

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

Caracterização de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à
cultura da canola (*Brassica napus* L.)

IGOR DANIEL ALVES RIBEIRO

Orientação: Prof^a. Dr^a. Luciane M. P. Passaglia

Co-orientação: Dr^a. Evelise Bach

Porto Alegre, RS

Março de 2019

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

Caracterização de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à
cultura da canola (*Brassica napus* L.)

IGOR DANIEL ALVES RIBEIRO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular da
UFRGS como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Genética e Biologia
Molecular

Orientação: Prof^a. Dr^a. Luciane M. P. Passaglia

Co-orientação: Dr^a. Evelise Bach

Porto Alegre, RS

Março de 2019

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Microbiologia Agrícola, do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e contou com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

AGRADECIMENTOS

À Professora Luciane Passaglia pela oportunidade, orientação e paciência durante a realização desse trabalho.

À Evelise Bach pela dedicação extrema como co-orientadora, e pelas suas imensas contribuições, fundamentais na melhoria desse trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Microbiologia Agrícola por seu apoio direto ou indireto no desenvolvimento desse trabalho: Karen Thomeny, Andress Pontes, Júlia Heinzmann, Adriana Ambrosini, Gabriela Fernandes, Priscila Silveira, Amanda Rochol, Camila Gazolla, Renan Zanini, Felipe Guella, Fernando Sant'Anna e Eliando Espíndula.

À Letícia Gal, por todo auxílio e por ter sido sempre muito prestativa, e a todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal.

Ao Elmo Cardoso e ao Rodrigo Fritz e toda equipe do PPGBM.

À Fernanda Lopes e ao Alexsandro Dallegrave pelo auxílio com as análises por espectrometria de massas.

Ao Pesquisador Gilberto Tomm, da Embrapa Trigo, pelo fornecimento das sementes de canola utilizadas nos experimentos.

Aos Professores Adriano Brandelli, Marcia Pinheiro Márgis e André Luiz Martinez de Oliveira, por terem gentilmente aceito realizar a avaliação desse trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	1
1.2	Disponibilização de nutrientes e outros mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal: importância no contexto agrônômico e ambiental.....	2
1.2.1	Disponibilização de fósforo solúvel por PGPB.....	5
1.3	Mecanismos indiretos de promoção do crescimento vegetal: biocontrole.....	7
1.4	A cultura da canola: aspectos gerais e perspectivas.....	10
1.5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e a podridão das hastes em Canola	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivos gerais.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	CAPÍTULOS	18
3.1	Characterization of antifungal activity against <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities by bacterial isolates from canola (<i>Brassica napus</i> L.) roots.....	18
3.2	Mineral phosphate solubilization by <i>Paenibacillus graminis</i> strains isolated from canola (<i>Brassica napus</i> L.) roots.....	45
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC- 1-aminociclopropano-1-carboxilato
AIA- ácido indol acético
ANI- identidade média de nucleotídeos
ARA- ensaio de redução do acetileno
BGC- grupamento gênico biossintético
DDH- hibridização DNA:DNA
FBN- fixação biológica do nitrogênio
ISR- indução de resistência sistêmica
MPS- solubilização de fosfato mineral
NRPS- peptídeo sintetase não-ribossomal
P-fósforo
PGP- promoção ou promotor de crescimento vegetal
PGPB- bactérias promotoras de crescimento vegetal
PKS- sintetases de policetídeos
PSB- bactéria solubilizadora de fosfato
RP- rocha fosfática
SAR-resistência sistêmica adquirida
UFC- unidades formadoras de colônia
VOC- composto orgânico volátil

RESUMO

O sistema radicular abriga uma ampla diversidade de bactérias que vivem no solo rizosférico ou colonizando endofiticamente o interior dos tecidos vegetais. Estes micro-organismos podem promover o crescimento das plantas, principalmente pela modulação dos níveis de fitohormônios e por favorecerem a aquisição de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (P). Também, como mecanismo indireto, inibem o crescimento de fitopatógenos. Por essas características, as PGPB (*plant growth promoting bacteria*) são agronomicamente empregadas como biofertilizantes ou agentes de biocontrole. A aplicação destes produtos biológicos tem um potencial elevado para aumentar a produção agrícola e reduzir o uso de fertilizantes químicos ambientalmente prejudiciais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as habilidades de promoção do crescimento vegetal e de biocontrole de bactérias provenientes de raízes de canola. Foram avaliadas trinta bactérias gram-positivas formadoras de esporos, pertencentes a quatro gêneros: *Bacillus* (24), *Paenibacillus* (4), *Lysinibacillus* (1) e *Microbacterium* (1). Esses micro-organismos foram capazes de fixar nitrogênio, sintetizar auxinas, solubilizar fosfato, produzir enzimas hidrolíticas e sideróforos. Cinco isolados apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra o patógeno de canola *Sclerotinia sclerotiorum*, e quatro desses isolados suprimiram o crescimento do fungo pela produção de compostos orgânicos voláteis (VOC). Os genomas das bactérias antagonistas foram sequenciados e três isolados (01TAZ, 08TAZ, 32PB) foram identificados como *Bacillus safensis*, um (7PB) como *Bacillus pumilus* e um (16PB) como *Bacillus megaterium*, usando métricas genômicas. Vários *clusters* gênicos de antimicrobianos e metabólitos secundários foram encontrados em comum no genoma dos isolados, usando a ferramenta de mineração de genoma antiSMASH. Esses grupos gênicos incluíram agrupamentos biossintéticos de lipopeptídeos, bacteriocinas e sideróforos. No entanto, nenhum tipo de lipopeptídeo antimicrobiano foi identificado por espectrometria de massas nos extratos das culturas bacterianas. Apesar dos resultados obtidos *in vitro* e do potencial genômico para o biocontrole, estes isolados foram incapazes de proteger a canola contra a infecção por *S. sclerotiorum* em condições de câmara de crescimento. A solubilização de P foi uma das características de promoção de crescimento vegetal mais comum entre os isolados. Essas bactérias foram triadas quanto à solubilização de diferentes fosfatos insolúveis: hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), FePO_4 , AlPO_4 , e fosfato de rocha (RP). Seis isolados foram capazes de solubilizar hidroxiapatita e RP. Os três melhores (6PB, 20PB, 27PB) foram selecionados e melhor caracterizados. Essas bactérias foram identificadas como *Paenibacillus graminis* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e uso de métricas genômicas. Foi verificada a influência de fatores nutricionais, tais como a fonte de carbono, nitrogênio e P solúvel, sobre a eficiência de solubilização. As bactérias produziram exopolissacarídeos utilizando P insolúvel e também formaram biofilme sob condições de deficiência de P. Todos os isolados selecionados reduziram o pH do meio de cultura e produziram vários ácidos orgânicos, detectados por espectrometria de massas. Essas características constituem um possível mecanismo de solubilização de P. A análise do genoma dos isolados 6PB e 20PB revelou a presença de diferentes genes relacionados ao metabolismo e homeostase do P. Todas estas características destacam as bactérias avaliadas como potenciais candidatos a agentes de promoção do crescimento de plantas.

Palavras-chave: bactéria solubilizadora de fosfato, atividade antifúngica, *Sclerotinia sclerotiorum*; *Brassica napus*.

ABSTRACT

Plant root systems harbor a wide diversity of bacteria living in the rhizospheric soil or colonizing endophytically the inner tissues of plants. These microorganisms can promote plant growth, mainly by modulating phytohormone levels, and by favoring the acquisition of nutrients, especially nitrogen and phosphorus (P). They can also inhibit the growth of phytopathogens as an indirect mechanism of plant growth promotion. Due to these features, PGPB (plant growth promoting bacteria) are agronomically used as biofertilizers or biocontrol agents. The application of these biological products has an elevated potential to increase crop yields and reduce the use of environmentally harmful chemical fertilizers. The aim of this work was to characterize the plant growth promotion and biocontrol abilities of bacterial isolates from canola roots. The thirty evaluated gram-positive spore-forming bacteria belong to four genera: *Bacillus* (24), *Paenibacillus* (4), *Lysinibacillus* (1) and *Microbacterium* (1). These microorganisms were able to fix nitrogen, synthesize auxins, solubilize phosphate, produce hydrolytic enzymes and siderophores. Five isolates displayed antifungal activity *in vitro* against the canola pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, and four of these isolates were able to suppress fungal growth by volatile organic compounds (VOCs) production. The genomes of these bacteria were sequenced and three isolates (01TAZ, 08TAZ and 32PB) were identified by genomic metrics as *Bacillus safensis*, one isolate (7PB) as *Bacillus pumilus* and one (16PB) as *Bacillus megaterium*. Several antimicrobial gene clusters were found in common among the genome of the isolates using the genome mining tool antiSMASH. These gene clusters included lipopeptides, bacteriocins and siderophores biosynthetic clusters. However, no antimicrobial lipopeptide compound was identified by mass spectrometry in bacterial culture extracts. In spite of the *in vitro* results and the genomic potential for biocontrol, these isolates were unable to protect canola plants against *S. sclerotiorum* in growth chamber conditions. One of the most spread plant growth promotion traits among the isolates was phosphate solubilization. The microorganisms were screened for solubilization of different insoluble P sources: Hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), FePO_4 , AlPO_4 and Rock phosphate (RP). Five isolates were able to solubilize Hydroxyapatite and RP. The three best isolates (6PB, 20PB, and 27PB) were selected and better characterized. These bacteria were identified as *Paenibacillus graminis* by 16S rRNA gene sequencing and genomic metrics. The influence of nutritional factors such as carbon and nitrogen sources or soluble P on their solubilization efficiency was evaluated. The isolates produced exopolysaccharide using P insoluble source and formed biofilm under P deficiency. All selected isolates reduced the pH of the culture medium and produced several organic acids, detected by mass spectrometry. These characteristics constitute a possible mechanism of phosphate solubilization. The genomic analyses of 6PB and 20PB isolates revealed the presence of different genes related to phosphate metabolism and homeostasis. All these features highlight the characterized bacteria as potential candidates for plant growth promotion agents.

Key-words: Phosphate solubilizing bacteria; antifungal activity; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Brassica napus*.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Bactérias promotoras do crescimento vegetal

A rizosfera compreende a porção de solo sob influência direta do sistema radicular. Essa região sustenta uma exuberante diversidade microbiana, que se difere tanto constitutivamente, quanto funcionalmente da comunidade microbiana presente nos solos adjacentes (Philippot et al., 2013; Kuzyakov e Blagodatskaya, 2015; Lugtenberg, 2015). Diversas bactérias mutualísticas se estabelecem na rizosfera, beneficiando-se nutricionalmente dos compostos orgânicos liberados no exsudato vegetal. Em contrapartida, esses organismos estão associados a diversos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, sendo antropicamente explorados na prática agrícola (Prathap e Bd 2015; Venturi e Keel, 2016).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal ou PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) podem se estabelecer no solo rizosférico como organismos de vida livre, assim como colonizar a superfície das raízes das plantas (rizoplano). Ocasionalmente, diversas bactérias rizosféricas também apresentam a capacidade de penetrar e colonizar endofiticamente os vegetais (Bulgarelli et al., 2013; Vejan et al., 2016; Gosal et al., 2017). Os ditos micro-organismos endofíticos são, por definição, aqueles que se estabelecem no interior dos tecidos vegetais sem, no entanto, provocar qualquer dano aparente à planta hospedeira ou levar à formação de estruturas externas perceptíveis (Podolich et al., 2015; Santoyo et al., 2016).

A capacidade das PGPB em promover o crescimento vegetal está associada tanto a mecanismos de atuação direta, quanto indireta. Diretamente, esses micro-organismos atuam no aumento da disponibilização de nutrientes do solo, no fornecimento de nitrogênio, pelo processo de fixação biológica desse composto, e na produção e regulação dos níveis de hormônios vegetais (Kaur et al., 2016; Ahemad e Kibret, 2014). Os mecanismos indiretos relacionam-se à capacidade dessas bactérias de participarem na proteção do vegetal contra patógenos e, também, na redução de danos provocados por estresses abióticos (Dey et al., 2014; Hassen et al., 2016).

A interação benéfica entre plantas e PGPB encontra uma ampla aplicabilidade biotecnológica, sendo visada excepcionalmente no desenvolvimento de inoculantes, em substituição ao uso convencional de agroquímicos. Os inoculantes envolvem combinações

entre linhagens de micro-organismos, aditivos, substâncias carreadoras e protetoras, em formulações diversas e adaptadas à diferentes propósitos agronômicos (Bashan et al., 2014; Preininger et al., 2018). Podem ser empregados como biofertilizantes, fitoestimulantes, agentes de controle biológico ou mesmo com propósitos de biorremediação. Essas formulações são de grande importância, uma vez que proporcionam ganhos de produtividade com reduzidos impactos sobre o ambiente (Baez-Rogelio et al., 2017; Alori e Babalola, 2018).

1.2. Disponibilização de nutrientes e outros mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal: importância no contexto agronômico e ambiental

O nitrogênio é o macronutriente mais limitante para o crescimento vegetal. Apesar de em sua composição gasosa (N_2) representar o maior constituinte atmosférico (78%), essa forma não pode ser diretamente assimilada pela maioria dos organismos, incluindo vegetais. Isso torna o processo biológico de fixação de nitrogênio, realizado por bactérias diazotróficas, extremamente importante para o desenvolvimento vegetal (Chanway et al., 2014). Essas bactérias possuem um complexo enzimático conhecido como nitrogenase, que é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3). Essa pode ser diretamente absorvida pelas plantas ou posteriormente convertida em demais compostos assimiláveis pelos vegetais (Hoffmann, 2007; Pii et al., 2015).

A elevada demanda nutricional de nitrogênio torna a prática agrícola fortemente dependente de um uso extensivo de fertilizantes nitrogenados. As formas nitrogenadas incorporadas nesses agroquímicos são provenientes, principalmente, do processo de Haber–Bosch, realizado sob condições de altas temperaturas e pressão (Galloway et al., 2013; Jez et al., 2016). Os elevados gastos energéticos inerentes a essa produção industrial, somados a alta demanda desse nutriente, fazem com que a aplicação de nitrogênio assumam os maiores custos no processo de fertilização para a maioria das culturas agrícolas (Gellings e Parmenter, 2004).

Além dos aspectos econômicos, o uso de fertilizantes nitrogenados esbarra na problemática ambiental. A produção e utilização desses adubos são responsáveis por grandes emissões de gases do efeito estufa (Garcia et al., 2013; Zahoo et al., 2014). Além disso, parte do nitrogênio aplicado nos solos pode ser perdida pela volatilização da amônia, sendo depositado no ambiente junto à precipitação pluvial. O metabolismo microbiano desses

compostos é responsável pela emissão de óxido nitroso, potente gás do efeito estufa que também atua na depleção da camada de ozônio (Cameron et al., 2013; Fowler et al., 2013). Convém também ressaltar que parte do nitrogênio introduzido nos solos pode ser lixiviado, contribuindo para o processo de eutrofização dos corpos hídricos (Erisman et al., 2013).

Uma alternativa em substituição, ou ao menos à redução, no uso de fertilizantes nitrogenados é a adoção de inoculantes agrícolas a base de bactérias diazotróficas (Lesueur et al., 2016). Para leguminosas, um grupo bacteriano genericamente conhecido como rizóbios é capaz de estabelecer uma relação simbiótica com o vegetal, suprimindo a necessidade nutricional da planta por nitrogênio. Ao colonizar as raízes, essas bactérias são capazes de se estabelecer em nódulos que proporcionam um ambiente de alta eficiência para o processo de fixação (Laranjo et al., 2014; Abd-Alla et al., 2014). Em culturas como a soja, o uso de inoculantes a base de rizóbios pode chegar a dispensar completamente a aplicação de adubos nitrogenados, sem perdas de produtividade (Hungria e Mendes, 2015).

Diversas espécies vegetais de interesse agrônomo, como, por exemplo, as pertencentes aos gêneros *Brassica* e *Poacea*, são incapazes de estabelecerem relações simbióticas similares à da soja com os rizóbios e, portanto, incapazes de formar nódulos. Sabe-se, no entanto, que esses grupos taxonômicos também se beneficiam, em diferentes níveis, da interação com demais grupos de bactérias diazotróficas. Essas podem se associar endofiticamente ou se estabelecer na rizosfera (Santi et al., 2013; Carvalho et al., 2014).

Depois do nitrogênio, o fósforo (P) é o macronutriente mais limitante para o crescimento vegetal. Nos solos, esse elemento encontra-se sob formas pouco acessíveis à captação direta pelas plantas (Alori et al., 2017). O P normalmente faz parte da constituição de compostos minerais de baixa solubilidade ou encontra-se retido na matéria orgânica (Barea e Richardson, 2015). O papel desempenhado por PGPB na disponibilização desse elemento relaciona-se, especialmente, à capacidade de mineralizar o fósforo orgânico, utilizando-se de um amplo arsenal enzimático, ou solubilizar os compostos minerais. O último processo está relacionado, principalmente, à produção de ácidos, entre outros mecanismos cogitados (Shen et al. 2011; Gupta e Sahu, 2017)

O fornecimento de alguns micronutrientes também pode ser facilitado pela atuação de micro-organismos rizosféricos. As PGPB estão relacionadas à solubilização de zinco a partir de compostos como ZnO e ZnCO₃ presentes no solo. Acredita-se que os mecanismos

de solubilização desses compostos se assemelham aos descritos para a solubilização de fosfato mineral (Saravanan et al., 2011; Gandhi e Muralidharan, 2016).

Quanto ao fornecimento de ferro, bactérias rizosféricas estão envolvidas, principalmente, na produção de moléculas conhecidas como sideróforos (Saha et al., 2016). Tratam-se de compostos orgânicos de baixo peso molecular, secretados no meio extracelular e que possuem a capacidade de complexar íons Fe^{+3} . Esse elemento, muitas vezes presente em baixas concentrações, é adquirido pelas células bacterianas ao reincorporar os sideróforos que a ele se complexaram (Ali e Vidhale, 2013). Plantas também são caracterizadas pela produção de um tipo análogo de quelante, conhecido como fitosideróforo. Os receptores vegetais para essas moléculas podem se ligar e incorporar sideróforos bacterianos. Desse modo, PGPB produtoras desses metabólitos conseguem atuar no suprimento nutricional desse elemento para plantas (Saharan e Nehra, 2011; Ahmed e Holmström, 2014).

PGPB são também descritas por sua capacidade de sintetizar e / ou regular os níveis de algumas das principais classes de hormônios vegetais (giberelinas, auxinas, citocininas, etileno, entre outros). A produção de auxinas, em especial do ácido indol-3-acético, seu principal representante, é extensivamente caracterizada em bactérias associativas de plantas (Spaepen, 2015; Egamberdieva et al., 2017). As auxinas estão relacionadas a vários processos fisiológicos, participando desde processos celulares básicos, até importantes alterações morfológicas, como o desenvolvimento de raízes, diferenciação de tecidos, entre outros (Sauer et al., 2013). A produção de AIA por micro-organismos afeta o balanço de auxinas nas plantas hospedeiras, podendo promover um maior alongamento radicular. Isso impacta diretamente na captação de nutrientes, favorecendo o crescimento vegetal (Spaepen e Vanderleyden, 2011).

Outro mecanismo relacionado à regulação de hormônios vegetais é a produção bacteriana da enzima ACC deaminase. Essa enzima é capaz de degradar o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor metabólico na síntese do etileno. Esse hormônio está envolvido principalmente na resposta do vegetal a condições ambientais de estresse e relaciona-se a processos de senescência e abscisão (Glick, 2014; Gontia-Mishra et al., 2014). A capacidade bacteriana de reduzir os níveis de etileno promove uma maior

tolerância dos vegetais àquelas condições nas quais as altas concentrações do hormônio provocam efeitos fisiológicos danosos (Glick, 2015).

1.2.1 Disponibilização de fósforo solúvel por PGPB

Apesar de estar presente em muitos tipos de solo em concentrações relativamente altas (200 a >1000 mg kg⁻¹), em média, a concentração de fósforo solúvel (H₂PO₄⁻ e HPO₄²⁻) é 0,05 mg kg⁻¹, menos de 0,1% da concentração total desse elemento (Hopkins, 2015). Em solos com alto teor de matéria orgânica, o fósforo está principalmente imobilizado em compostos como inositol fosfato (fitato do solo), que podem compreender de 30 a 50% do fósforo total (Ahmed e Shahab, 2009).

A fertilização a base de fósforo tem uma baixa eficiência de aproveitamento. Estima-se que 75 – 90% do fósforo introduzido no solo via adubação química seja precipitado junto a íons de cálcio, ferro e alumínio, sob a forma de compostos altamente insolúveis (Sindhu et al., 2014). A maioria das áreas agricultáveis no mundo compreende solos com alta capacidade de retenção de fósforo (Kochian, 2012). Em solos ácidos, há o predomínio de fosfatos de ferro e alumínio, que compreendem os mais baixos índices de solubilidade, enquanto que em solos básicos, os fosfatos de cálcio são as formas insolúveis prevalentes (Bashan et al., 2013).

A principal matéria prima para produção de fertilizantes fosfatados são as rochas fosfáticas, que constituem um recurso mineral limitado. Há grandes divergências quanto à durabilidade das atuais reservas, mas algumas estimativas apontam que uma exploração intensiva poderia levar à completa depleção desse recurso em algumas décadas (Cooper et al., 2011; Reijnders, 2014; Baveye, 2015). Além dessa problemática controversa, há uma limitação ambiental em relação ao uso de fertilizantes fosfatados. A lixiviação do fósforo em solos cultivados também representa um grande contribuinte para o processo de eutrofização (Dodds e Smith, 2016).

Muitas PGPB têm sido extensivamente caracterizadas por sua capacidade de auxiliar no fornecimento de fósforo aos vegetais. Esses micro-organismos podem atuar tanto na mineralização de fósforo orgânico, quanto na solubilização do fosfato mineral. Essa habilidade é observada para grupos bacterianos taxonomicamente diversos, tais como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, entre outros (Barea e Richardson, 2015; Oteino et al., 2015). A utilização dessas

bactérias como inoculantes agrícolas é apontada como uma importante estratégia para a redução do uso de fertilizantes fosfatados (Owen et al. 2015)

Embora o fitato seja o constituinte majoritário do fósforo orgânico presente no solo, outras formas orgânicas incluem ácidos nucleicos, fosfolipídeos, fosfomonoésteres, fosfodiésteres, fosfonatos, entre outros (Rodríguez e Fraga, 1999; Turner e Blackwell, 2013). O processo de mineralização ocorre principalmente pela produção de três grupos de enzimas: (1) fosfatases não específicas; (2) fitases e (3) fosfonatases e C-P liases, essas últimas relacionadas a degradação de compostos mais recalcitrantes, como fosfonatos que envolvem ligações do tipo P-C (Ingle e Padole, 2017)

As fosfatases inespecíficas (fosfohidrolases) atuam na quebra de ligações fosfoéster e fosfoanídricas e, conforme o pH ótimo de atividade, podem ser classificadas em fosfatases ácidas ou alcalinas, sendo as primeiras o grupo mais frequente (Khan et al., 2009; Behera et al., 2014). Já as fitases são fosfatases específicas que clivam as ligações entre o inositol e os resíduos de ácido fosfórico presentes no fitato. Entre os tipos mais comuns de fitases, 6-fitase e 3-fitase, a última é principal forma produzida por micro-organismos (Mukhametzyanova et al. 2012). A inoculação em campo com bactérias produtoras de fitases tem sido associada a um aumento na aquisição de fósforo e a um maior estímulo no crescimento vegetal (Singh e Satyanarayana, 2011).

O principal mecanismo descrito para a solubilização de fosfato mineral é a produção de ácidos orgânicos, como o acetato, lactato, malato, oxalato, citrato, glucanato e α -cetoglutarato, que representam alguns dos compostos mais proeminentes (Vassilev et al., 2014). Esses ácidos atuam deslocando os cátions (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{+2}) associados ao fosfato, permitindo, então, sua liberação sob a forma aniônica solúvel (Khan et al., 2014). A produção desses ácidos está condicionada, principalmente, à oxidação direta de açúcares de baixo peso molecular, como a glicose (Krishnaraj e Dahale, 2014).

O primeiro gene relacionado ao fenótipo de solubilização de fosfato mineral (MPS+) foi clonado por Goldstein e Liu (1987) a partir de *Erwinia herbicola*. Atualmente, os mecanismos bioquímicos e moleculares mais bem caracterizados em relação a essa característica envolvem a produção de ácido glucônico e seus derivados, pela via de oxidação direta da glicose (Sashidhar e Podile, 2010). A síntese desse composto ocorre através da enzima glucose desidrogenase (GDH), expressa no espaço periplasmático das

bactérias, e é dependente da pirroloquinolina quinona (PQQ) como co-fator. Sequencialmente, o ácido 2-cetoglucônico pode ser produzido a partir do ácido glucônico pela enzima gluconato desidrogenase (GADH) (Goldstein, 1995). Embora seja um mecanismo bastante comum e bem caracterizado em organismos gram-negativos, também tem sido descrito para estirpes solubilizadoras gram-positivas (Farhat et al., 2015).

1.3 Mecanismos indiretos de promoção do crescimento vegetal: biocontrole

Indiretamente, as bactérias endofíticas e rizosféricas também promovem o crescimento vegetal inibindo o crescimento de organismos invasores, suprimindo processos infecciosos e minimizando os efeitos deletérios provocados por fitopatógenos (Enebe e Babalola, 2019). Essa capacidade atribui a essas bactérias uma posição estratégica como agentes de controle biológico (Eljounaidi et al. 2016). Sua efetividade é demonstrada não apenas contra patógenos microbianos, já que as PGPB têm sido satisfatoriamente utilizadas no controle de insetos e nematoides (Ramjegathesh et al., 2013; Mhatre et al., 2019).

Os principais mecanismos relacionados à capacidade protetiva desses organismos envolvem: competição, antibiose, modulação dos mecanismos de defesa vegetal, produção de enzimas hidrolíticas e outros metabólitos (Prashar et al., 2013). Tanto PGPB quanto patógenos microbianos disputam os mesmos sítios de colonização nos vegetais hospedeiros. Ao ocupar esse ambiente, consumindo os nutrientes essenciais disponíveis, essas bactérias benéficas restringem o desenvolvimento dos patógenos competidores (Hassani et al., 2018). A já mencionada síntese de sideróforos por PGPB é um importante fator, também relacionado a esse processo, uma vez que a produção dessas substâncias limita a disponibilidade de ferro para o crescimento de micro-organismos eventualmente prejudiciais (Saha et al., 2016).

A antibiose se refere à atividade antagônica mediada pela produção de metabólitos microbianos com efeito inibitório direto sobre demais organismos susceptíveis (Fravel, 1988). O arsenal de biomoléculas relacionadas a esse processo em PGPB é vasto, envolvendo diversas classes de metabólitos (Raaijmakers e Mazzola, 2012). Diferentes *clusters* de genes biossintéticos (*Biosynthetic gene cluster* - BGC) de antimicrobianos estão presentes no genoma de espécies com capacidade de biocontrole, sendo os BGC relacionados à produção de policetídeos e peptídeos antimicrobianos os mais frequentes. Os últimos compostos podendo ser, ou não, de síntese ribossomal (Olanrewaju et al., 2017)

Os policetídeos englobam uma das mais extensas e numerosas classes de compostos naturais, incluindo poliéteres, polifenóis, polienos e macrolídeos. São sintetizados por complexos enzimáticos conhecidos como policetídeo sintase (PKS), que utilizam Acil-CoA como moléculas precursoras básicas (Hertweck, 2009; Miyanaga, 2017). Entre os peptídeos antimicrobianos produzidos por síntese ribossomal, as bacteriocinas constituem a principal classe e estão igualmente envolvidas em processos de biocontrole por PGPB. (Subramanian e Smith, 2015). Essas substâncias têm ação inibitória principalmente sobre bactérias taxonomicamente relacionadas. As bacteriocinas, positivamente carregadas, possuem alta afinidade pelas membranas citoplasmáticas, com cargas opostas, provocando a formação de poros letais, com a perda de controle celular sobre a difusão de substâncias. Sendo que esses antimicrobianos podem, também, atuar na inibição da síntese de parede celular bacteriana (Hassan et al., 2012; Martínez et al., 2016).

Os peptídeos não ribossomais são sintetizados por complexos enzimáticos conhecidos como NRPS (*nonribosomal peptide synthetases*) (Finking e Marahiel, 2004). Essas enzimas possuem uma organização distribuída em módulos, contendo os domínios catalíticos básicos (adenilação, tiolação e condensação) para incorporação sequencial de cada aminoácido específico na estrutura. Tipicamente, a síntese dessas substâncias pode envolver a inclusão de vários aminoácidos não proteínogênicos (Strieker et al., 2010; Süßmuth e Mainz, 2017).

Os lipopeptídeos são uma das classes mais importantes de derivados de peptídeos não ribossomais. Formados pela ligação de uma cadeia lipídica à um peptídeo cíclico ou linear, diferenciam-se tanto pela composição das sequências de aminoácidos, quanto nas características da porção hidrofóbica (Cochrane e Vederas, 2016). Algumas classes mais comuns são surfactinas, pumilacidinas, liquenisina, bacilomicina, micosubtilisina, iturinas e fengicinas. A atividade biológica de muitos lipopeptídeos é atribuída à capacidade desses compostos em provocar disfunções na membrana citoplasmática. O espectro de ação pode ser amplo, inibindo agentes patogênicos bacterianos, fúngicos e também virais (Meena e Kanwar, 2015; Mnif e Ghribi, 2015).

Outra classe de biomoléculas relacionadas ao antagonismo bacteriano são enzimas líticas, que têm um papel excepcionalmente importante na inibição de fungos patogênicos. As principais hidrolases envolvidas, quitinases (endo e exo - quitinases), β -1,3-glucanase e

proteases, atuam na degradação dos componentes majoritários da parede celular desses organismos (Brzezinska et al., 2014; Olanrewaju et al., 2017). Algumas PGPB são ainda capazes de colonizar extensivamente as hifas de fungos fitopatogênicos, formando micro-colônias e se estabelecendo como biofilme nessas estruturas. Ao parasitá-los, afetam diretamente a sobrevivência, germinação e esporulação desses micro-organismos, restringindo a colonização de plantas susceptíveis (Lugtenberg et al., 2013).

As PGPB também podem agir como importantes moduladores do sistema de defesa vegetal, induzindo um importante mecanismo de proteção que é a indução de resistência sistêmica (*Induced Systemic Resistance* - ISR). Esse estado torna as plantas menos susceptíveis a infecções subsequentes (Choudhary et al., 2007). Como resultado da ISR, ocorre uma maior produção de metabólitos envolvidos no processo de defesa, fortificação das paredes celulares e outras alterações fisiológicas responsáveis pela proteção a eventuais exposições a patógenos (Dey et al., 2014).

A produção de compostos orgânicos voláteis (*Volatile organic compound* - VOC) constitui outra importante via de biocontrole. Essas substâncias são compostos à base de carbono, de baixo peso molecular, e elevada pressão de vapor, que podem ter acentuada atividade antimicrobiana, mesmo em baixas concentrações (Kanchiswamy et al., 2015; Selim et al., 2017). São produzidos tanto por micro-organismos rizosféricos, como por endofíticos, se difundindo entre partículas do solo ou no interior de tecidos vegetais. O espectro de ação dos VOC é vasto e confere proteção a diferentes tipos de patógenos (Schulz-Bohm et al., 2017). Os VOC têm uma atuação especial sobre a fungistase, que trata-se da redução do crescimento ou germinação de propágulos fúngicos presentes no solo (Garbeva et al., 2011).

A proteção proporcionada pelos VOC envolve tanto uma atividade antimicrobiana direta, como indiretamente são capazes de modular a expressão de genes de defesa e incitar resistência sistêmica induzida (ISR) nos vegetais (Farag et al., 2013). São bastante diversificados os voláteis produzidos por bactérias, sendo que as principais classes envolvem: derivados de ácidos graxos (hidrocarbonetos, cetonas e álcoois), ácidos, compostos sulfatados, compostos nitrogenados e terpenos (Audrain et al., 2015). Os mecanismos bioquímicos e moleculares de ação dessas substâncias sobre os patógenos são diversificados e dependentes da natureza química da substância envolvida. Algumas classes

de compostos podem provocar coagulação citoplasmática, disfunção da membrana celular, afetar a atividade de proteínas ou enzimas específicas, entre outros (Gabriel et al., 2018)

Outra forma de biocontrole é ação de PGPB degradando agentes de virulência e patogenicidade (Saraf et al., 2014). Um clássico exemplo é a capacidade de bactérias biocontroladoras de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* em metabolizar o ácido oxálico, intensivamente produzido por esses fungos durante o processo de infecção dos hospedeiros, e que é apontado como importante fator de patogênese (Schoonbeek et al., 2007). Já em bactérias, a produção de moléculas de *quorum sensing* é uma importante via relacionada à expressão de genes de virulência e disseminação por fitopatógenos. Um importante modo de controle desses organismos por PGPB é a interferência no sinal de *quorum sensing* pela degradação das moléculas de autoindutores (Molina et al., 2003; LaSarre e Federle, 2013)

1.4 A cultura da canola: aspectos gerais e perspectivas

O gênero *Brassica*, família *Brassicaceae*, envolve mais de 100 espécies vegetais já caracterizadas, incluindo algumas de grande interesse agrônomo. As brássicas são fonte de uma extensa variedade de sementes, tubérculos, flores, frutos e folhagens destinados ao consumo humano e animal (Rakow, 2004; OGTR, 2008). Como destaque, esse grupo taxonômico inclui também diversas espécies, em especial a colza (*Brassica napus* L.), que são tradicionalmente cultivadas para extração de óleo vegetal, tanto para fins alimentícios como industriais (Sun, 2015).

A origem da colza é inicialmente proposta em 1935 dentro de um sistema posteriormente reconhecido como Triângulo U. Esse modelo estabelece que os três cruzamentos interespecíficos possíveis entre os diploides *Brassica rapa* (genoma A, n=10); *Brassica nigra* (genoma B, n=8) e *Brassica oleracea* (genoma C, n=9) supostamente deram origem aos três híbridos anfidiplóides: *Brassica juncea* (genoma AB, n=18), *Brassica carinata* (genoma BC, n=17) e *Brassica napus* (genoma AC, n=19) (U, 1935; Cheng et al., 2014). Dentre essas espécies, além da colza, *B. juncea* e *B. rapa* também constituem importantes oleaginosas atualmente cultivadas (Brown et al., 2008).

Nas sementes de colza, o conteúdo de óleo pode corresponder de 40 – 50% da massa para a maioria das variedades comerciais (Jiang et al., 2014). No entanto, uma característica bastante difundida entre as espécies do gênero *Brassica* é o elevado teor de ácido erúico

presente no óleo extraído. Essa substância de comprovada toxicidade, quando em altas concentrações, limita a utilização do óleo de colza para o consumo humano (Rahman et al., 2013; Knutsen et al., 2016). Além do ácido erúico, as sementes de algumas espécies de *Brassica* apresentam também uma alta concentração de glucosinolatos. Essas substâncias constituem uma classe de metabólitos secundários envolvidos na resposta protetiva do vegetal à infecção por organismos patogênicos, mas que compromete sensivelmente a palatabilidade dos derivados da fração sólida dos grãos (Cartea e Velasco, 2008).

Como resultado do melhoramento genético da colza, surgiram no Canadá, durante a década de 1970, as primeiras variedades de *Brassica* com baixo teor de ácido erúico e glucosinolatos. Essas novas variedades viriam a constituir o que é definido como canola. O termo foi originalmente registrado pelo *Western Canadian Oil Seed Crushers* e corresponde à abreviação da expressão *Canadian Oil Low Acid* (Boyles et al., 2012).

Por canola, atualmente compreendem-se variedades do gênero *Brassica* pertencentes às espécies *Brassica napus*, *Brassica rapa* e, mais recentemente, *Brassica juncea*. Essa denominação, no entanto, é, por definição, restrita apenas às variedades cujo óleo apresenta um perfil de ácidos graxos com menos de 2% de ácido erúico, além de uma quantidade inferior a 30 micromoles de glucosinolatos por grama de massa seca das sementes (Knodel e Kandel, 2011).

O óleo de canola é considerado um dos óleos vegetais mais saudáveis entre os que são largamente produzidos para o consumo humano. A qualidade diferencial desse óleo é atribuída ao elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados e às altas concentrações de ácido oleico, linoleico e alfa-linoleico, entre outras substâncias cardioprotetoras (Loganes et al., 2016). O consumo do óleo de canola é altamente recomendado pela Organização Mundial de Saúde, principalmente por estar associado ao controle dos níveis plasmáticos de colesterol e à consequente redução no risco de doença arterial coronariana (Lin et al., 2013).

Propriedades adicionais, como a alta concentração de ácidos graxos de cadeias longas (acima de 18 carbonos), atribuem ao óleo de canola um padrão singular de viscosidade, estabilidade e lubricidade. Essas características o tornam altamente apropriado para diversas aplicações industriais (Brown et al., 2008). Na Europa, o óleo de canola corresponde à principal matéria prima na geração de biodiesel, representando 57 – 70% da produção total desse biocombustível (Zentkovà e Cvengrosova, 2013). Além do aproveitamento comercial

do óleo, como co-produto do processo de extração, obtém-se também o farelo de canola a partir da fração sólida das sementes. O farelo de canola apresenta um elevado teor proteico, sendo amplamente utilizado na produção de ração animal (Campbell et al., 2016).

A canola constitui a segunda maior oleaginosa cultivada no mundo, atrás apenas da cultura da soja. Para o período de 2018/2019 a produção global foi de 70,91 milhões de toneladas, sendo o Canadá, União Europeia e China os maiores produtores (USDA, 2019). A produção brasileira de canola, em relação ao contexto internacional, é ainda bastante modesta. Com 35,5 mil hectares de área plantada, foi obtida uma produção nacional de 49,5 mil toneladas em 2018. Os maiores produtores são os estados do Rio Grande do Sul e Paraná (CONAB, 2019).

No país, o cultivo da canola tem se restringido à espécie *Brassica napus* L. var. oleifera, tendo sido introduzida como cultura de inverno (Tomm, 2007). Além dos rendimentos obtidos a partir da produção dos grãos, o cultivo da canola demonstra grande potencial para solução de problemas fitossanitários. Uma vez que as brássicas não apresentam susceptibilidade a diversos patógenos comuns a gramíneas (milho e trigo) e a leguminosas (feijão e soja), a plantação de canola em sistema de rotatividade com essas culturas reduz significativamente a incidência de doenças nas plantações subsequentes (Norton et al., 1999; Harker et al., 2014). Desse modo, a plantação de canola tem sido proposta no país como uma alternativa à cobertura de solos ociosos durante o inverno, na entressafra do cultivo de milho e soja (Tomm, 2007).

O potencial do Brasil para o cultivo da canola é bem maior que a atual área plantada. Embora essa cultura se encontre em modesta expansão, ainda permanece uma série de desafios que tem restringido uma exploração máxima da capacidade produtiva (Estevez et al. 2014). Uma tendência atual é a extensão das áreas de cultivo para regiões de baixa latitude. Esse processo, conhecido como tropicalização, tem demandado um intensivo programa de pesquisas agronômicas visando a seleção de genótipos mais bem adaptados e o aperfeiçoamento e introdução de novas práticas de cultivo (Tomm et al., 2008; Tomm et al., 2010).

Mesmo em regiões tradicionalmente produtoras, como o Rio Grande do Sul, a produtividade média atual é de 1398 kg ha⁻¹, valor ainda muito inferior ao rendimento preconizado para o país (2500 kg ha⁻¹). Em alguns países, como o Canadá, pode-se atingir

uma produtividade média de até 4500 kg ha⁻¹ (Tomm et al., 2010; CONAB, 2019). Entre os principais gargalos para a consolidação da cultura da canola no Brasil, no que tange as necessidades de pesquisa agrônômica, tem se destacado: a) Ausência do estabelecimento de condições de fertilização específicas para cada região; b) Controle de pragas do solo e da parte aérea; c) Falta de estudos que embasem o aumento de rendimentos, redução de perdas e ampliação da distribuição de cultivo pelo território brasileiro (Mori et al., 2014).

O cultivo da canola tem sido recomendado para solos de alta fertilidade e requer adubação intensiva para assegurar uma elevada produtividade, sendo a fertilização a principal demanda no plantio (Tomm et al., 2009; Norton, 2016). No mundo, a produção e uso de fertilizantes no plantio da canola são apontados como os responsáveis pelos maiores impactos ambientais associados a essa cultura (MacWilliam et al., 2016). O uso de adubos industriais também é indicado como um dos principais fatores que impactam negativamente o balanço energético da cultura, dentro de estimativas que avaliam o potencial uso da canola para produção de biodiesel no Brasil (Silva et al., 2017).

A cultura da canola é susceptível a diferentes doenças fúngicas e bacterianas, responsáveis por perdas econômicas severas em todo o mundo. No Brasil, o primeiro e mais amplo levantamento fitossanitário relacionado a essa cultura no país foi realizado por Cardoso et al. na década de 1990. Entre os agentes fitopatogênicos encontrados foram identificados os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria brassicae*, *A. raphani* e *A. alternata*, *Erysiphe polygoni*, *Rhizoctonia solani*, *Albugo cândida* e *Phoma* sp. Sendo também identificado *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* como o principal patógeno bacteriano, e já conhecido agente etiológico da podridão negra das crucíferas (Cardoso et al., 1996).

No mundo, a canela-preta (*Black leg*) e a podridão das hastes – SSR (*Sclerotinia stem rot*), também conhecida por mofo-branco, causadas, respectivamente pelos fungos *Leptosphaeria maculans* e *Sclerotinia sclerotiorum*, constituem as mais proeminentes e devastadoras doenças da canola. No Brasil, o fungo *Leptosphaeria maculans* foi responsável por prejuízos acentuados no início dos anos 2000, com destruição parcial ou total de lavouras no Rio Grande do Sul (Tomm et al., 2009). A estirpe de ocorrência no Brasil e demais países sul americanos foi identificada como pertencente ao mesmo grupo de patogenicidade de ocorrência na Austrália (Fernando et al., 2003).

A implementação de variedades com resistência poligênica a *Leptosphaeria maculans*, a partir de híbridos australianos, proporcionou maior segurança no cultivo da canola no Brasil em relação a ocorrência da canela preta (Tomm et al., 2009). No entanto, entre as principais variedades atualmente cultivadas no Brasil, a susceptibilidade a *Sclerotinia sclerotiorum* é ainda bastante variável, não havendo nenhuma cultivar com completa resistência ao patógeno (Silveira et al., 2016). De fato, o mofo-branco causado por *S. sclerotiorum* e a podridão negra das crucíferas são, recentemente, as doenças mais relatadas entre os produtores no país. Sendo ainda a primeira, a que mais demandou por métodos de controle e uso de fungicidas (Mori et al., 2017)

A introdução de inoculantes agrícolas tem promovido ganhos significativos em associação a algumas culturas de interesse econômico, sendo bastante cogitados como uma possibilidade para o aumento da produtividade de *Brassica* (Hunter et al., 2014). Para a cultura da canola, têm sido obtidos resultados experimentais satisfatórios envolvendo a inoculação de PGPB, tanto para promoção direta de crescimento vegetal, como biocontrole (Bertrand et al., 2001; El-Howeity e Asfour, 2012; Ahmadi-Rad et al., 2016; Sun et al., 2017). Isso tem ascendido o interesse na busca por estirpes microbianas com potencial para uso nas variedades localmente empregadas, dentro das condições de cultivo brasileiras.

1.5 *Sclerotinia sclerotiorum* e a podridão das hastes em canola

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fungo filamentosso necrotrófico capaz de infectar mais 400 espécies de plantas, de 278 gêneros distintos e 75 famílias, constituindo um dos mais importantes e cosmopolitas fitopatógenos do mundo. Além da canola, alguns de seus principais hospedeiros agregam espécies de grande importância agrônômica, incluindo demais oleaginosas, como a soja e o girassol (Boland, 1994; McCaghey et al., 2018; Na et al., 2018).

S. sclerotiorum apresenta uma importante vantagem adaptativa, que é a formação de estruturas de resistência conhecidas como escleródios. Essas estruturas tornam a permanência do fungo bastante persistente nos campos, dificultando enormemente os métodos de controle da doença. Os escleródios são aglomerados de hifas, recobertas por uma rígida e mielinizada camada de proteção. A região interna da estrutura, também conhecida como medula, por sua vez, constitui-se de células fúngicas envoltas em uma matriz rica em β -glucana e proteínas (Ordóñez-Valencia, 2015; Sharma et al., 2015). Uma vez no solo, em

profundidades maiores que 5 centímetros, os escleródios podem se manter viáveis por 3-5 anos, podendo mesmo sobreviver por períodos superiores de até 10 anos (Saharan e Mehta, 2008)

Os escleródios podem germinar de duas maneiras distintas, relacionadas às formas reprodutivas do fungo, seja sexuadamente (germinação carpogênica de escleródios) ou assexuadamente (germinação misceliogênica de escleródios) (Bolton et al., 2006). No primeiro caso, há a formação de corpos de frutificação conhecidos como apotécios. Nessas estruturas ocorre a formação de ascósporos, por reprodução sexuada, e esses se disseminam entre os hospedeiros através do ar. No segundo caso, há emissão de hifas a partir do escleródio, essas se desenvolvem até atingir diretamente a base das plantas susceptíveis, dando início ao processo de infecção (Rakesh et al., 2016).

Os ascósporos conseguem se manter nos locais em que se depositam, mas por períodos relativamente curtos, desde que havendo condições ambientais favoráveis. Eles apresentam, no entanto, uma capacidade limitada de crescer sobre estruturas vegetais íntegras (Jamaux et al., 1995). Normalmente, infectam os hospedeiros durante a etapa de florescimento, utilizando as flores como fonte nutricional primária. Uma vez infectadas, as pétalas se desprendem, depositando-se sobre folhas e ramificações caulinares, permitindo, assim, a dispersão do fungo no hospedeiro (Jamaux et al., 1995; Saharan e Mehta, 2008).

As regiões infectadas desenvolvem lesões iniciais (*water-soaked lesions*), que são posteriormente tomadas pelo aspecto branco característico do desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum*. A parte aérea da planta pode ser amplamente tomada pela doença. Os caules, quando infectados, sofrem as lesões características da podridão das hastes. Nesse estágio, devido à fragilização da estrutura, podem ocorrer quebras. Nos estágios finais, há aglomeração de hifas e formação de escleródios, que, posteriormente, são dispersos no solo com a morte da planta ou colheita (Purdy, 1979; Kamal et al., 2016). A perda causada pela SSR (*Sclerotinia stem rot* - SSR) varia, principalmente, em função do estágio de desenvolvimento em que as plantas são afetadas. Se a infecção ocorre antes ou nos estágios iniciais de florescimento, a perda é elevada, podendo em casos extremos, atingir 100% da produção. Quando a doença se manifesta após o florescimento, as perdas são minimizadas, mas podem acometer 50% da geração de grãos (Shukla, 2005)

Os principais fatores de patogênese da doença se relacionam à liberação de enzimas hidrolíticas e à produção de ácido oxálico. Como fungo necrotrófico, *S. sclerotiorum* nutre-se, principalmente, da degradação tecidual de seus hospedeiros. Durante o processo de infecção, são liberadas algumas enzimas extracelulares, tais como celulases, pectinases e xilanase, que atacam a parede celular vegetal (Huang et al., 2008). A produção de ácido oxálico é, também, um fator fundamental nesse processo, uma vez que a redução do pH resultante de sua liberação favorece a atividade dessas hidrolases. Além disso, esse composto está relacionado ao sequestro de íons cálcio (Ca^{+2}), favorecendo a desestabilização da parede celular (Dutton e Evans, 1996; Liang e Rollins, 2018). Ainda, atua também como um fator de proteção ao fungo contra a resposta oxidativa desencadeada pelo mecanismo de defesa da planta afetada (Cessna et al., 2000).

O controle de *S. sclerotiorum* associado à cultura da canola envolve diferentes estratégias de manejo. O processo é bastante dificultado pela alta persistência do fungo no solo, pela baixa eficiência e custos elevados na aplicação de antifúngicos, além da inexistência de variedades com resistência total ao patógeno. Isso torna o biocontrole uma das alternativas mais apreciáveis no manejo do mofo branco (Smolińska e Kowalska, 2018). Resultados positivos têm sido obtidos com a utilização de fungos antagonistas, como *Coniothyrium minitans*, já disponível comercialmente (Li et al., 2006). Da mesma forma, tem sido bastante satisfatória a utilização de algumas estirpes bacterianas, especialmente do gênero *Bacillus* (Kamal et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar isolados bacterianos de raízes de canola quanto a diferentes aspectos fenotípicos e genômicos relacionados à promoção do crescimento vegetal e à capacidade de biocontrole.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a identificação molecular e análises filogenéticas de bactérias associadas a raízes de canola;
- Promover a triagem *in vitro* dos isolados quanto a diferentes características de promoção do crescimento vegetal;
- Avaliar os isolados bacterianos quanto ao potencial de inibição do crescimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary;
- Caracterizar as bactérias associativas de canola quanto à capacidade de solubilização de fosfatos minerais;
- Investigar aspectos genômicos relacionados às propriedades de biocontrole e promoção do crescimento vegetal.

3 CAPÍTULOS

3.1 PRIMEIRO CAPÍTULO

Characterization of antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities by bacterial isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots.

Igor Daniel Alves Ribeiro¹, Evelise Bach¹; Fernanda da Silva Moreira¹; Aline Reis Müller¹; Annika Kiel²; Luciane Maria Pereira Passaglia^{1*}

1 Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, 91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil. * e-mail: luciane.passaglia@ufrgs.br

2 Bielefeld University. Universitätsstraße, 25, Bielefeld, 33615, Germany

Artigo a ser submetido à revista *Biology and Fertility of Soils*

3.2 SEGUNDO CAPÍTULO

Mineral phosphate solubilization by *Paenibacillus graminis* strains isolated from canola (*Brassica napus* L.) roots

Igor Daniel Alves Ribeiro¹; Evelise Bach¹; Fernanda Cortez Lopes²; Alexsandro Dallegrave³; Luciane Maria Pereira Passaglia^{1*}

1 Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, 91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil. * e-mail: luciane.passaglia@ufrgs.br

2 Centro de Biotecnologia CBiot, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil

3 Central Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, Laboratório D-118, 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil

Artigo a ser submetido à revista *Biology and Fertility of Soils*

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram avaliadas trinta bactérias gram-positivas, esporulantes, que apresentaram múltiplas características de promoção do crescimento vegetal. Cinco destes isolados revelaram atividade antagonista à *S. sclerotiorum* em placas, sendo que a capacidade inibitória de fungos filamentosos de gêneros distintos também foi observada. Isso demonstra que o potencial como agentes de biocontrole desses isolados pode ser explorado em relação a demais micro-organismos fitopatogênicos, tanto de canola como de outras espécies vegetais de interesse agrônomo.

Os genomas dos isolados com atividade antagonista foram sequenciados a fim de se elucidar possíveis mecanismos relacionados ao processo de inibição de *S. sclerotiorum*. As análises genômicas revelaram *clusters* putativos para produção de bacteriocinas, alguns deles não apresentando, no entanto, qualquer similaridade com *clusters* gênicos específicos, já caracterizados para essas substâncias. Considerando as propriedades antimicrobianas dessa classe de compostos e seu protagonismo na supressão de algumas doenças vegetais por PGPB (Subramanian e Smith, 2015), a capacidade inibitória de patógenos bacterianos pelos isolados obtidos pode ser investigada de modo mais esclarecedor. No que se refere à cultura da canola, a podridão negra da crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é uma doença bacteriana recorrente (Tomm et al., 2009) e um possível alvo de controle a ser testado com esses isolados.

Não foi observada a capacidade de inibição do desenvolvimento de *S. sclerotiorum* pelo sobrenadante das culturas bacterianas. Procedeu-se com a tentativa de obtenção de possíveis lipopeptídeos presentes nesses sobrenadantes, através de extração com butanol seguida de precipitação ácida, mas nenhuma amostra obtida apresentou atividade (dados não apresentados). Esses fatos direcionaram os esforços para a tentativa de se caracterizar os lipopeptídeos, se presentes, em recortes de ágar da zona de inibição do fungo confrontado com as bactérias antagonistas crescidas de modo pareado. No entanto, não se obteve a detecção de massas relativas aos compostos mais comuns das classes de surfactina, iturina ou fengicina e nem de derivados de pumilacidinas, embora *clusters* gênicos biosintéticos para esses últimos tenham sido encontrados nos genomas analisados. A otimização das condições de cultivo bacteriano, do processo de extração e dos métodos analíticos poderá fornecer melhores resultados na confirmação da produção putativa desses compostos.

Outros mecanismos bioquímicos podem também ser os responsáveis pela atividade antifúngica observada *in vitro*. Isso pode envolver uma grande diversidade de enzimas hidrolíticas com ação sobre a parede celular fúngica e, também, a produção de compostos orgânicos voláteis (VOC) (Beneduzi et al., 2012). Quatro isolados foram capazes de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* através da produção dessas substâncias. Análises do *headspace* das culturas microbianas por GC-MS (Timm et al., 2018) poderão ser empregadas a fim de se identificar potenciais compostos voláteis antimicrobianos relacionados a esse processo.

Dentro das condições experimentais utilizadas, não foi possível observar nenhum efeito da supressão da *S. sclerotiorum* em canola. Outras formas de infecção, como a germinação de ascósporos na parte aérea do vegetal durante a fase de florescimento, são de ocorrência natural muito mais frequentes no cultivo da canola (Kamal et al., 2016). Portanto, resultados satisfatórios ainda podem ser obtidos considerando outras vias de infecção pelo fungo, outras formas de inoculação bacteriana (aspersão da parte aérea) e outros estágios de desenvolvimento do vegetal. As respostas dos vegetais à inoculação com PGPB são bastante variáveis em diferentes cultivares. Outras variedades de canola também podem ser consideradas. A escolha da variedade da Hyola 61 se baseou no fato de atualmente esse híbrido ser o mais utilizado no Brasil, dada sua resistência poligênica à canela preta (De Mori et al., 2014).

Os isolados apresentaram diversas características *in vitro* de promoção de crescimento vegetal e competência rizosférica. Essa última habilidade é considerada importante no sucesso de muitos inoculantes e explica a falha de estirpes de elevada potencialidade *in vitro* na tentativa de promoverem o crescimento vegetal em campo (Prashar et al., 2014). Vários outros aspectos não considerados estão envolvidos nesse processo, tais como a produção de *quorum sensing*, a resistência a condições de estresse oxidativo, modulação da resposta de defesa vegetal, formação de biofilme, expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia, entre outros (Barret et al., 2011). Esses são, portanto, aspectos ainda a serem elucidados no que diz respeito à interação planta-bactéria pelos isolados obtidos.

O nitrogênio e fósforo constituem os macronutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal e a obtenção de ambos elementos pelas plantas pode ser facilitada pela

interação mutualística com PGPB (Goswami et al., 2016). Apenas três isolados apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio, avaliada pela técnica de ARA, mas a solubilização de fosfato foi uma característica bastante disseminada. Esse fato conduziu a uma melhor caracterização dessa habilidade no segundo capítulo da dissertação. Coincidentemente, os três isolados fixadores de nitrogênio obtidos foram os isolados de destaque no estudo sobre solubilização de fosfato, reforçando o potencial desses micro-organismos como agentes promotores de crescimento vegetal.

Os genomas dos três isolados de *P. graminis* que se destacaram em termos de solubilização de fosfato também foram sequenciados. No entanto, as sequências obtidas para o isolado 27PB apresentaram baixa qualidade. Um novo sequenciamento desse genoma poderá fornecer resultados mais conclusivos em relação às análises genômicas empregadas. A partir dos genomas anotados e do perfil de metabólitos encontrados por espectrometria de massas, pretende-se identificar as possíveis vias metabólicas relacionadas à produção dos ácidos orgânicos encontrados.

Até o momento, não foi demonstrada a capacidade de promoção do crescimento vegetal por aumento no fornecimento de fósforo aos vegetais, como consequência da inoculação das estirpes solubilizadoras identificadas. No entanto, pretende-se otimizar as condições experimentais para essa averiguação e estender a verificação dessa capacidade também para demais culturas de relevância pertencentes a outros grupos taxonômicos de plantas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla MH e Ohyam T (2014) Impact of Harsh Environmental Conditions on Nodule Formation and Dinitrogen Fixation of Legumes. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech, p 131–193
- Ahemad M and Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J King Saud Univ - Sci* 26:1–20. doi: 10.1016/J.JKSUS.2013.05.001
- Ahmadi-Rad S, Gholamhoseini M, Ghalavand A, Asgharzadeh A e Dolatabadian A (2016) Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. *Rhizosphere* 2:34–37. doi: 10.1016/j.rhisph.2016.08.006
- Ahmed E e Holmström SJM (2014) Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microb Biotechnol* 7:196–208. doi: 10.1111/1751-7915.12117
- Ahmed N, Shahab S (2009) Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. *Int J Microbiol* 9: 1-19
- Ali SS e Vidhale NN (2013) Review Article Bacterial Siderophore and their Application: A review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2:303–312.
- Alori ET e Babalola OO. (2018). Microbial inoculants for improve crop quality and human health. *Front microbiol* 9: 2213.
- Alori ET, Glick BR and Babalola OO (2017) Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8:1–8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971
- Audrain B, Farag MA, Ryu C-M and Ghigo J-M (2015) Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev* 39:222–233. doi: 10.1093/femsre/fuu013
- Baez-Rogelio A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V e Muñoz-Rojas J. (2017). Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microb Biotechnol* 10: 19-21.
- Barea J and Richardson AE (2015) Phosphate Mobilisation by Soil Microorganisms. In: Lugtenberg B (ed) *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing, Cham, pp 225–234
- Barret M, Morrissey JP and O’Gara F (2011) Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biol Fertil Soils* 47:729–743. doi: 10.1007/s00374-011-0605-x
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR e Hernandez JP. (2014). *Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013)*. *Plant Soil* 378: 1-33.
- Bashan Y, Kamnev AA e De-Bashan LE (2013) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils* 49:465–479. doi: 10.1007/s00374-012-0737-7

- Baveye PC (2015) Looming Scarcity of Phosphate Rock and Intensification of Soil Phosphorus Research. *Rev Bras Ciência do Solo* 39:637–642. doi: 10.1590/01000683rbc20140819
- Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK e Thatoi HN (2014) Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatal Agric Biotechnol* 3:97–110. doi: 10.1016/j.bcab.2013.09.008
- Beneduzi A, Ambrosini A and Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35:1044–51.
- Bertrand H, Nalin R, Bally R e Cleyet-Marel J-C (2001) Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol Fertil Soils* 33:152–156. doi: 10.1007/s003740000305
- Boland GJ and Hall R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 93-108.
- Bolton MD, Thomma BP e Nelson BD. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* 7: 1-16.
- Boyles M, Peeper T e Stamm M (2012) *Great Plains Canola Production Handbook*. Kansas State University
- Brown J, Davis JB, Lauver M e Wysocki D (2008) *Canola Growers ' Manual*. 71.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL e Schulze-Lefert P (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol* 64:807–838. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106
- Cameron KC, Di HJ e Moir JL (2013) Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Ann Appl Biol* 162:145–173. doi: 10.1111/aab.12014
- Campbell L, Rempel C e Wanasundara J (2016) Canola/Rapeseed Protein: Future Opportunities and Directions—Workshop Proceedings of IRC 2015. *Plants* 5:17. doi: 10.3390/plants5020017
- Cardoso RML, Oliveira MAR, Campos RMVB, Barbosa LCJ and Balbino LC. *Doenças de Canola no Paraná* (1996) IAPAR, Cascavel, 32 p.
- Cartea ME e Velasco P (2008) Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* 7:213–229. doi: 10.1007/s11101-007-9072-2
- Carvalho TLG, Saraiva RM, Ferreira PCG e Hemerly AS (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/eru319
- Cessna SG, Sears VE, Dickman MB e Low PS. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*, 12: 2191-2199.
- Chanway CP, Anand R e Yang H (2014) Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech, p 3–22

- Cheng F, Wu J e Wang X (2014) Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. *Hortic Res* 1:14024. doi: 10.1038/hortres.2014.24
- Choudhary DK, Prakash A e Johri BN. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J Microbiol* 47: 289-297.
- Cochrane SA and Vederas JC (2016) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Med Res Rev* 36:4–31. doi: 10.1002/med.21321
- CONAB (2019) Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos/ safra 2018/19. v 6, n. 4. Brasília, 126 p.
- Cooper J, Lombardi R, Boardman D e Carliell-Marquet C (2011) The future distribution and production of global phosphate rock reserves. *Resour Conserv Recycl* 57:78–86. doi: 10.1016/j.resconrec.2011.09.009
- De Mori C, Tomm GO, Ernani P and Ferreira P (2014) Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil. Embrapa Trigo, Passo Fundo
- Dey R, Pal KK and Tilak KVBR (2014) Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Crop Protection and Challenges. In: Goyal A and Manoharachary C (eds) *Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens*. Springer, New York, pp 31–58
- Dey R, Pal KK e Tilak KVBR (2014) Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens. doi: 10.1007/978-1-4939-1188-2
- Dodds W e Smith V (2016) Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. *Inl Waters* 6:155–164. doi: 10.5268/IW-6.2.909
- Dutton MV e Evans CS. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can J Microbiol* 42: 881-895.
- Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd Allah EF e Hashem A (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front microbiol* 8
- El-Howeity MA e Asfour MM (2012) Response of some varieties of canola plant (*Brassica napus* L.) cultivated in a newly reclaimed desert to plant growth promoting rhizobacteria and mineral nitrogen fertilizer. *Ann Agric Sci* 57:129–136. doi: 10.1016/j.aoas.2012.08.006
- Eljounaidi K, Lee SK and Bae H (2016) Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biol Control* 103:62–68. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.07.013
- Enebe MC and Babalola OO (2019) The impact of microbes in the orchestration of plants' resistance to biotic stress: a disease management approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:9–25. doi: 10.1007/s00253-018-9433-3
- Erisman JW, Galloway JN, Seitzinger S, Bleeker A, Dise NB, Petrescu AMR, Leach AM e de Vries W (2013) Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 368:20130116–20130116. doi: 10.1098/rstb.2013.0116
- Estevez RL, Duarte JB, Chambo APS e Cruz MIF (2014) A Cultura da Canola (*Brassica napus* var. oleifera). *Sci Agrar Parana* 13:1–9. doi: 10.18188/1983-

- Farag MA, Zhang H and Ryu C-M (2013) Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *J Chem Ecol* 39:1007–1018. doi: 10.1007/s10886-013-0317-9
- Farhat M Ben, Boukhris I and Chouayekh H (2015) Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–8. doi: 10.1093/femsle/fnv008
- Fernando, WGD, Parks PS, Tomm G, Viau LV e Jurke C (2003) First Report of Blackleg Disease Caused by *Leptosphaeria maculans* on Canola in Brazil. *Plant disease*, 87: 314-314.
- Finking R and Marahiel MA (2004) Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu Rev Microbiol* 58:453–488. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123615
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN et al. (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 368:20130164–20130164. doi: 10.1098/rstb.2013.0164
- Fravel DR (1988) Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases*. *Annu Rev Phytopathol* 26:75–91. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.000451
- Gabriel KT, Joseph Sexton D and Cornelison CT (2018) Biomimicry of volatile-based microbial control for managing emerging fungal pathogens. *J Appl Microbiol* 124:1024–1031. doi: 10.1111/jam.13667
- Galloway JN, Leach AM, Bleeker A e Erisman JW (2013) A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 368:20130120–20130120. doi: 10.1098/rstb.2013.0120
- Gandhi A e Muralidharan G (2016) Assessment of zinc solubilizing potentiality of *Acinetobacter* sp. isolated from rice rhizosphere. *Eur J Soil Biol* 76:1–8. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.06.006
- Garbeva P, Hol WHG, Termorshuizen AJ, Kowalchuk GA and de Boer W (2011) Fungistasis and general soil biostasis – A new synthesis. *Soil Biol Biochem* 43:469–477. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.11.020
- Garcia G, Cardoso AA e Dos Santos OAM (2013) Da escassez ao estresse do planeta: Um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. *Quim Nova* 36:1468–1476. doi: 10.1590/S0100-40422013000900032
- Gellings C e Parmenter K (2004) Energy efficiency in fertilizer production and use. In: Clark W. Gellings e Kornelis Blok (orgs) *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Eolss Publishers, Oxford, p 1–15
- Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* 169:30–39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009
- Glick BR (2015) Beneficial Plant-Bacterial Interactions. *Benef Plant-Bacterial Interact*. doi: 10.1007/978-3-319-13921-0
- Goldstein AH (1995) Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol*

- Agric Hortic 12:185–193. doi: 10.1080/01448765.1995.9754736
- Goldstein AH and Liu ST (1987) Molecular Cloning and Regulation of a Mineral Phosphate Solubilizing Gene from *Erwinia Herbicola*. *Nat Biotechnol* 5:72–74. doi: 10.1038/nbt0187-72
- Gontia-Mishra I, Sasidharan S e Tiwari S (2014) Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnol Lett* 36:889–898. doi: 10.1007/s10529-014-1458-9
- Goswami D, Thakker JN and Dhandhukia PC (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric* 2:1127500. doi: 10.1080/23311932.2015.1127500
- Gupta A and Kumar Sahu P (2017) Phosphorus Nutrition of Plants: A Microbial Perspective. *MOJ Ecol Environ Sci* 2:6–8. doi: 10.15406/mojes.2017.02.00043
- Harker KN, O'Donovan JT, Turkington TK, Blackshaw RE, Lupwayi NZ, Smith EG, Peng G (2014). Canola rotation frequency impacts canola yield and associated pest species. *Can. J Plant Sci* 95: 9-20.
- Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB and Lotfipour F (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 113:723–736. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x
- Hassani MA, Durán P and Hacquard S (2018) Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6:58. doi: 10.1186/s40168-018-0445-0
- Hassen AI, Bopape FL e Sanger LK (2016) Microbial Inoculants as Agents of Growth Promotion and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer India, New Delhi, p 23–36
- Hertweck C (2009) The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angew Chemie Int Ed* 48:4688–4716. doi: 10.1002/anie.200806121
- Hoffmann LV (2007) *Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio*. In: Silveira APD da e Freitas S dos S (orgs) *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Omnipax, Campinas, p 153–312
- Hopkins BG (2015) Phosphorus. In: Barker AV, Pilbeam DJ (eds) *Handbook of plant nutrition*. CRC press, pp 65-126.
- Huang L, Buchenauer H, Han Q, Zhang X and Kang Z. (2008). Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 9-16.
- Hungria M e Mendes IC (2015) Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? *Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, p 1009–1024
- Hunter PJ, Teakle GR e Bending GD (2014) Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to Brassica. *Front Plant Sci* 5:1–18. doi: 10.3389/fpls.2014.00027
- Ingle KP and Padole DA (2017) Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6:844–852. doi: 10.20546/ijcmas.2017.601.099

- Jamaux I, Gelie B e Lamarque C. (1995). Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathol* 44: 22-30.
- Jez JM, Lee SG e Sherp AM (2016) The next green movement: Plant biology for the environment and sustainability. *Science* (80-) 353:1241–1244. doi: 10.1126/science.aag1698
- Jiang C, Shi J, Li R, Long Y, Wang H, Li D, Zhao J e Meng J (2014) Quantitative trait loci that control the oil content variation of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 127:957–968. doi: 10.1007/s00122-014-2271-5
- Kamal MM, Lindbeck KD, Savocchia S e Ash GJ. (2015). Biological control of sclerotinia stem rot of canola using antagonistic bacteria. *Plant Pathol* 64: 1375-1384.
- Kamal MM, Savocchia S, Lindbeck KD and Ash GJ (2016) Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed Brassicas. *Australas Plant Pathol* 45:1–14. doi: 10.1007/s13313-015-0391-2
- Kanchiswamy CN, Malnoy M and Maffei ME (2015) Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front Plant Sci* 6:151. doi: 10.3389/fpls.2015.00151
- Kaur H, Kaur J e Gera R (2016) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Boon to Agriculture. *Int J Cell Sci Biotechnol* 5:17–22.
- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Saqlan SM e Rasheed M (2009) Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J Agric Biol Sci* 1:48–58. doi: 10.5923/j.re.20120201.10
- Khan MS, Zaidi A e Ahmad E (2014) Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. In: Khan MS, Zaidi A e Musarrat J (orgs) *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer International Publishing, Cham, p 31–62
- Knodel JJ e Kandel H (2011) *Canola production field guide*. North Dakota State University
- Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C et al. (2016) Erucic acid in feed and food. *EFSA J*. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4593
- Kochian L V. (2012) Rooting for more phosphorus. *Nature* 488:466–467. doi: 10.1038/488466a
- Krishnaraj PU e Dahale S (2014) Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in Sustainable Agriculture. *Proc Indian Natl Sci Acad* 80:389. doi: 10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116
- Kuzyakov Y e Blagodatskaya E (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol Biochem* 83:184–199. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.025
- Laranjo M, Alexandre A e Oliveira S (2014) Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol Res* 169:2–17. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.012
- LaSarre B and Federle MJ (2013) Exploiting Quorum Sensing to Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:73–111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12

- Lesueur D, Deaker R, Herrmann L, Bräu L e Jansa J (2016) The Production and Potential of Biofertilizers to Improve Crop Yields. *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*. Springer India, New Delhi, p 71–92
- Liang X e Rollins JA (2018) Mechanisms of broad host range necrotrophic pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 108: 1128-1140.
- Li GQ, Huang HC, Miao HJ, Erickson RS, Jiang DH e Xiao YN. (2006). Biological control of sclerotinia diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Eur J Plant Pathol* 114: 345-355.
- Lin L, Allemekinders H, Dansby A, Campbell L, Durance-Tod S, Berger A e Jones PJ (2013) Evidence of health benefits of canola oil. *Nutr Rev* 71:370–385. doi: 10.1111/nure.12033
- Loganes C, Ballali S e Minto C (2016) Main Properties of Canola Oil Components: A Descriptive Review of Current Knowledge. *Open Agric J* 10:69–74. doi: 10.2174/1874331501610010069
- Lugtenberg B (2015) Principles of Plant-Microbe Interactions. doi: 10.1007/978-3-319-08575-3
- Lugtenberg B, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013) Microbial control of plant diseases. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp 575 - 586
- MacWilliam S, Sanscartier D, Lemke R, Wismer M e Baron V (2016) Environmental benefits of canola production in 2010 compared to 1990: A life cycle perspective. *Agric Syst* 145:106–115. doi: 10.1016/j.agsy.2016.03.006
- Martínez B, Rodríguez A and Suárez E (2016) Antimicrobial Peptides Produced by Bacteria: The Bacteriocins. In: Villa TG and Vinas M (eds) *New Weapons to Control Bacterial Growth*. Springer International Publishing, Cham, pp 15–38
- McCaghey M, Willbur J, Smith DL and Kabbage M (2018). The complexity of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: virulence factors, resistance mechanisms, and their exploitation to control *Sclerotinia* stem rot. *Tropical Plant Pathology*: 1-11.
- Meena KR and Kanwar SS (2015) Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/473050
- Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, Divya KL, Venkatasalam EP, Srinivasan S, Ramkumar G, Saranya C and Shanmuganathan R (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatal Agric Biotechnol* 17:119–128. doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.009
- Miyana A (2017) Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: various strategies for production of structurally diverse polyketides. *Biosci Biotechnol Biochem* 81:2227–2236. doi: 10.1080/09168451.2017.1391687
- Mnif I and Ghribi D (2015) Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 104:129–147. doi: 10.1002/bip.22630

- Molina L, Constantinescu F, Michel L, Reimann C, Duffy B and Daofago G (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* 45:71–81. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00125-9
- Mori C, Costamilan LM, Marsaro-Júnior AL and Ferreira PEP (2017) Levantamento de ações de controle de doenças de canola utilizadas por produtores no sul do Brasil. Embrapa, Passo Fundo
- Mori C, Tomm GO e Ferreira PEP (2014) Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil. 36.
- Mukhametzhanova AD, Akhmetova AI and Sharipova MR (2012) Microorganisms as phytase producers. *Microbiology*. doi: 10.1134/s0026261712030095
- Na R, Luo Y, Bo H, Jia R, Meng Q, Zhou H and Zhao J (2018) Responses of sunflower induced by *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102: 113-121.
- Norton R, Kirkegaard J, Angus J, Potter T (1999) Canola in rotations. In: Salisbury P, Potter, McDonald TG, Green A (eds) *Canola in Australia: the first thirty years*. Organising Committee of the 10th International Rapeseed Congress, pp 23-28.
- Norton RM (2016) Nitrogen management to optimise canola production in Australia. *Crop Pasture Sci* 67:419. doi: 10.1071/CP15297
- Office of the Gene Technology Regulator - OGTR (2008) *The Biology of Brassica napus L. (Canola/Rapeseed)*. 2:1–62.
- Olanrewaju OS, Glick BR and Babalola OO (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33:197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9
- Ordóñez-Valencia C, Ferrera-Cerrato R, Quintanar-Zúñiga RE, Flores-Ortiz C M, Guzmán GJM, Alarcón A, García-Barradas O. (2015). Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. *Annals of microbiology*, 65: 765-770
- Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine KJ e Dowling DN (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front Microbiol* 6:1–9. doi: 10.3389/fmicb.2015.00745
- Owen D, Williams AP, Griffith GW and Withers PJA (2015) Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Appl Soil Ecol* 86:41–54. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.09.012
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P e van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11:789–99. doi: 10.1038/nrmicro3109
- Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S e Crecchio C (2015) Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils* 51:403–415. doi: 10.1007/s00374-015-0996-1
- Podolich O, Ardanov P, Zaets I, Pirttilä AM e Kozyrovska N (2015) Reviving of the

- endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant Soil* 388:367–377. doi: 10.1007/s11104-014-2235-1
- Prashar P, Kapoor N and Sachdeva S (2013) Biocontrol of Plant Pathogens Using Plant Growth Promoting Bacteria. In: Lichtfouse E (ed) *Sustainable Agriculture Reviews*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 319–360
- Prashar P, Kapoor N and Sachdeva S (2014) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Bio/Technology* 13:63–77. doi: 10.1007/s11157-013-9317-z
- Prathap M e Bd RK (2015) A Critical Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J Plant Pathol Microb* 6:4–7. doi: 10.4172/2157-7471.1000266
- Preininger C, Sauer U, Bejarano A e Berninger T. (2018). Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. *Appl microbiol biotechnol* 102: 7265-7282.
- Purdy L. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69: 875-880.
- Raaijmakers JM and Mazzola M (2012) Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 50:403–424. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172908
- Rahman MH, Akter S, Begum T, Khan MSI, Islam MS e Begum MR (2013) Effects of Mild Ingestion of Used Fried Rapeseed Oil (Mustard Oil) on Hepatic Tissues in Long-Evans Rats. *J Food Sci Technol Nepal* 8:78–80.
- Rakesh R, Rathi AS, Kumar P, Kumar e Kumari P. (2016). *Sclerotinia* rot of rapeseed mustard: A comprehensive review. *Journal of Applied and Natural Science*, 8: 2325-2336.
- Rakow GFW (2004) Species Origin and Economic Importance of Brassica. In: Pua E-C e Douglas CJ (orgs) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Brassica*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 3–11
- Ramjegathesh R, Samiyappan R, Raguchander T, Prabakar K and Saravanakumar D (2013) Plant–PGPR Interactions for Pest and Disease Resistance in Sustainable Agriculture. *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 293–320
- Reijnders L (2014) Phosphorus resources, their depletion and conservation, a review. *Resour Conserv Recycl* 93:32–49. doi: 10.1016/j.resconrec.2014.09.006
- Rodríguez H and Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2
- S.K. Gosal, Jupinder Kaur and JK (2017) Probiotics and Plant Health. *Probiotics Plant Heal*. doi: 10.1007/978-981-10-3473-2
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S e Tribedi P (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res* 23:3984–3999. doi: 10.1007/s11356-015-4294
- Saharan BS e Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. *Life Sci Med Res* 2011:1–30.

- Saharan GS e Mehta N. (2008). Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. Springer.
- Santi C, Bogusz D e Franche C (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot* 111:743–767. doi: 10.1093/aob/mct048
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M e Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183:92–99. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008
- Saraf M, Pandya U and Thakkar A (2014) Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol Res* 169:18–29. doi: 10.1016/J.MICRES.2013.08.009
- Saravanan VS, Kumar MR e Sa TM (2011) Microbial Zinc Solubilization and Their Role on Plants. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 47–63
- Sashidhar B and Podile AR (2010) Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J Appl Microbiol* 109:1–12. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x
- Sauer M, Robert S e Kleine-Vehn J. (2013). Auxin: simply complicated. *J Exp Bot* 64: 2565-2577.
- Schoonbeek H, Jacquat-Bovet A-C, Mascher F and Métraux J-P (2007) Oxalate-Degrading Bacteria Can Protect *Arabidopsis thaliana* and Crop Plants Against *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1535–1544. doi: 10.1094/MPMI-20-12-1535
- Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L and Garbeva P (2017) Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Front Microbiol* 8:2484. doi: 10.3389/fmicb.2017.02484
- Selim KA, El Ghwas DE, Selim RM and Abdelwahab Hassan MI (2017) Microbial Volatile in Defense. In: Choudhary DK, Sharma AK, Agarwal P, Varma A and Tuteja N (eds) *Volatiles and Food Security*. Springer Singapore, Singapore, pp 135–170
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W and Zhang F (2011) Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *PLANT Physiol* 156:997–1005. doi: 10.1104/pp.111.175232
- Shukla, A. K. (2005). Estimation of yield losses to Indian mustard (*Brassica juncea*) due to *Sclerotinia* stem rot. *Journal of Phytological Research*, 18: 267-268.
- Silva LFL e, Gonçalves WM, Maluf WR, Resende LV, Sarmiento CM, Licursi V e Moretto P (2017) Energy balance of biodiesel production from canola. *Ciência Rural* 47:1–6. doi: 10.1590/0103-8478cr20151084
- Silveira, CH (2016). Reação de cultivares de canola a clerotinia sclerotiorum. Universidade Federal de Uberlândia
- Sindhu SS, Phour M, Choudhary SR e Chaudhary D (2014) Phosphorus Cycling: Prospects of Using Rhizosphere Microorganisms for Improving Phosphorus Nutrition of Plants. In: Parmar N e Singh A (orgs) *Geomicrobiology and Biogeochemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 199–237
- Singh B and Satyanarayana T (2011) Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant

- growth promotion. *Physiol Mol Biol Plants* 17:93–103. doi: 10.1007/s12298-011-0062-x
- Smolińska U, Kowalska B (2018) Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. *J Plant Pathol* 100:1–12. doi: 10.1007/s42161-018-0023-0
- Spaepen S e Vanderleyden J (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1–13. doi: 10.1101/cshperspect.a001438
- Spaepen S. (2015) Plant hormones produced by microbes. In: Lugtenberg (eds) *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer, pp 247-256.
- Strieker M, Tanovićand A and Marahiel MA (2010) Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. doi: 10.1016/j.sbi.2010.01.009
- Subramanian S and Smith DL (2015) Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – from an agriculture perspective. *Front Plant Sci* 6:909. doi: 10.3389/fpls.2015.00909
- Sun G, Yao T, Feng C, Chen L, Li J e Wang L. (2017). Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. *Biol control* 104: 35-43
- Sun R (2015) Economic/Academic Importance of *Brassica rapa*. In: Wang X e Kole C (orgs) *The Brassica rapa Genome*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p 1–15
- Süssmuth RD and Mainz A (2017) Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects. *Angew Chemie Int Ed* 56:3770–3821. doi: 10.1002/anie.201609079
- Swiontek Brzezinska M, Jankiewicz U, Burkowska A and Walczak M (2014) Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. *Curr Microbiol* 68:71–81. doi: 10.1007/s00284-013-0440-4
- Tariq M, Noman M, Ahmed T, Manzoor N e Zafar M (2017) Antagonistic features displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. *J Plant Sci Phytopathol* 1:38–43.
- Timm CM, Lloyd EP, Egan A, Mariner R and Karig D (2018) Direct Growth of Bacteria in Headspace Vials Allows for Screening of Volatiles by Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Front Microbiol* 9:491. doi: 10.3389/fmicb.2018.00491
- Tomm GO (2007) Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul. Embrapa Trigo, Passo Fundo - RS
- Tomm GO, Ferreira PEP, Aguiar JLP de, Castro AMG de, Lima SMV e Mori C de (2010) Panorama atual e indicações para aumento de eficiência da produção de canola no Brasil, 1o ed. Embrapa Trigo, Passo Fundo.
- Tomm GO, Raposo RWC, Souza TAF de, Oliveira JT de L, Raposo EHS, Neto CP da S, Arthur, Brito C, Nascimento R de S, Raposo AWS et al. (2008) Desempenho de genótipos de canola (*Brassica napus* L.) no Nordeste do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. 11.
- Tomm GO, Wiethölter S, Dalmago GA and Santos HP Dos (2009) Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul. Embrapa trigo 88.
- Turner BL and Blackwell MSA (2013) Isolating the influence of pH on the amounts and

- forms of soil organic phosphorus. *Eur J Soil Sci* 64:249–259. doi: 10.1111/ejss.12026
- U. Nagaharu (1935) Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot* 7:389–452
- USDA- United States Department of Agriculture (2019) Oilseeds: World markets and trades. (<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>)
- Vassilev N, Mendes G, Costa M e Vassileva M (2014) Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiol J* 31:751–763. doi: 10.1080/01490451.2013.822615
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S e Nasrulloha Boyce A (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 21:573. doi: 10.3390/molecules21050573
- Venturi V e Keel C (2016) Signaling in the Rhizosphere. *Trends Plant Sci* 21:187–198. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.005
- Zahoo, Ahmad W, Hira K, Ullah B, Khan A, Shah Z, Khan FA e Raja Mohib Muazzam Naz (2014) Role of Nitrogen Fertilizer in Crop Productivity and Environmental Pollution. *Int J Agric For* 4:201–206. doi: 10.5923/j.ijaf.20140403.09
- Zentková I e Cveňgrosova E (2013) The utilization of rapeseed for biofuels production in the EU. *Visegr J Bioeconomy Sustain Dev* 2:11–14.