XU, Q., LIANG, Y., CHEN, N., & WEN, T. Complete genome
428 sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of
429 guanosine and ribavirin. **Journal of bacteriology**,v.193, n.12, 2011
- 430 ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; & GU, Y. Study of the
431 antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its
432 antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, p.292–297, 2010.
433 doi:10.1016/j.biortech.2009.07.071
- 434 ZOUARI I.; JLAIEL L.; TOUNSI S.; TRIGUI M.; Biocontrol activity of the endophytic
435 *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and
436 purification of its bioactive compounds. **Biological Control** v.100, p.54–62, 2016.
- 437

438 MATERIAL SUPLEMENTAR

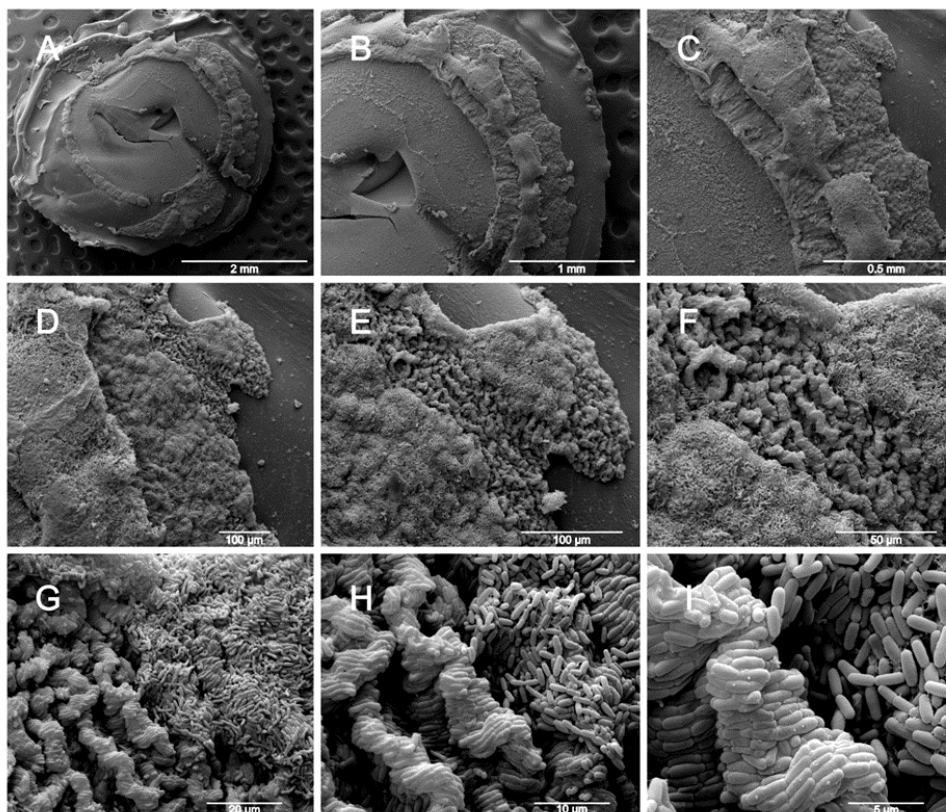
439

440 Potencial de *Bacillus velezensis* LABIM40 no controle de fungos
441 fitopatogênicos: Uma abordagem *in silico* e avaliação *in vitro*442 Julia Pezarini¹; Maria Isabel Balbi Peña²; Admilton Gonçalves de Oliveira¹ *443 ¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
444 Paraná, Brasil445 ²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,
446 Brasil

447

448 * Autor para correspondência: Admilton Gonçalves de Oliveira, Universidade
449 Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de
450 Microbiologia. CEP 86051-990, Londrina, Brasil. admilton@uel.br

451



452

453 **Figura suplementar 1:** Microscopia eletrônica de varredura da colônia de
454 *B.velezensis* cepa LABIM40. Magnitudes de (A) 50X, (B) 100X, (C) 200X, (D) 400X,
455 (E) 800X, (F) 1600X, (G) 3000X, (H) 6000X, (I) 12000X

456

457

458 **5 CONCLUSÕES**

459 Com o sequenciamento completo de *B. velezensis* cepa LABIM40, foi possível não
460 só identificar como pertencente a essa espécie, mas também proporcionou
461 comparações de similaridade genômica, predição dos metabólitos secundários com
462 interesse biotecnológico, além de subsidiar informações que favoreçam novas
463 pesquisas relacionadas a produção de metabólitos antimicrobianos.

464 Paralelamente, LABIM40 produz metabólitos antifúngicos com estabilidade nas
465 faixas testadas de temperatura, pH e luz, caracterizando os seus compostos para o
466 uso em diferentes condições ambientais, sendo, um bom agente de biocontrole.

467 Contudo muitas pesquisas ainda devem ser realizadas, para identificação do
468 princípio ativo e caracterização da atividade *in vivo*.

469

470

471 **6 REFERÊNCIAS**

472

473 ALIKHAN, NABIL-FAREED; NICOLA K.PETTY; NOURI L. BEN ZAKOUR, and
 474 SCOTT A BEATSON. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple Prokaryote
 475 Genome Comparisons. **BMC genomics** v.12, n° 402, 2011

476 ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; DE OLIVEIRA, M. C. N.;
 477 FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H. DA COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A.
 478 *Macrophomina phaseolina* em soja. **Embrapa soja**, documento 346, 2014.

479 ANDOW D. A. and ZWAHLEN C. Assessing environmental risks of transgenic
 480 plants. **Ecology Letters**, v.9, p. 196–214, 2006

481 ARAÚJO ALBERTO JOSÉ. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde:
 482 estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ.
 483 **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12 n.1 p.115-130, 2007

484 ARIAS-ESTÉVEZ, M., LÓPEZ-PERIAGO, E., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., SIMAL-
 485 GÁNDARA, J., MEJUTO, J.-C., & GARCÍA-RÍO, L. The mobility and degradation of
 486 pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture,**
 487 **Ecosystems & Environment**, v.123, n.4, p.247–260, 2008,
 488 doi:10.1016/j.agee.2007.07.011

489 AZEVEDO JOÃO LÚCIO. Microrganismos endofíticos. Em: Ecologia Microbiana.
 490 Melo, IS e Azevedo, JL (edts.). Editora **EMBRAPA**, Jaguariúna, São Paulo, Brasil. p.
 491 117-137, 1998

492 BAJPAI A.; SINGH B.; JOSHI S.; JOHRI B.N. Production and Characterization of an
 493 Antifungal Compound from *Pseudomonas protegens* Strain W45. **Proc. Natl. Acad.**
 494 **Sci., India**. 2017

495 BARDIN S.D e HUANG H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia diseases*
 496 in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.88-98, 2001

497 BERBEE, MARY L. The phylogeny of plant and animal pathogens in the
 498 Ascomycota. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.165-187,
 499 2001. doi:10.1006/pmpp.2001.0355

500 BIZARI, EDUARDO HENRIQUE. Estudo de herança genética da resistência à
 501 *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja. **Tese (doutorado)** - Universidade
 502 Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

- 503 BOLAND G. J.; HALL R. Relationships between the spatial pattern and number of
 504 apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. **Plant Pathology** v.
 505 37, p. 329-336, 1988
- 506 BOLAND, G. J., & HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*.
 507 **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93–108, 1994
 508 doi:10.1080/07060669409500766
- 509 BOLTON, M. D; THOMA, B. P.H. J; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de
 510 Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant
 511 Pathology**, London, v.1, n.7, p.1-16, 2006.
- 512 BONATELLI, Maria Leticia. **Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não**
 513 **cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 2012. Dissertação
 514 (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura
 515 Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2012.
 516 doi:10.11606/D.11.2012.tde-09082012-111634. Acessado em: 2018-11-16.
- 517 BOWYER PAUL; DENNING DAVID W. Environmental fungicides and triazole
 518 resistance in *Aspergillus*. National Aspergillosis **Centre, University Hospital of
 519 South Manchester; Institute of Inflammation and Repair**, University of
 520 Manchester and Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, UK.
 521 2012
- 522 BRASIL. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos, Lei
 523 n. 10.831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003.
 524 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.831.htm
- 525 BULGARI, D.; CASATI, P.; CREPALDI, P.; DAFFONCHIO, D.; QUAGLINO, F.;
 526 BRUSETTI, L.; BIANCO, P. A. Restructuring of Endophytic Bacterial Communities in
 527 Grapevine Yellow-Diseased and Recovered *Vitis vinifera* L. Plants. **Applied and
 528 environmental microbiology**, v. 77, n.14, p. 5018–5022, 2011
- 529 CAI, XUN-CHAO; LIUA, CHANG-HONG; WANGB, BAO-TONG; XUE, YA-RONG.
 530 Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with apotential
 531 biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. **Microbiological
 532 Research**, v.196, p. 89–94, 2017.
- 533 CAO YU; PI HUALIANG; CHANDRANGSU PETE; LI YONGTAO; WANG YUQI;
 534 ZHOU HAN; XIONG HANQIN, HELMANN JOHN D.; CAI YANFEI. Antagonism of
 535 Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia
 536 solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Nature Scientific Reports**, 2018.
- 537 COMPANT S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT C.; BARKA E.
 538 Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth- Promoting Bacterium

- 539 *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n.
540 4, p. 1685–1693, 2005
- 541 CREMONESE, C., PICCOLI, C., PASQUALOTTO, F., CLAPAUCH, R., KOIFMAN,
542 R. J., KOIFMAN, S., & FREIRE, C. Occupational exposure to pesticides, reproductive
543 hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. **Reproductive**
544 **Toxicology**, v.67, p.174–185, 2017. doi:10.1016/j.reprotox.2017.01.001
- 545 DI FRANCESCO, A.; MARTINI, C.; MARI, M.; Biological control of postharvest
546 diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? **Eur. J. Plant**
547 **Pathol.**, v.145 p.711-717, 2016.
- 548 DORIGHELLO, DALTON VINICIO. **Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle**
549 **biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**. Tese
550 (Doutor em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Campus de
551 Botucatu.,2017
- 552 DOUBLEDEE M. D., RUPE J. C., ROTHROCK C. S. & BAJWA S. G. Effect of root
553 infection by *Macrophomina phaseolina* on stomatal conductance, canopy
554 temperature and yield of soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 2018
- 555 DOWLING, MADELINE ELIZABETH. **Detection and Characterization of the Newly**
556 **Described Species *Botrytis fragariae* Causing Gray Mold on Strawberries in the**
557 **United States**. Dissertations, Clemson University, 2018
- 558 DUNLAP, C. A.; KIM, S.J.; KWON, S. W.; ROONEY, P.A.; *Bacillus velezensis* is not
559 a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*,
560 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later
561 heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International**
562 **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 66, p.1212–1217, 2016
- 563 ELAD, Yigal et al. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems- An
564 introduction. Cap.1 In: Elad Yigal et al. **Botrytis: Biology, Pathology and Control**.
565 Dordrecht: Springer, 2004, p. 1-412. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_2. Acesso em: 06 nov. 2007.
- 567 ETESAMI, H. e ALIKHANI, H. A. ETESAMI, H. e ALIKHANI, H. A. *Bacillus* species
568 as the most promising bacterial biocontrol agents in rhizosphere and endorhiza of
569 plants grown in rotation with each other **Eur. J. Plant. Pathol.**, 2018
570 <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1276-8>
- 571 FAN, B.; WANG, C.; SONG, X.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; GAO, X and BORRISS,
572 R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant
573 Growth Promotion and Biocontrol. **Front. Microbiol**, 2018. doi:
574 10.3389/fmicb.2018.02491

- 575 FERRAZ, L. C. L. et al. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do
576 solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.1, 2003
- 577 FILLINGER SABINE; ELAD YIGAL. Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its
578 Management in Agricultural Systems. **Ed. Springer** 2016
- 579 FIRA DJORDJE, et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species.
580 **Journal of Biotechnology**, 2018
- 581 FRAC- Fungicide Resistance Action Committee. Frac list of fungicide common
582 names – 2016. [http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-list-of-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-list-of-fungicide-common-names/frac-list-of-fungicide-common-names-(2016v2).pdf?sfvrsn=ff7f4a9a_2)
583 [fungicide-common-names/frac-list-of-fungicide-common-names-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-list-of-fungicide-common-names/frac-list-of-fungicide-common-names-(2016v2).pdf?sfvrsn=ff7f4a9a_2)
584 [\(2016v2\).pdf?sfvrsn=ff7f4a9a_2](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-list-of-fungicide-common-names/frac-list-of-fungicide-common-names-(2016v2).pdf?sfvrsn=ff7f4a9a_2) Acessado: 13/11/2018
- 585 FRAC- Fungicide Resistance Action Committee. Importance of multisite fungicides in
586 managing pathogen resistance, 2018. [http://www.frac.info/docs/default-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-multisites/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf?sfvrsn=19544b9a_2)
587 [source/publications/frac-recommendations-for-multisites/frac-statement-on-multisite-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-multisites/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf?sfvrsn=19544b9a_2)
588 [fungicides-2018.pdf?sfvrsn=19544b9a_2](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-multisites/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf?sfvrsn=19544b9a_2) Acessado: 13/11/2018
- 589 GACITÚA A, S., VALIENTE F, C., DÍAZ P, K., HERNÁNDEZ C, J., URIBE M, M., &
590 SANFUENTES V, E. Identification and Biological Characterization of Isolates with
591 Activity Inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Chilean **Journal of**
592 **Agricultural Research**, v.69, n.4, 2009. doi:10.4067/s0718-58392009000400007
- 593 GAO, Z., ZHANG, B., LIU, H., HAN, J., ZHANG, Y., Identification of endophytic
594 *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds
595 against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biological Control** 2016, doi:
596 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol>.
- 597 GARCÍA- RUIZ, C.; BÉJAR, V.; CHECA, F. F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. *Bacillus*
598 *velezensis* sp. nov., a surfactant producing bacterium isolated from the river Vélez in
599 Málaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary**
600 **Microbiology**, v. 55, 191–195, 2005
- 601 GEPP V.; VERO S.; CASSANELLO M. E.; ROMERO G.; SILVERA E.; GONZÁLEZ
602 P.; REBELLATO J.; FERREIRA Y.; BENTANCUR O. Resistencia a fungicidas en
603 *Botrytis cinerea* en el Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, v. 16, n.1, p.97-107, 2012
- 604 GIANESSI L. P. e REIGNER, N. The Value of Fungicides In. U.S. **Crop Production.**
605 **Crop Protection Research Institute.** 2005
- 606 GODOY, C.V. et al. Doenças da soja, Cap.67. In: Amorin L. et al. **Manual de**
607 **Fitopatologia.** 5 ed. Ouro Fino-MG, editora Rezenda, 2016.

- 608 GOIDANISH, G. Revisi3e del genere *Macrophomina* Petrak. Species tipica:
609 *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. nov. comb. Nec. *M. Phaseoli* (Maubl.)
610 Ashby. **Annali dela Sperimentazione Agraria**, Roma, v. 1, p. 449-461, 1947.
- 611 GOTOR-VILA, A., TEIXID3O, N., DI FRANCESCO, A., USALL, J., UGOLINI, L.,
612 TORRES, R., & MARI, M. Antifungal effect of volatile organic compounds produced
613 by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food**
614 **Microbiology**, v. 64, p.219–225, 2017. doi:10.1016/j.fm.2017.01.006
- 615 GUPTA G. K.; Sushii K. S.; RAMTEKE R. iology, Epidemiology and Management of
616 the Pathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with Special
617 Reference to Charcoal Rot of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of**
618 **phytophatology** v. 160, p. 167-180, 2012
- 619 HAO D. C.; SONG, S. M.; MU, J.; HU, W. L.; XIAO, P. G. Unearthing microbial
620 diversity of *Taxus* rhizosphere via MiSeq highthroughput amplicon sequencing and
621 isolate characterization. **Nature Scientific Reports**, 2016.
- 622 HEGEDUS, D.D e RIMMER, S.R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be”
623 a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, v.251, n. 2, p.177-184, 2005.
- 624 HEMMATI, P., ZAFARI, D., MAHMOODI, S. B., HASHEMI, M., GHOLAMHOSEINI,
625 M., DOLATABADIAN, A., & ATAEL, R. Histopathology of charcoal rot disease
626 (*Macrophomina phaseolina*) in resistant and susceptible cultivars of soybean.
627 **Rhizosphere**, v.7, p.27–34, 2018 doi:10.1016/j.rhisph.2018.06.009
- 628 IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTAT3STICA, 2018
629 [https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-](https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados)
630 [pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados.](https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados)
631 Acessado 08/11/2018
- 632 IBGE, INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTAT3STICA. Indicadores
633 Agropecu3rios 1996-2003.Estudo e Pesquisa, informa33o econ3mica. Rio de Janeiro
634 2004
- 635 ISHIKAWA, M.S.; RIBEIRO, N.R.; OLIVEIRA, E.C.; ALMEIDA, A.A.; BALBI-PEÑA,
636 M.I. Sele33o de cultivares de soja para resist3ncia 3 podrid3o negra da raiz
637 (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.38-44, 2018.
- 638 JAMBOR A., BABU S. Who Feeds the World? Global Agricultural Trade Patterns. In:
639 Competitiveness of Global Agriculture. **Springer, Cham**. 2016
- 640 JANISIEWICZ, W. J.; TAKEDA, F.; GLENN, D. M.; CAMP, M. J.; & JURICK, W. M.
641 Dark Period Following UV-C Treatment Enhances Killing of *Botrytis cinerea* Conidia
642 and Controls Gray Mold of Strawberries. **Phytopathology**, v. 106, p. 386–394, 2016.
643 doi:10.1094/phyto-09-15-0240-

- 644 JARVIS, W. R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, v. 73, n. 3,
645 p. 190- 194, 1989.
- 646 JI, S.H., PAUL, N.C., DENG, J.X., KIM, Y.S., YUN, B.S., YU, S.H. Biocontrol activity
647 of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases.
648 **Mycobiology** v.41, n.4, p.234–242, 2013,
- 649 JUNG B. K.; HONG, S. J.; PARK, G.S.; KIM M.C.; SHIN J.H. Isolation of
650 *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth promoting activity while producing
651 pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. **Appl. Biol. Chem.** v. 61, n.2,
652 p.173–180, 2018
- 653 JUNIOR, CAIO PRADO. História Econômica do Brasil. Ed. Brasiliensi, 20^o Edição,
654 1945.
- 655 KABBAGEA MEHDI; YARDENB ODED; DICKMAN MARTIN B. Pathogenic attributes
656 of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle **Plant**
657 **Science** v. 233, p.53–60, 2015.
- 658 KHAN, A.N.; SHAIR, F.; MALIK, K.; HAYAT, Z.; KHAN, M.A.; HAFEEZ, F.Y;
659 HASSAN, M.N. Molecular Identification and Genetic Characterization of
660 *Macrophomina phaseolina* Strains Causing Pathogenicity on Sunflower and
661 Chickpea. **Front. Microbiol** 2017
- 662 KHAN, S.N. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower.
663 **Mycopathology** v.5, 111-118, 2007
- 664 KIM H. U.; PEP. C.; LEE S. Y.; WEBER T. Metabolic engineering with systems
665 biology tools to optimize production of prokaryotic secondary metabolites. **Nat. Prod.**
666 **Rep.** v. 33, n° 933, 2016.
- 667 KOCH, L.M. AND HIDEBRAND, A.A. Soybean diseases in south-western Ontario in
668 1946. **Can Plant Dis. Sur.** p.27–28, 1946.
- 669 KOCSIS, M.; KRIZSICS- CSIKÁSZ, A.; SZATA, É. B.; KOVÁCS, S.; NAGY, A.;
670 MÁTAI, A.; JAKAB, G. Regulation of cluster compactness and resistance to *Botrytis*
671 *cinerea* with β -aminobutyric acid treatment in field-grown grapevine. **Vitis** v. 57,
672 p.35–40, 2018, DOI: 10.5073/vitis.2018.57.35-40
- 673 KONSTANTINOU SOTIRIOS E VELOUKAS THOMAS. Population Structure,
674 Fungicide Resistance Profile, and *sdhB* Mutation Frequency of *Botrytis cinerea* from
675 Strawberry and Greenhouse-Grown Tomato in Greece. **Plant Disease**, v. 99, n. 2,
676 2014
- 677 KREYCI, PATRÍCIA FABRETTI. ***Sclerotinia sclerotiorum*: características**
678 **morfológicas, agressividade, sensibilidade “in vitro” a fungicidas e resistência**

- 679 **de isolados a tiofanato metílico.** Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura
680 “Luiz de Queiroz”, 2016
- 681 LAMPKIN, N.; FOSTER C.; PADEL S.; MIDMORE P. The policy and regulatory
682 environment for organic farming in the European Union. **Organic Farming in**
683 **Europe: Economics and Policy**, v.1, 1999, ISBN 3-933403-00-6.
- 684 LEHNER, M.S.; PETHYBRIDGEA, S.J.; MEYERC, M.C.; DEL PONTE, M. E. Meta-
685 analytic modelling of the incidence–yield and incidence–sclerotial production
686 relationships in soybean white mould epidemics. **Plant Pathology**, v. 66, p.460–468,
687 2017
- 688 LIM, S. M.; YOON, M. Y.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; SHIN, T. S.; PARK,
689 H. W.; YU, N. H.; KIM, Y. H.; KIM, J. C. Diffusible and Volatile Antifungal Compounds
690 Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various
691 Phytopathogenic Fungi. **The plant pathology journal**, v.33, n.5, p.488-498, 2017
- 692 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/>
693 Acessado em: 06/11/2018
- 694 LIU et al. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the
695 marine *Bacillus velezensis* strain H3. **Appl Microbiol Biotechnol** v.87,p.1881–1893,
696 2010.
- 697 LIU SHENGMING; CHE ZHIPING; CHEN GENQIANG. Multiple-fungicide resistance
698 to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of
699 *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China, **Crop Protection**, p.56-61,
700 2016
- 701 LIU Y.; TAO, J.; YAN, Y.; LI, B.; LI. H.; LI, C. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis*
702 SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. **Biotechnology and**
703 **Bioengineering- Chinese journal of chemical Engineering** 2011
- 704 LOPES, R.; TSUI, S.; GONÇALVES, P. J. R. O.; QUEIROZ, M. V. A look into a
705 multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and
706 underexploited benefits for plants. **World Journal of Microbiology and**
707 **Biotechnology** 2018 <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2479-7>
- 708 MA, H.-X., CHEN, Y., WANG, J.-X., YU, W.-Y., TANG, Z.-H., CHEN, C.-J., & ZHOU,
709 M.-G. Activity of carbendazim, dimethachlon, iprodione, procymidone and boscalid
710 against *Sclerotinia* stem rot in Jiangsu Province of China. **Phytoparasitica**, v.37, n.
711 5, p.421–429, 2009. doi:10.1007/s12600-009-0057-0
- 712 MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. Microbiologia de Brock,
713 Cap.17, 14 ed. Porto Alegre: Artmed, p.960, 2016.

- 714 MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
715 (MAPA), 2018. [http://www.agricultura.gov.br/noticias/saldo-da-balanca-do-agro-em-](http://www.agricultura.gov.br/noticias/saldo-da-balanca-do-agro-em-junho-e-de-us-8-17-bilhoes)
716 [junho-e-de-us-8-17-bilhoes](http://www.agricultura.gov.br/noticias/saldo-da-balanca-do-agro-em-junho-e-de-us-8-17-bilhoes). Acessado em 08/11/2018
- 717 McCAGHEY, M.; WILBUR, J.; SMITH, D. L.; KABBAGE, M. The complexity of the
718 *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: virulence factors, resistance
719 mechanisms, and their exploitation to control Sclerotinia stem rot. **Trop. plant**
720 **pathol.** 2018.
- 721 MCGRATH, M.T. What are Fungicides. **The Plant Health Instructor**, 2004. DOI:
722 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.
- 723 MENG QINGXIAO; JIANG HE; HAO JIANJUM J. Effects of *Bacillus velezensis* strain
724 BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v.98, p.18–26, 2016
- 725 MORA, I.; CABREFIGA, J.; MONTESINOS, E.; Antimicrobial peptide genes in
726 *Bacillus* strains from plant environments. **Int. Microbiol.** v.14, n.4, p.213-223, 2011
- 727 MORGERA E.; CARO, C. B.; DURÁN, G. M. Organic agriculture and the law. Food
728 and Agriculture Organization of the United Nations, **FAO legislative study 107**,
729 Rome, 2012, ISBN 978-92-5-107220-2
- 730 MORO, EDUARDO JOÃO. **Entre a Agricultura convencional e a Agroecologia:**
731 **alianças e interfase na pesquisa agrícola e na extensão rural de Santa Catarina.**
732 Tese (doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós
733 Graduação em sociologia Política. p. 270, 2012.
- 734 MYCOBANK.<http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=24988>,
735 Acessado 10/11/2018
- 736 PALAZZINI J. M.; DUNLAPB C. A.; BOWMANC, M.J.; CHULZEA S.N; *Bacillus*
737 *velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and
738 deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster
739 profiles. **Microbiological Research** v.192, p.30–36, 2016
- 740 PAN, HUA-QI; LI, QING-LIAN; HU, JIANG-CHUN. The complete genome sequence
741 of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial
742 biological fungicide agent. **Journal of Biotechnology**, 2017.
743 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec>
- 744 PANDEY, S. P. e MOHANTY, B. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the
745 dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary–thyroid axis of a wildlife
746 bird. **Chemosphere**, v.122, p.227–234, 2015
- 747 PANDIN C.; LE COQ. D.; DESCHAMPS J.; VÉDIE R.; ROUSSEAU T.; AYMERICH
748 S.; BRIANDET R. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a

- 749 biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould
750 disease. **Journal of Biotechnology**, 2018.
751 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.014>
- 752 PARISI, M. C. M.; COSTA, J. A.; BETTI, M. A. S.; TANAKA, M. A. S. MAY-DE MIO,
753 L. L. Doenças do Morango Cap. 58. In: Amorin et al. Manual de Fitopatologia. Editora
754 Ceres, 5 ed. 2016
- 755 PASSARI A. K.; MISHRA, K. V.; SINGH, G.; SINGH, P.; KUMAR, B.; GUPTA, K. V.;
756 SARMA, K. R.; SAIKIA, R. DONOVAN, A. O.; SINGH, B. P. Insights into the
757 functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential
758 and secondary metabolites production. **Nature Scientific Reports**, 2017
- 759 PAULA JÚNIOR, T.J. et al. Mofo branco. Cap. 6. In: PRIA, MD.; SILVA, O.C. Cultura
760 do feijão: doenças e controle. Ponta Grossa: **Editora UEPG**, 2010
- 761 PEREZ, KARLA J. et al. *Bacillus spp.* Isolated from puba as a Source of
762 Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides, **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.61,
763 2017
- 764 POPKO JAMES T.; SANG HYUNKYU; LEE JAEMIN, YAMADA, TOSHIHIKO,
765 HOSHINO, YOICHIRO HOSHINO, JUNG GEUNHWA. Resistance of *Sclerotinia*
766 *homoeocarpa* field isolates to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides, **Plant**
767 **Disease** 2018
- 768 POPOVIĆ, T., BLAGOJEVIĆ, J., ALEKSIĆ, G., JELUŠIĆ, A., KRNJAJIĆ, S., &
769 MILOVANOVIĆ, P. A blight disease on highbush blueberry associated with
770 *Macrophomina phaseolina* in Serbia. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 40,
771 n.1, p.121–127, 2018
- 772 PRABHU L. PINGALI. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Bill &**
773 **Melinda Gates foundation, agricultural development, Seattle**, v. 109, n. 31,
774 p.12302–12308, 2012.
- 775 PREST et al. Fungal Effectors and Plant Susceptibility **Annu. Rev. Plant Biol.** v.66,
776 p. 513–45, 2015
- 777 RAHMAN et al. Suppressive effects of *Bacillus spp.* on mycelia, apothecia and
778 sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of
779 white mold on mustard. **Australasian Plant Pathol**, 2016
780 <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0397-4>
- 781 REIS AILTON E COSTA HELCIO. Principais doenças do morangueiro no Brasil e
782 seu controle. Circular Técnica 96, **Ministério da Agricultura Pecuária e**
783 **Abastecimento (MAPA)**, 2011.

- 784 RODRIGUES, MARCO ANTÔNIO TAVARES. **Classificação de fungicidas de**
785 **acordo com o mecanismo de ação proposto pelo Frac.** Dissertação (mestrado),
786 Universidade Estadual Paulista, 2006
- 787 ROJAS, JACQUELINE ELIZABETH. **Estudio de la diversidad genética de**
788 ***Botrytis sp* em orquídeas y la resistência al ataque del hongo.** Tese (Doutorado
789 em agronomia), Universidad Politécnica de Madrid 2016.
- 790 ROMANO LUIS HENRIQUE. **Bioprospección de Microorganismos Endofíticos**
791 **Isolados de *Tabebuia spp.* e *Hymenaea courbaril* e Identificação de Produtos**
792 **de Metabólitos de Interesse Biotecnológico.** Tese (Doutorado), Universidade
793 Federal de São Carlos, 2015
- 794 ROTHMANN L. A, MCLAREN N. W. *Sclerotinia sclerotiorum* disease prediction: A
795 review and potential applications in South Africa. **South African Journal of Science**
796 **v. 114, n. 3, 2018**
- 797 RUPP, S.; WEBER, R. W. S.; RIEGER, D.; DETZEL, P.; HAHN, M. Spread of
798 *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture,
799 **Front. Microbiol.** 2017. doi: 10.3389/fmicb.2016.02075
- 800 SAHARAN, G.S.; MEHTA, N. *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, ecology
801 and disease management. **Dordrecht: Springer**; 2008. [https://doi.org/10.1007/978-1-](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8408-9)
802 [4020-8408-9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8408-9)
- 803 SANTÍSIMA-TRINIDAD, A. B. L.; MONTIEL-ROZASA, M. DEL MAR; DIÉZ-ROJOB
804 M. A.; PASCUALA, J. A.; ROS M. Impact of foliar fungicides on target and non-target
805 soil microbial communities in cucumber crops. **Ecotoxicology and Environmental**
806 **Safety.** v.166, p. 78–85, 2018
- 807 SAUER SÉRGIO; LEITE SERGIO PEREIRA. Expansão Agrícola, Preços e
808 Apropriação de Terra Por Estrangeiros no Brasil. **RESR**, Piracicaba-SP, v. 50, n. 3,
809 p. 503-524, 2012.
- 810 SCHUMACHER, J.; TUDZYNSKI, P. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*.
811 In: PÉREZ-MARTÍN, J.; DI PIETRO, A. Morphogenesis and pathogenicity in fungi.
812 Berlim: **Springer-Verlag.** 2012. p. 225-242
- 813 SHRIVASTAVA P.; KUMAR R.; YANDIGERI M.S. In vitro biocontrol activity of
814 halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against
815 *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.
816 24, p.192–199, 2017
- 817 SIMIONATO A.S.; NAVARRO M.O.P.; DE JESUS M.L.A.; BARAZETTI A.R.; DA
818 SILVA C.S.; SIMÕES G.C.; BALBI-PEÑA M.I.; DE MELLO J.C.P.; PANAGIO L.A.;
819 DE ALMEIDA R.S.C.; ANDRADE G.; DE OLIVEIRA A.G. The Effect of Phenazine-1-

- 820 Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas*
821 *aeruginosa* LV Strain. **Front. Microbiol**, v. 8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01102
- 822 SOBRINHO ATHAYDE CÂNDIDO. **Patossistema caupi x *Macrophomina***
823 ***phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do**
824 **patógeno**. Tese (Doutor em agronomia) Escola Superior Luiz de Queiroz 2004.
- 825 SOUZA, W. R.; PARMA, M. M.; SANTOS, S. N.; ÁVILA L. A.; PELLIZARI V. H.;
826 MELO I. S. Isolamento de *Bacillus* sp. e gêneros correlatos de ecossistemas
827 antárticos e potencial de prospecção para descoberta de antibióticos. **5º Congresso**
828 **Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC**, 9 a 11 de agosto de 2011,
829 Campinas, SP
- 830 SUMIDA CIRO HIDEKI. **Controle químico e biológico do mofo branco na cultura**
831 **da soja**. 2012. Tese (Doutorado em Agronomia com área de concentração em
832 Fitossanidade/Fitopatologia). Universidade Estadual de Londrina, 2012
- 833 THE WORLD BANK.
834 <[https://databank.worldbank.org/data/reports.aspx?source=2&series=AG.LND.AGRI.](https://databank.worldbank.org/data/reports.aspx?source=2&series=AG.LND.AGRI.ZS&country=>)
835 [ZS&country=>](https://databank.worldbank.org/data/reports.aspx?source=2&series=AG.LND.AGRI.ZS&country=>)>. Acessado: 17/03/2019
- 836 TIMMUSK, S., BEHERS, L., MUTHONI, J., MURAYA, A., & ARONSSON.
837 Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement.
838 **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017 doi:10.3389/fpls.2017.00049
- 839 TOSI, S.; COSTA, C.; VESCO, U.; QUAGLIA, G.; GUIDO, G. A 3-year survey of
840 Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural
841 pesticides, **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 208-218, 2018
- 842 VAN LENTEREN et al. Biological control using invertebrates and microorganisms:
843 plenty of new opportunities. **BioControl** v. 63, p.39–59, 2018
- 844 VELANDIA, CARLOS ANDRÉ MORENO. **Interactions between *Bacillus***
845 ***amyloliquefacies* Bs006, *Fusarium oxysporum* Map5 e Cape gooseberry**
846 **(*Physalis peruviana*)**. Dissertation (Ph.D), Nacional University of Colombia. Bogotá
847 2017.
- 848 VERMA, P., YADAV, A. N., KHANNAM, K. S., KUMAR, S., SAXENA, A. K., &
849 SUMAN, A. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of
850 *Bacilli* associated with wheat (*Triticum aestivum*L.) rhizosphere from six diverse agro-
851 ecological zones of India. **Journal of Basic Microbiology**, v.56, n.1, p.44–58, 2015
852 doi:10.1002/jobm.201500459
- 853 VINODKUMAR, S.; NAKKEERAN, S; RENUKADEVI, P.; MALATHI, V. G. Biocontrol
854 Potentials of Antimicrobial Peptide Producing *Bacillus* Species: Multifaceted

- 855 Antagonists for the Management of Stem Rot of Carnation Caused by *Sclerotinia*
856 *sclerotiorum*. *Front. Microbiol*, 2017.
- 857 WANG, L. T.; LEE, F. L.; TAI, C. J. KUO, H.P. *Bacillus velezensis* is a later
858 heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. **International Journal of**
859 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.671–675, 2008.
- 860 XU TING; ZHU TIANHUI E LI SHUJIANG. b-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus*
861 *velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. **World J**
862 **Microbiol Biotechnol**, v.32, n.26, 2016 DOI 10.1007/s11274-015-1985-0
- 863 YADAV A.N.; SACHAN, G.S.; VEMA P. SAXENA A. K. Bioprospecting of plant
864 growth promoting psychrotrophic *Bacilli* from the cold desert of north western Indian
865 Himalayas. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 54, p. 142-150, 2016
- 866 YU HAI e SUTTON J. C. Effects of inoculum density, wetness duration, and
867 temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry.
868 **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.20, n.3, p.243-252, 1998, DOI:
869 10.1080/07060669809500390
- 870 YU, G.Y., SINCLAIR, J.B., HARTMAN, G.L., BERTAGNOLLI, B.L., Production of
871 iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biol.**
872 **Biochem.** v.34, p.955–963, 2002.
- 873 ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; & GU, Y. Study of the
874 antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its
875 antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, p.292–297, 2010.
876 doi:10.1016/j.biortech.2009.07.071
- 877

878
879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

ANEXO

892



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A7DAEBE

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A7DAEBE**
 Usuário: **UEL**
 CPF/CNPJ: **78.640.489/0001-53**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Bacillus spp

Título da Atividade: **Estudo de bactérias formadoras de endósporos com potencialidade de agentes para biológico, da biologia molecular ao biorreator**

Equipe

Admilton Gonçalves de Oliveira Junior UEL
Julia Pizarini Baptista UEL
Maria Isabel Balbi-Peña UEL

Parceiras Nacionais

08.879.643/0001-69 / Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos Ltda

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

895

Identificação do meio onde foi divulgado: **Dados de genoma: Genome announcements**

Data do Cadastro: **25/05/2018 16:02:45**
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:05** de **25/05/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

896