Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo

Bruna Durante Batista

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Bruna Durante Batista
Bacharel em Biotecnologia

Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo

Orientador
Prof. Dr. **JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Batista, Bruna Durante

Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo / Bruna Durante Batista. - - Piracicaba, 2017.

107 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. RPCP 2. Bioinoculante 3. Agricultura sustentável 4. Ampla gama de hospedeiros I. Título

À querida professora Aline A. Pizzirani-Kleiner (*in memoriam*) pelo acolhimento carinhoso e como sua última aluna orientada

DEDICO

Aos meus queridos pais Cláudio e Sandra, irmãs, Letícia e Amanda, e sobrinhos, Ana Cláudia, Isabela e Cauã pelo ponto de apoio e alegria que me proporcionam

OFEREÇO

Agradecimentos

A Deus, pelas bênçãos diárias e por estar presente em cada decisão tomada em todos os momentos da minha vida

Ao meu querido professor e orientador João Lúcio de Azevedo pelo exemplo como pessoa e profissional, pelos ensinamentos sempre tão valiosos e amizade.

À querida Maria Carolina Quecine pelo apoio fundamental, orientação, amizade e pelas sugestões nos momentos decisivos que sempre me ajudam muito!

À toda a minha família, mãe, pai, por serem minha inspiração e meu apoio, minhas irmãs, sobrinhos e cunhados por toda alegria que me proporcionam.

À Jack e Renata pela amizade, convívio diário no laboratório e conselhos.

À Maria Letícia e Samyra pela amizade e companheirismo.

A todo o pessoal do laboratório Mari, Isa, Bruno, Tiago, Rafa, Gustavo, Everton, Daniel, Giulio, Jessica, Zezo, Joelma, Bia, pela agradável convivência e auxílio de sempre.

Ao Lucas Taniguti pela amizade e ajuda com os dados de bioinformática.

À amiga Pórtya pela ajuda com as análises estatísticas.

À Renatinha, pelo esforço e dedicação durante o estágio, e Fernando Piotto pela ajuda fundamental com os experimentos dos tomatinhos.

Ao professor Paul Dennis, da Universidade de Queensland pelo suporte com os experimentos de quimiotaxia e por me receber em seu laboratório e a todo o pessoal da embaixada da Austrália e ao Governo Australiano pelo financiamento e oportunidade concedidos no intercâmbio.

Ao professor Labate pelo acolhimento em seu laboratório por um período do doutorado, à Mônica e todos alunos do Max Feffer pelo suporte.

Ao professor Roberto pelo auxílio com análises e infraestrutura disponibilizada, técnicos Miguel e Guilherme e todos alunos do laboratório de alógamias, em especial à Miriam pela prontidão em sempre ajudar.

Ao Gustavo – Gu e ao German pela ajuda com o milho no campo e ao Txarli pela disponibilização da área de plantio do milho em Taquarituba.

Ao grupo de estágio PACES, em especial Carlo, Beto, Guizo e Nak pelo suporte com os experimentos com a soja.

Aos funcionários da ESALQ pela colaboração nos testes realizados em campo e às funcionárias responsáveis pela limpeza do laboratório.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos professores pela contribuição em minha formação.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos demais que, de alguma forma, colaboraram com o trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO	15
REFERÊNCIAS	16
2. DRAFT GENÔMICO DE <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 E DETECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS EM MECANISMOS RELACIONADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	19
RESUMO	19
ABSTRACT	19
2.1. INTRODUÇÃO	20
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.2.1. Linhagem bacteriana	22
2.2.2. Ensaio de quimiotaxia.....	22
2.2.3. Condições de crescimento e extração de DNA.....	23
2.2.4. Sequenciamento, montagem, anotação e análises.....	24
2.2.5. Busca de genes relacionados aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal	24
2.2.6. Submissão dos dados	24
2.3. RESULTADOS	24
2.3.1. Ensaio de quimiotaxia.....	24
2.3.2. Características gerais do genoma de <i>Bacillus</i> sp RZ2MS9.....	25
2.3.3. Genes relacionados às características de promoção de crescimento vegetal por RZ2MS9.....	26
2.4. DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS	33
3. ESTUDO FILOGENÉTICO E COMPARATIVO DE <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	39
RESUMO	39
ABSTRACT	39
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1. Seleção dos genomas e coleta dos dados	41
3.2.2. Análise filogenética.....	42
3.2.3. Estudos comparativos.....	42
3.3. RESULTADOS	42
3.3.1. Análise filogenética.....	42
3.3.2. Estudos comparativos.....	44
3.4. DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS	50

4. <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO E ALTERA A ARQUITETURA DO SISTEMA RADICULAR DE TOMATEIRO MICRO-TOM POR MEIO DE MECANISMO DEPENDENTE DE AUXINA.....	55
RESUMO	55
ABSTRACT	55
4.1. INTRODUÇÃO	56
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.2.1. Material biológico	59
4.2.2. Busca de genes possivelmente envolvidos na produção de triptofano e AIA em <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	59
4.2.3. Efeito do período de incubação na produção de AIA por RZ2MS9	59
4.2.4. Efeito da concentração de L-triptofano na produção de AIA por RZ2MS9	59
4.2.5. Bacterização de sementes	60
4.2.6. Delineamento experimental	60
4.2.7. Plantio e condições de crescimento vegetal.....	60
4.2.8. Avaliação dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento vegetal.....	60
4.2.9. Análise dos dados	61
4.3. RESULTADOS.....	61
4.3.1. Genes relacionados à biossíntese de triptofano e AIA presentes no genoma de <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	61
4.3.2. Efeito do período de incubação na produção de AIA por RZ2MS9	63
4.3.3. Efeito da concentração do L-triptofano na produção de AIA por RZ2MS9	64
4.3.4. Efeito de promoção de crescimento em MT e Δdgt após aplicação bacteriana	65
4.4. DISCUSSÃO	67
REFERÊNCIAS	71
5. <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA EM CONDIÇÕES DE CAMPO	77
RESUMO	77
ABSTRACT	77
5.1. INTRODUÇÃO	78
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
5.2.1. Material biológico	79
5.2.2. Caracterização das áreas experimentais	80
5.2.2.1. Milho.....	80
5.2.2.2. Soja.....	80
5.2.3. Preparo do inóculo bacteriano e tratamento de sementes	81
5.2.4. Delineamento experimental	82
5.2.4.1. Milho.....	82
5.2.4.2. Soja.....	82
5.2.5. Plantio e condução do experimento	82
5.2.5.1. Milho.....	82
5.2.5.2. Soja.....	82
5.2.6. Avaliação dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento vegetal e produtividade.....	83
5.2.6.1. Milho.....	83
5.2.6.2. Soja.....	83

5.2.7. Análises estatísticas.....	83
5.2.7.1. Milho.....	83
5.2.7.2. Soja.....	83
5.3. RESULTADOS	84
5.3.1. Milho.....	84
5.3.2. Soja.....	86
5.4. DISCUSSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
ANEXOS.....	99

RESUMO

Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo

Para alimentar a população mundial crescente é necessário um aumento sustentável na produtividade agrícola. Nesse sentido, Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) têm sido continuamente buscadas para formulações inoculantes por sua capacidade de incremento na produção vegetal aliado ao seu potencial de redução e/ou substituição do uso de fertilizantes minerais, insumos que causam grandes impactos ambientais, na saúde humana e econômicos. A RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9, um representante da biodiversidade amazônica brasileira, é uma forte candidata a bionoculante por seu efeito benéfico, previamente descrito, em uma ampla gama de culturas, incluindo milho e soja. Essas duas culturas representam mais de 80% da área cultivada com grãos no Brasil, de forma que incrementos relativamente modestos de crescimento e produtividade poderiam gerar ganhos significativos. Membros do gênero *Bacillus* apresentam vantagem em formulações inoculantes, principalmente devido a sua capacidade de formação de esporos resistentes ao calor e dissecação. Seus modos de ação são diversos, tornando o entendimento da sua interação com plantas bastante desafiador. *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentou, dentre os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal, a produção de Ácido Indol Acético (AIA) e sideróforos, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio, *in vitro*. No presente trabalho, foi buscado um entendimento detalhado dos mecanismos de ação dessa rizobactéria, explorando desde seu genoma até seu desempenho em condições de campo. O *draft* genômico (genoma parcial) bacteriano foi obtido utilizando a tecnologia de sequenciamento Illumina, o qual possibilitou a detecção de genes envolvidos nos mecanismos potencialmente relacionados ao efeito benéfico dessa bactéria, que vão desde sua formação de esporos, atração por exsudatos radiculares, motilidade e competição na rizosfera até mecanismos de solubilização de fosfato, produção de sideróforos, entre outros. As informações obtidas permitem uma exploração genética desses mecanismos, fornecendo uma oportunidade de maximizar essa interação e, futuramente, favorecer os benefícios em campo. Adicionalmente, foi demonstrado o potencial de quimiotaxia (atração) de RZ2MS9 em direção a raízes de milho. Um estudo filogenético dessa RPCP, utilizando um método de tipagem com o gene *pycA* (piruvato carboxilase), mostrou que o *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentou-se distante do clado altamente monomórfico de *B. anthracis*, patógeno humano, e se afiliou a um grupo composto por linhagens de *B. thuringiensis* (*Bt*) comercializadas como produtos biopesticidas há mais de 60 anos, o que sugere a potencial possibilidade de seu uso seguro no campo. Sabe-se que a maioria, se não todas, atividades fisiológicas das plantas é regulada por fitormônios como a auxina AIA, os quais podem ser sintetizados também por RPCPs. Com mais detalhamento, os genes envolvidos nas vias biossintéticas desse fitormônio foram detectados no *draft* genômico de RZ2MS9, indicando que sua produção ocorre através da via IPA (Indol-3-Piruvato). Além disso, plantas de tomate anão Micro-Tom (MT) e seu mutante Δdgt , defeitivo na sensibilidade a auxinas, foram utilizadas para caracterizar especificamente o efeito do AIA produzido por *Bacillus* sp. RZ2MS9 na promoção de crescimento vegetal. A aplicação de RZ2MS9 causou inibição no crescimento de raízes primárias, aumento no comprimento de raízes laterais e na área superficial total de raízes de plantas MT, efeitos característicos daqueles proporcionados por auxinas. Esse incremento radicular refletiu, ainda, em aumento da biomassa da parte aérea de plantas MT. Os mesmos efeitos não foram observados em plantas Δdgt , insensíveis a auxinas, indicando que a elicitação de promoção de crescimento em MT por RZ2MS9 ocorre por meio desses fitormônios. Finalmente, foi demonstrado o efeito sobre o desenvolvimento e produtividade de milho e soja da aplicação de *Bacillus* sp. RZ2MS9 em condições de campo, sendo comparado com o desempenho de bioinoculantes comerciais. No milho, o efeito da inoculação bacteriana foi, ainda, associado à adubação nitrogenada para verificar a possibilidade de redução desses insumos. *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentou efeitos significativos sobre o desenvolvimento tanto da soja (comparáveis aos efeitos de rizóbios) quanto do milho, os quais, porém, não refletiram em aumento significativo de produtividade em ambas as culturas. No entanto, o potencial dessa rizobactéria é bastante claro pois, com um custo de produção inferior a R\$1,00 por hectare, sua inoculação causou incremento de 16 sacas de milho por hectare com redução de 30% na adubação nitrogenada, assim como um incremento de 11 sacas de soja por hectare, ambos comparados ao controle não inoculado. Os resultados apresentados no presente trabalho vão, portanto, de encontro à grande expectativa na obtenção de linhagens microbianas promissoras visando sistemas agrícolas mais sustentáveis.

Palavras-chave: RPCP; Bioinoculante; Agricultura sustentável; Ampla gama de hospedeiros

ABSTRACT

Plant growth promotion by *Bacillus* sp. RZ2MS9: from genes to the field

To feed the growing global population, a sustainable increase of agricultural production and crop yield is required. In this sense, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) have been continuously sought to inoculant formulation due to their capacity to increase plant yield along with their potential to reduce and/or replace the use of mineral fertilizers, inputs that cause serious impacts on environment, human health and economy. The PGPR *Bacillus* sp. RZ2MS9, a representative of the Brazilian Amazonian biodiversity, is a great candidate to bioinoculant because of its beneficial effect on a broad range of crops, including maize and soybean. These two crops represent more than 80% of the area planted with grains in Brazil, so relatively modest growth and yield increases could generate significant gains. *Bacillus* spp. have advantage in inoculant formulations, mainly due to their ability to form heat- and desiccation-resistant spores. Their modes of action are diverse, making the understanding of its interaction with plants quite challenging. *Bacillus* sp. RZ2MS9 displays, between the mechanisms involved in plant growth, Indole Acetic Acid (IAA) and siderophore production, phosphate solubilization and biological nitrogen fixation, *in vitro*. In the present work, we seek a detailed understanding of this rhizobacterium mechanisms of action, exploring from its genome to its performance in field conditions. The bacterial draft genome was obtained using Illumina sequencing technology, making possible the detection of genes involved in mechanisms potentially related to the beneficial effect of this bacterium, and range from its spore formation, attraction by root exudates, motility and competition in the rhizosphere to mechanisms of phosphate solubilization, siderophore production, among others. The information obtained allow a genetic exploration of these mechanisms, providing an opportunity to maximize this interaction and, in the future, favor benefits in field. Additionally, it was demonstrated the chemotaxis (attraction) potential of RZ2MS9 towards maize roots. A phylogenetic study of this PGPR, using a typing method with the *pycA* (pyruvate carboxylase) gene, showed that *Bacillus* sp. RZ2MS9 was distant from the highly monomorphic clade of *B. anthracis*, a human pathogen, and affiliated with *B. thuringiensis* (*Bt*) strains marketed as biopesticides for more than 60 years, suggesting the potential possibility of its safe use in the field. It is known that most, if not all, physiological activities of plants are regulated by phytohormones such as the auxin IAA, which can also be synthesized by PGPRs. With more detail, genes involved in biosynthetic pathways of this phytohormone were detected in the RZ2MS9 draft genome, indicating that its production occurs via the IPA (indole-3-pyruvate) pathway. In addition, plants of the dwarf tomato Micro-Tom (MT) and its mutant Δdgt , impaired in auxin sensibility, were used to specifically characterize the effects of IAA produced by *Bacillus* sp. RZ2MS9 in the plant growth promotion. The inoculation of RZ2MS9 caused inhibition in the primary roots growth, increase in lateral roots length and in roots total surface area of MT plants, characteristic effects of those provided by auxins. This root growth also reflected in an increase of MT plants shoot biomass. The same effects were not observed in Δdgt plants, insensitive to auxins, suggesting that the elicitation of growth promotion in MT by RZ2MS9 occurs through these phytohormones. Finally, we demonstrated the effect of inoculation with *Bacillus* sp. RZ2MS9 on maize and soybean development and productivity under field conditions, being compared with the performance of commercial bioinoculants. In maize, the effect of bacterial inoculation was also associated with nitrogen fertilization to verify the possibility of reducing these inputs. *Bacillus* sp. RZ2MS9 showed significant effects on the development of both soybean (comparable to the effects of rhizobia) and maize, which, however, did not reflect a significant increase in productivity in both crops. However, the potential of this rhizobacterium is very clear because, with a cost of production of less than R\$1.00 per hectare, its inoculation caused an increase of 16 sacks of maize per hectare with a 30% reduction in nitrogen fertilization, as well as an increase of 11 sacks of soybean per hectare, both compared to uninoculated control. The results presented in this study meet the great expectation of obtaining promising microbial strains aiming at more sustainable agricultural systems.

Keywords: PGPR; Bioinoculant; Sustainable agriculture; Broad host range

LISTA DE FIGURAS

2. DRAFT GENÔMICO DE *Bacillus* sp. RZ2MS9 E DETECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS EM MECANISMOS RELACIONADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

FIGURA 1. Ensaio de quimiotaxia utilizando seringas contendo solução tampão PBS, plantas de milho crescidas *in vitro* e solução bacteriana de *Bacillus* sp. RZ2MS9. A) “Tratamento incubado” consiste na submersão das pontas das seringas, contendo as plantas, na solução bacteriana, B) “Controle não incubado” onde as pontas das seringas, com plantas, não são submergidas na solução bacteriana e C) “Controle incubado” consiste na submersão das seringas, contendo apenas tampão, sem plantas, na solução bacteriana **23**

FIGURA 2. Distribuição de seqüências codificadoras de proteínas de RZ2MS9 (82%) em classes funcionais COG (*Cluster of Ortholog Groups*) fornecidas pelo programa COGNITOR. A) Proporção de seqüências codificantes em cada categoria COG, o percentual é baseado no número total de genes anotados no genoma bacteriano. As categorias funcionais A, B, W e Y correspondentes a funções eucarióticas foram omitidas; B) Lista das categorias COG e suas respectivas funções **26**

3. ESTUDO FILOGENÉTICO E COMPARATIVO DE *Bacillus* sp. RZ2MS9

FIGURA 3. Árvore filogenética baseada nos genes *pycA* (piruvato carboxilase, 3447 pb) recuperados dos genomas do *Bacillus* sp. RZ2MS9 e de linhagens de *B. thuringiensis* (32 seqüências), *B. cereus* (31 seqüências) e *B. anthracis* (42 seqüências) disponíveis no banco de dados do NCBI. O alinhamento, pela ferramenta ClustalW, e a construção da árvore filogenética foram realizados com o *software* MEGA6.06, utilizando o método Neighbor-Joining (NJ). As distâncias genéticas foram estimadas de acordo com o modelo Kimura de dois parâmetros e a confiabilidade de cada topologia de árvore foi avaliada usando 1.000 réplicas de *Bootstrap*. A versão final da árvore foi editada com o *software* Treegraph 2. A linhagem *Bacillus subtilis* 6051-HGW foi utilizada como *outgroup* e os números de acesso de todos os organismos podem ser consultados no Anexo **243**

FIGURA 4. À esquerda, distribuição de seqüências codificadoras de proteínas das linhagens pertencentes ao Clado RZ2MS9 em classes funcionais COG (*Cluster of Ortholog Groups*) fornecidas pelo programa COGNITOR. O número em cada quadrado representa o percentual arredondado de atribuição de seqüências codificantes em cada categoria. O percentual de genes categorizados de cada linhagem está apresentado após o nome do isolado, entre parênteses, essa proporção é baseada no número total de genes no genoma bacteriano. As categorias funcionais A, B, W e Y correspondentes a funções eucarióticas foram omitidas. À direita, lista das categorias COG e suas respectivas funções. ¹*Bacillus* sp. RZ2MS9, ²*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, ³*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, ⁴*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, ⁵*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, ⁶*B. thuringiensis* YC-10, ⁷*B. thuringiensis* YWC2-8, ⁸*B. thuringiensis* Bc601 **144**

FIGURA 5. Distribuição dos *clusters* de biossíntese de metabólitos secundários nos genomas dos organismos do Clado RZ2MS9 de acordo com o *Antismash* (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*). Quadrados pretos indicam a presença do *cluster* e os brancos indicam sua ausência **45**

FIGURA 6. *Clusters* relacionados à biossíntese de sideróforo do tipo petrobactina (A) e bacillibactina (B) recuperados dos genomas do Clado RZ2MS9 através do programa *Antismash* (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*). Cores iguais em linhagens diferentes indicam o mesmo gene. Genes de cor branca representam genes não relacionados com *clusters* de metabólitos secundários. ¹*Bacillus* sp. RZ2MS9, ²*B. thuringiensis* YC-10, ³*B. thuringiensis* YWC2-8, ⁴*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, ⁵*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, ⁶*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, ⁷*B. thuringiensis* Bc601, ⁸*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29 **45**

FIGURA 7. Alinhamento de sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *ipdC* das linhagens do Clado RZ2MS9. RZ2MS9 corresponde ao *Bacillus* sp. RZ2MS9 (n. Acesso GenBank da proteína: OGY01885.1), Bc601 (*B. thuringiensis* Bc601, acesso: AMX77331.1), YWC2-8 (*B. thuringiensis* YWC2-8, acesso: ALL59570.1), YC-10 (*B. thuringiensis* YC-10, acesso: AKJ56914.1), HD-29 (*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, acesso: AJA18749.1), YBT-1520 (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, acesso: AHZ51336.1), HD-1 (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, acesso: AIE33749.1) e HD73 (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, acesso: AGE78276.1). As sequências foram obtidas do banco de dados do NCBI, alinhadas utilizando o T-Coffee e exibido por Boxshade. Preto e cinza indicam aminoácidos idênticos e similares, respectivamente.....47

4. *Bacillus* sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO E ALTERA A ARQUITETURA DO SISTEMA RADICULAR DE TOMATEIRO MICRO-TOM POR MEIO DE MECANISMO DEPENDENTE DE AUXINA

FIGURA 8. Visão geral, compilada de Patten e Glick (1996) e Spaepen e Vanderleyden (2011), das vias biossintéticas de L-triptofano e Ácido-3-Indol-Acético (AIA) em plantas e bactérias. Linhas pontilhadas indicam etapas pouco caracterizadas ou etapas intermediárias omitidas. Em preto, via biossintética do precursor L-triptofano (Trp), formado a partir do corismato pelos genes *trp*. Vias dependentes do Trp: em amarelo, via IAN (indol-3-acetonitrila), em azul, via IAM (indol-3-acetamida), em vermelho, via IPA (indol-3-piruvato) e em verde, via TRM (triptamina); via independente de Trp: em cinza57

FIGURA 9. Fenótipos apresentados pelo tomateiro-anão Micro-Tom (MT), à esquerda, e seu mutante *diageotropica* (Δdgt), defeitivo para sensibilidade a auxinas, à direita. Fonte: Pino-Nunes (2005) 58

FIGURA 10. Via bioquímica de biossíntese de L-triptofano. *trpE* codifica a subunidade maior da antranilato sintase; *trpG* codifica a subunidade menor ligante de glutamina da antranilato sintase e catalisa a reação da glutaminase; *trpD* codifica a antranilato fosforibosil transferase; *trpF* codifica PRA isomerase (fosforibosil antranilato isomerase); *trpC* codifica InGP sintase (indol-3-glicerol fosfato sintase); *trpA* codifica a subunidade α da triptofano sintase que converte InGP em indol; *trpB* codifica a subunidade β da triptofano sintase e converte indol e serina em triptofano e gliceraldeído-3-fosfato. Todos esses genes foram detectados no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9. Figura adaptada de Kagan et al. 2008.....62

FIGURA 11. Visão geral das vias biossintéticas de L-triptofano e Ácido-3-Indol-Acético (AIA). Os genes detectados no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9 estão sublinhados e destacados na figura. Linhas pontilhadas indicam etapas pouco caracterizadas ou etapas intermediárias omitidas.....63

FIGURA 12. Curvas de crescimento e de produção de auxina por *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meio de cultura LB suplementado com 1 g.L⁻¹ de L-triptofano. Os dados mostrados são representativos de 3 repetições. Correlação positiva e significativa ($r = 0,72$; $P = 0,0002479$) entre produção de auxina e densidade celular foi observada.....64

FIGURA 13. Crescimento e produção de auxina por *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meios de cultura LB suplementados com diferentes concentrações de L-triptofano (0; 0,1; 0,5. 1 e 2 g.L⁻¹). Os dados mostrados são representativos de 3 repetições. Correlação positiva e significativa ($r = 0,76$; $P = 0,00104$) entre produção de auxina e a concentração de L-triptofano adicionado ao meio de cultura foi observada.....64

FIGURA 14. Efeito da rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 no Peso Seco da Parte Aérea (PSPA) (g) e nos fenótipos de plantas de tomate Micro-Tom (MT) e de seu mutante *diageotropica* (Δdgt), defeitivo na sensibilidade ao AIA, 60 dias após o plantio. Os dados representam a média de 9 repetições por tratamento. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre genótipos (MT x Δdgt), enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos (RZ2MS9 x Controle) dentro de cada genótipo pelo teste de Tukey a 5% de significância.....65

FIGURA 15. Respostas de plantas de tomate Micro-Tom (MT) (em cinza) e de seu mutante *diageotropica* (Δdgt), defeitivo na sensibilidade ao AIA, (em branco) à inoculação da rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9, 60 dias após o plantio, detectadas através da análise dos seguintes parâmetros referentes à arquitetura de raízes: A) Comprimento Total de Raízes (CT), B) Comprimento de Raízes Laterais (CRL), C) Comprimento de Raízes Axiais (CRA), D) Área Superficial Total de Raízes (AS) e E) Diâmetro Médio Total (DM). Os dados representam a média de 9 repetições por tratamento. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre genótipos (MT x Δdgt), enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos (RZ2MS9 x Controle) dentro de cada genótipo pelo teste de Tukey a 5% de significância..... **66**

FIGURA 16. Efeito fenotípico sobre a arquitetura de raízes de (A) planta de tomate Micro-Tom (MT) inoculada com a rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 e (B) planta de tomate MT sem inoculação bacteriana - Controle. Imagens capturadas em *scanner* profissional Epson® expression 11000xl a 400 dpi. **66**

5. *Bacillus* sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

FIGURA 17. Temperatura média e precipitação pluviométrica na cidade de Taquarituba – SP nos meses de condução do experimento com o milho (Fonte: NASA power, 2017 – dados de temperatura; Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas-CIIAGRO, 2017 – dados de precipitação)..... **80**

FIGURA 18. Temperatura média e precipitação pluviométrica na área experimental situada na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP no período de condução do experimento, de 11/12/15 a 02/04/16 (Fonte: Série de Dados Climatológicos ESALQ, 2017) **81**

FIGURA 19. Resposta da altura de plantas e altura da inserção de espigas com a inoculação de: A e D) *Bacillus* sp. RZ2MS9, B e E) inoculante comercial e C e F) controle não inoculado, respectivamente, em função da aplicação das diferentes doses de nitrogênio..... **85**

FIGURA 20. Massa de grãos (A) e massa de 1000 grãos (B) de milho em função da aplicação de diferentes doses de nitrogênio..... **85**

FIGURA 21. Médias das alturas (A) e diâmetros (B), aferidas no início do estágio R1, e massa de 20 plantas (C), aferida na colheita, da soja para cada tratamento adotado: controle não inoculado, rizóbio SEMIA 5080 e *Bacillus* sp. RZ2MS9. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância..... **86**

FIGURA 22. Médias dos números de vagens (A), massa de grãos (B) e massa de 1000 grãos (C) provenientes de 20 plantas de soja colhidas por bloco para os tratamentos adotados: controle não inoculado, rizóbio SEMIA 5080 e *Bacillus* sp. RZ2MS9. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância..... **87**

LISTA DE TABELAS

2. DRAFT GENÔMICO DE *Bacillus* sp. RZ2MS9 E DETECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS EM MECANISMOS RELACIONADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

TABELA 1. Características gerais do *draft* genômico de *Bacillus* sp. RZ2MS9.....25

TABELA 2. *Clusters* gênicos biossintéticos de metabólitos secundários de *Bacillus* sp. RZ2MS9 definidos pelo *Antismash* (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*).....27

3. ESTUDO FILOGENÉTICO E COMPARATIVO DE *Bacillus* sp. RZ2MS9

TABELA 3. Informações genômicas das linhagens pertencentes ao Clado RZ2MS9 utilizadas nos estudos comparativos44

TABELA 4. Mecanismos bacterianos relevantes na promoção de crescimento vegetal e distribuição de genes-chave envolvidos em cada mecanismo entre os organismos do Clado RZ2MS9.....46

4. *Bacillus* sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO E ALTERA A ARQUITETURA DO SISTEMA RADICULAR DE TOMATEIRO MICRO-TOM POR MEIO DE MECANISMO DEPENDENTE DE AUXINA

5. *Bacillus* sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

TABELA 5. Resultados da análise de solo para avaliação da fertilidade da área experimental em Taquarituba - SP.....80

TABELA 6. Resultados da análise de solo para avaliação da fertilidade da área experimental na ESALQ/USP, Piracicaba- SP.....81

TABELA 7. Análise de variância (quadrado médio - QM) dos dados de Comprimento da Espiga (CE), Altura da Planta (AP), Altura da Inserção da Espiga (AE), Massa de Grãos (MG) e Massa de 1000 Grãos (M1000G) após aplicação dos inoculantes (*Bacillus* sp. RZ2MS9, inoculante comercial e controle não inoculado) sob diferentes doses de nitrogênio aplicadas em milho...84

TABELA 8. Médias dos comprimentos das espigas de plantas de milho submetidas a diferentes doses de nitrogênio e inoculações (*Bacillus* sp. RZ2MS9, inoculante comercial e controle não inoculado). Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas, e maiúsculas iguais nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste SNK ao nível de 5% de significância84

TABELA 9. Médias da produtividade de milho submetido a diferentes doses de nitrogênio e inoculações (*Bacillus* sp. RZ2MS9, inoculante comercial e controle não inoculado). Diferenças não significativas de acordo com o teste SNK ao nível de 5% de significância86

TABELA 10. Médias da produtividade de soja de acordo com os tratamentos adotados: *Bacillus* sp. RZ2MS9, rizóbio SEMIA 5080 e controle não inoculado. Diferenças não significativas de acordo com o teste SNK ao nível de 5% de significância87

1. INTRODUÇÃO

A população mundial, que atualmente é de cerca de 7 bilhões de pessoas, deverá aumentar para aproximadamente 10 bilhões nos próximos 50 anos (Glick 2014). Para atender a demanda alimentar dessa população crescente, a produção agrícola mundial deverá aumentar em até 60% nas próximas décadas. Sendo o Brasil um importante fornecedor global de alimentos, o aumento contínuo da produção agrícola no país trará benefícios econômicos internos e será cada vez mais importante para o mundo. No entanto, o aumento de produção não pode ser baseado no aumento da área cultivada, a qual apresenta limitações físicas claras, e sim no aumento da produtividade agrícola (Marin et al. 2016), altamente dependente do uso de fertilizantes minerais, insumos que causam uma série de impactos negativos tanto ambientais e na saúde humana, quanto econômicos (Horrigan et al. 2002). Nesse cenário, a utilização de micro-organismos benéficos às plantas, como as Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs), vem ganhando atenção crescente na busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis devido ao seu potencial na substituição e/ou redução do uso de fertilizantes, e certamente irão desempenhar um papel importante na revolução agrícola nas próximas décadas (Parnell et al. 2016).

A camada fina de solo ao redor das raízes cujas propriedades físicas, químicas e biológicas são influenciadas pelo crescimento e atividade vegetal é conhecida como rizosfera. Um grande número de micro-organismos coexiste nessa região devido à alta quantidade de exsudatos liberados pelas plantas, sendo as bactérias os mais abundantes (Saharan e Nehra 2011). RPCPs incluem bactérias de vida livre ou endofíticas que foram originalmente isoladas da rizosfera e que influenciam positivamente o desenvolvimento vegetal através de mecanismos diretos e/ou indiretos (Vessey et al. 2003). Mecanismos diretos compreendem tanto a facilitação da aquisição de nutrientes (pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e aquisição de ferro usando sideróforos) quanto a modulação de níveis hormonais vegetais (por produção de Ácido Indol Acético – AIA, ou por reduzir o estresse hormonal de etileno, empregando a enzima ACC desaminase). Mecanismos indiretos envolvem a redução dos efeitos inibitórios de vários patógenos sobre o desenvolvimento e crescimento vegetal, mais especificamente, por meio de competição por nutrientes, exclusão de nichos, indução de resistência sistêmica e produção de metabólitos antimicrobianos (Paterson et al. 2016).

A importância de RPCPs na agricultura foi apresentada pela primeira vez por Kloepper e Schroth (1978) e, a partir disso, diversos pesquisadores em todo o mundo começaram a investigar os mecanismos, modos de ação, fisiologia e bioquímica dessas bactérias, alcançando uma compreensão mais complexa e detalhada da mecânica empregada por RPCPs para promover o crescimento de plantas (Goswami et al. 2016, Paterson et al. 2016). Esse entendimento permitiu o uso prático de RPCPs na agricultura na forma de produtos formulados, utilizados como bioinoculantes (Jha e Saraf 2015). No entanto, apesar do enorme potencial econômico e ambiental desses produtos, sua real utilização representa atualmente uma pequena fração das práticas agrícolas adotadas em todo o mundo e isso se deve principalmente à baixa sobrevivência dos organismos em campo e em formulações e à baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos nos laboratórios e casas de vegetação quando em condições de campo (Parnell et al. 2016).

Os modos de ação de RPCPs são diversos e nem todas rizobactérias possuem os mesmos mecanismos, o que torna um grande desafio compreender sua interação com as plantas (Vejan et al. 2016). Dessa forma, muito ainda deve ser pesquisado para o entendimento concreto de como RPCPs interagem com as plantas e quais mecanismos estão envolvidos no efeito benéfico bacteriano, de modo a desenvolver bioinoculantes formulados com RPCPs que atuem consistentemente, mesmo em diferentes condições e culturas. O desenvolvimento recente de abordagens de sequenciamento genômico permite a exploração genética dessa interação e dos mecanismos microbianos envolvidos,

fornecendo uma oportunidade de maximizar os efeitos das bactérias e diminuir a inconsistência dos resultados. E de fato, a análise sistemática de dados genômicos tem auxiliado na compreensão da genética molecular de muitas espécies bacterianas (MacLean et al. 2009).

A maioria dos gêneros bacterianos de RPCPs reportados incluem *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Frankia*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Glick 1995, Vessey 2003), sendo os dois últimos os mais extensivamente estudados (Beneduzi et al. 2012). *Bacillus* é um gênero de bactérias Gram-positivas, em formato de bastonete e capaz de formar estruturas dormentes estáveis, os endósporos, que são geralmente viáveis por um longo período em condições de ausência de nutrientes e condições ambientais desfavoráveis (Joung e Côté 2002). A habilidade de esporulação e o fácil cultivo de espécies de *Bacillus* são atrativos para seu uso prático como inoculantes e fornecem uma solução para o problema de sobrevivência em formulações e em campo (Toyota 2015).

A RPCP *Bacillus* sp. linhagem RZ2MS9 foi isolada previamente da rizosfera de plantas saudáveis de guaranazeiro amazônico sendo, portanto, um representante da rica biodiversidade amazônica brasileira, e é positiva para os mecanismos de solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e produção de AIA *in vitro* (Batista 2012). Essa bactéria apresentou efeitos benéficos sobre o crescimento de milho e soja, duas culturas extremamente importantes no mundo e que impulsionam a agricultura no Brasil atualmente, representando juntas mais de 80% da área total cultivada com grãos no país (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2017). Em condições de casa de vegetação, a resposta das plantas inoculadas com essa bactéria em relação ao controle, não inoculado, foi expressiva: incrementos na altura (25,9% em soja e 35,5% em milho), no peso seco da parte aérea (95,8% em soja, 235,5% em milho) e no peso seco do sistema radicular (247,8% em milho) foram obtidos (Batista 2012, Batista et al. submetido para publicação). Sua aparente não-especificidade a um único hospedeiro vegetal é, ainda, uma característica bastante desejada na formulação de inoculantes comerciais por questões práticas.

Devido ao grande potencial da RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 em ser utilizada como bioinoculante, um entendimento aprofundado de seus mecanismos de ação foi buscado no presente trabalho, explorando desde seu genoma até seu desempenho em condições de campo. Dessa forma, os objetivos consistiram em: i) buscar as bases genéticas de mecanismos possivelmente envolvidos no potencial promotor de crescimento vegetal da RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 através do sequenciamento, montagem e anotação de seu genoma, ii) estudar suas relações filogenéticas, inferindo sobre sua classificação e uso potencial no campo sem riscos à saúde humana e animal, iii) avaliar o papel específico do fitormônio AIA produzido por essa bactéria utilizando plantas-modelo de tomate Micro-Tom e um de seus mutantes defeituoso na sensibilidade a auxinas e iv) analisar o desempenho de *Bacillus* sp. RZ2MS9 sobre o desenvolvimento e produtividade de milho e soja, em condições de campo, comparando com o efeito de bactérias já comercializadas para essas culturas.

REFERÊNCIAS

- Batista BD (2012). Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba-SP, Brasil.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35, 1044-1051.

- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Disponível em: <
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_13_12_03_45_boletim_graos_fevereiro_2017.p](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_13_12_03_45_boletim_graos_fevereiro_2017.pdf)
 df >. Acesso em: Fevereiro de 2017.
- Glick BR (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109-117.
- Glick BR (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30-39.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1127500.
- Horrigan L, Lawrence RS, Walker P (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 110, 445-456.
- Jha CK, Saraf M (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*, 5, 108-119.
- Joung KB, Côté JC (2002). Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 97-108.
- Kloepper JW, Schroth MN (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 2, 879-882.
- MacLean D, Jones JD, Studholme DJ (2009). Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 287-296.
- Marin FR, PilauFG, Spolador HFS, Otto R, Pedreira CGS (2016). Intensificação sustentável da agricultura brasileira. Cenários para 2050. *Política Agrícola*, 3, 108-124.
- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM, DiLeo MV (2016). From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1110.
- Paterson J, Jahanshah G, Li Y, Wang Q, Mehnaz S, Gross H (2016). The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. *FEMS Microbiology Ecology*, fiw249.
- Saharan BS, Nehra V (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21, 30.
- Toyota K (2015). *Bacillus*-related spore formers: attractive agents for plant growth promotion. *Microbes and Environments*, 30, 205-207.
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. *Molecules*, 21, 573.
- Vessey JK (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.

2. DRAFT GENÔMICO DE *Bacillus* sp. RZ2MS9 E DETECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS EM MECANISMOS RELACIONADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

Membros do gênero *Bacillus* são importantes Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) e apresentam vantagem em formulações inoculantes, principalmente devido a sua capacidade de formação de esporos resistentes ao calor e dissecação. A interação RPCP-planta é um processo complexo que tem início com a colonização radicular pelas bactérias. Os efeitos benéficos de RPCPs para seus hospedeiros incluem a produção de compostos bioativos como o fitormônio Ácido Indol Acético (AIA), Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e poliaminas, e o aumento da disponibilidade de nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro, não prontamente assimiláveis pelas plantas na maioria das condições. Os modos de ação de RPCPs são diversos, tornando o entendimento da sua interação com plantas bastante desafiador. O desenvolvimento recente de abordagens de sequenciamento genômico permite uma exploração genética desses mecanismos e auxilia na compreensão de suas bases moleculares, fornecendo uma oportunidade de maximizar essa interação. *Bacillus* sp. RZ2MS9, uma rizobactéria promotora de crescimento de milho e soja, possui os mecanismos de produção de AIA e sideróforos, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio, *in vitro*. Adicionalmente, no presente capítulo seu potencial de quimiotaxia em direção a raízes de milho foi comprovado. O *draft* genômico (genoma parcial) bacteriano foi obtido utilizando a tecnologia de sequenciamento Illumina, o qual possibilitou a detecção de genes envolvidos nos mecanismos potencialmente relacionados ao efeito benéfico dessa bactéria, que vão desde sua esporulação, atração por exsudatos radiculares, motilidade e competição na rizosfera, até mecanismos de solubilização de fosfato, produção de sideróforos e muitos outros. O *draft* genômico apresentado no presente capítulo foi publicado como o trabalho “*Draft Genome Sequence of Multitrait Plant Growth-Promoting *Bacillus* sp. Strain RZ2MS9*” na revista *Genome Announcements* em 22 de dezembro de 2016 (doi: 10.1128/genomeA.01402-16). Nenhuma permissão é requerida dos demais autores ou da revista para o reuso do conteúdo do artigo original.

Palavras-chave: Genoma; RPCP; Quimiotaxia; Esporo

ABSTRACT

Members of *Bacillus* genus are important Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) and presents advantage in inoculant formulations, especially due to their capacity of forming heat- and dissection-resistant spores. The interaction PGPR-plant is a complex process which begins with root colonization by bacteria. The beneficial effects of PGPRs for their hosts include the production of bioactive compounds such as Indole Acetic Acid (IAA), Volatile Organic Compounds (VOCs) and polyamines, also increase availability of nutrients such as nitrogen, phosphorus and iron, not readily bioavailable to plants under most conditions. The PGPRs modes of action are diverse, making the understanding of their interaction with plants quite challenging. The recent development of genomic sequencing approaches allows a genetic exploration of these mechanisms and helps to understand their molecular basis, providing an opportunity to maximize the interaction. *Bacillus* sp. RZ2MS9, a maize and soybean growth promoting rhizobacteria, have the mechanisms of IAA and siderophore production, phosphate solubilization and nitrogen fixation, *in vitro*. Additionally, in this chapter its chemotaxis (attraction) potential towards maize roots has been proven. The draft genome of *Bacillus* sp. RZ2MS9 was obtained using Illumina sequencing technology, which enabled the detection of genes involved in mechanisms potentially related to the beneficial effect of this bacterium on plants, ranging from its sporulation, attraction by root exudates, motility and competition in the rhizosphere, to mechanisms of phosphate solubilization, siderophore production and many others. The draft genome sequence presented here was published as the “*Draft Genome Sequence of Multitrait Plant Growth-Promoting *Bacillus* sp. Strain RZ2MS9*” in *Genome Announcements* journal on 2016, December 22 (doi: 10.1128/genomeA.01402-16). No permission is required from the authors or from the journal for the reuse of the content of the original article.

Keywords: Genome; PGPR; Chemotaxis; Spore

2.1. Introdução

O uso de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) tem crescido rapidamente nas últimas décadas por se mostrar uma alternativa promissora visando a substituição total ou parcial dos fertilizantes minerais na agricultura (Souza et al. 2015). Entre as diferentes espécies de RPCPs estudadas, membros do gênero *Bacillus* possuem atributos que lhes conferem vantagens em formulações inoculantes, principalmente sua capacidade de formação de esporos resistentes ao calor e dissecação, o que garante maior persistência no solo e em armazenamento, e facilidade de produção de formulações inoculantes (Toyota 2015). No entanto, para garantir melhores resultados em termos de desenvolvimento vegetal, linhagens promissoras na promoção de crescimento vegetal devem ser investigadas quanto ao arsenal de características que contribuem com sua bioatividade.

A interação entre plantas e RPCPs é um processo complexo e recíproco. A colonização bacteriana de plantas é a etapa inicial e fundamental nessa interação benéfica. Ela se inicia através da exsudação de diversos compostos pelas raízes, os quais atraem micro-organismos do solo e rizosfera em sua direção por quimiotaxia, causando subsequente movimento bacteriano ao longo das raízes e possível aderência na superfície radicular (Xie et al. 2014). Na etapa de colonização radicular por RPCPs, algumas estratégias visando a competição por nichos radiculares e nutrientes são utilizadas por essas bactérias, incluindo a liberação de antibióticos e substâncias que clivam moléculas de sinalização de outras bactérias (Hibbing et al. 2010) e a formação do biofilme (Ramey et al. 2004). Essas funções são geralmente reguladas por *Quorum Sensing* (QS), um mecanismo que controla a expressão gênica de maneira dependente de densidade celular. Fatores envolvidos na motilidade e outros mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por RPCPs também são controlados por QS (Podile et al. 2013). Após a colonização, RPCPs podem tomar e utilizar carboidratos, aminoácidos e outros compostos liberados pela planta e, em troca, produzir e fornecer uma série de substâncias bioativas para beneficiar o crescimento vegetal direta ou indiretamente. Entre essas substâncias estão os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) (Bailey e Weisskopf 2012), poliaminas (Xie et al. 2014) e fitormônios, em especial o Ácido Indol Acético (AIA) que, devido a sua crescente relevância no efeito promotor de crescimento vegetal por RPCPs do gênero *Bacillus* (Shao et al. 2015), será abordado com mais detalhes em um Capítulo separado (Capítulo 4).

A emissão microbiana de COVs, como 2,3-butanediol e acetoina, tem sido apontada, principalmente em isolados do gênero *Bacillus*, como um novo mecanismo de promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica vegetal (Ryu et al. 2003). COVs são compostos orgânicos ativos com elevada pressão de vapor que desempenham um importante papel na comunicação cruzada com as plantas (Kanchiswamy et al. 2015). Diversas espécies de *Bacillus* produtores de COVs foram reportados por aumentar diretamente o crescimento vegetal, entre elas *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. megaterium* (Ryu et al. 2003, Zou et al. 2010).

Além da produção e fornecimento dos compostos bioativos citados, RPCPs do gênero *Bacillus* podem aumentar a disponibilidade mineral de compostos como nitrogênio, fósforo e ferro nos solos após a colonização. O nitrogênio é um elemento essencial ao desenvolvimento vegetal e fator limitante em seu crescimento e produtividade por fazer parte de componentes essenciais como a clorofila, proteínas e ácidos nucleicos (Brentrup e Lammel 2016). Apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável, portanto, sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada assimilável. O nitrogênio atmosférico pode ser convertido em formas utilizáveis pelas plantas principalmente por meio da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN),

processo que envolve a conversão de nitrogênio a amônia por micro-organismos (Frache et al. 2009). Para a conversão, é necessária a atividade da nitrogenase, um complexo enzimático altamente conservado em estrutura, função e sequência de aminoácidos dentro de uma ampla gama filogenética que inclui as famílias bacterianas Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Actinobacteria e Chlorobi (Dos Santos et al. 2012). Espécies de rizobactérias do gênero *Bacillus*, incluindo *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis* foram reportadas como positivas para FBN com base na atividade da nitrogenase (Xie et al. 1998).

Após o nitrogênio, o elemento mineral essencial que mais frequentemente limita o crescimento das plantas é o fósforo (P), que é adquirido da solução do solo principalmente sob as formas H_2PO_4^- e HPO_4^- . O fósforo possui funções vitais no metabolismo vegetal por ser componente de ácidos nucleicos, fosfolipídios e do ATP (Rodríguez e Fraga 1999, Sashidhar e Podile 2010). Existem dois componentes de P no solo, fosfatos inorgânicos e orgânicos, e grande parte está presente em formas insolúveis não disponíveis para a nutrição vegetal. O P inorgânico ocorre no solo, em sua maioria, em complexos minerais insolúveis e não absorvíveis pelas plantas, alguns deles aparecendo após a aplicação de fertilizantes químicos. A matéria orgânica, por outro lado, é uma importante reserva de P imobilizado que corresponde a 20-80% do P no solo (Sharma et al. 2013). A conversão de fosfatos insolúveis (tanto orgânico quanto inorgânico) para uma forma acessível às plantas é uma importante característica de RPCPs para o incremento da produtividade vegetal. Esses organismos estão envolvidos na solubilização de formas inorgânicas de fosfatos pela produção de ácidos orgânicos, em especial o ácido glucônico (Sashidhar e Podile 2010), ou na mineralização de formas orgânicas de fosfatos pela degradação por enzimas conhecidas como fosfatases (Nannipieri et al. 2011).

O ferro (Fe) é o terceiro entre os nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal, principalmente devido a sua baixa solubilidade na maioria dos solos. Por ser cofator de diversas vias metabólicas, sua deficiência pode levar à disrupção de muitos processos bioquímicos, incluindo respiração, fotossíntese e fixação biológica de nitrogênio (Zuo e Zhang 2011) sendo, portanto, um elemento crucial para o adequado desenvolvimento vegetal. Apesar de sua abundância nos solos, o ferro é frequentemente indisponível às plantas e micro-organismos do solo por estar predominantemente na forma de Fe^{+3} , uma forma oxidada que reage para formar óxidos e hidróxidos insolúveis com biodisponibilidade limitada (Radzki et al. 2013). Algumas RPCPs possuem a habilidade de produzir e liberar sideróforos, compostos com menos de 2 kDa capazes de quelar Fe com alta afinidade e de maneira reversível (Neilands 1995). Sideróforos microbianos podem estimular o crescimento vegetal diretamente, por aumentar a aquisição de ferro pelas plantas que são capazes de reconhecer os complexos bacterianos sideróforo-ferro (Masalha et al. 2000), ou de forma indireta, por competitivamente inibir o crescimento de patógenos vegetais que possuam um sistema de aquisição de ferro menos eficiente (Beneduzi et al. 2012). Baseado em sua estrutura, sideróforos bacterianos têm sido classificados em quatro classes principais (carboxilatos, hidroxamatos, fenol catecolatos e pioverdinas) (Crowley 2006). Membros do gênero *Bacillus* produzem dois sideróforos em especial, bacillibactina e petrobactina (Wilson et al. 2006), ambos são sideróforos catecolatos.

As bases genéticas dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal acima citados têm sido estudadas e exploradas intensivamente nos últimos anos. Normalmente, esses mecanismos são o resultado de vários componentes genéticos presentes nos genomas bacterianos (Taghavi et al. 2010, Guo et al. 2015, Liu et al. 2016) que possivelmente foram selecionados devido à coevolução da interação com plantas (Bruto et al. 2014). O entendimento dos mecanismos moleculares da promoção de crescimento vegetal por RPCPs, incluindo a identificação de genes que contribuem com sua atividade benéfica é de suma importância para: i) disponibilizar novos genes de interesse para futura transformação de plantas e/ou outros micro-organismos e, ii) potencializar a aplicação de RPCPs como bioinoculantes em campo pelo estabelecimento de uma associação mais eficiente.

Sistemas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS, em inglês) oferecem uma possibilidade de investigar quais componentes genéticos bacterianos suportam as atividades de promoção de crescimento vegetal. Essas tecnologias evoluíram a partir do clássico sequenciamento de Sanger e têm se tornado acessíveis para pequenos laboratórios de pesquisa no mundo todo pela redução do custo por base sequenciada e do genoma como um todo (Pareek et al. 2011) e, em combinação com ferramentas de bioinformática, podem aumentar o conhecimento do potencial genético bacteriano (MacLean et al. 2009). A primeira bactéria promotora de crescimento vegetal Gram-positiva a ter o genoma completamente sequenciado foi *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, FZB42T em 2007 (Chen et al. 2007), depois, muitas sequências genômicas de linhagens de RPCPs do gênero *Bacillus* foram disponibilizadas (Guo et al. 2015, Niazi et al. 2014), fornecendo um número cada vez maior de informações para o estudo de sua biologia e compreensão dos mecanismos que governam a promoção de crescimento vegetal e a colonização por RPCPs desse gênero. No entanto, quando comparadas a outras RPCPs, como *Pseudomonas* spp. (Hernández-Salmerón et al. 2016, Chen et al. 2015), relativamente pouco se sabe sobre diferentes tipos de genes que regulam processos de promoção de crescimento desempenhados por *Bacillus* spp.

Bacillus sp. RZ2MS9 é uma linhagem bacteriana previamente isolada da rizosfera de guaranazeiro amazônico que promoveu expressivamente o crescimento de milho e soja em condições de casa de vegetação. Essa bactéria foi descrita como produtora de AIA, solubilizadora de fosfato, fixadora de nitrogênio e produtora de sideróforos *in vitro* (Batista 2012). Adicionalmente a esses mecanismos, no presente trabalho seu potencial de quimiotaxia em direção a raízes de milho foi testado *in vitro*. Dados os atributos benéficos de RZ2MS9, essa bactéria foi escolhida para melhor caracterização em nível genômico. Assim, o presente capítulo apresenta o *draft* do genoma da RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9, bem como as características genéticas potencialmente relacionadas a sua atividade promotora de crescimento.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Linhagem bacteriana

A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 pertence à coleção microbiana do laboratório de Genética de Micro-organismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, depositada também na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) sob o número de acesso CBMAI1824. Para ensaios experimentais, a bactéria foi rotineiramente crescida em meio de cultura Luria - Bertani (LB) (peptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹, ágar 15 g.L⁻¹), a 28°C.

2.2.2. Ensaio de quimiotaxia

Visando avaliar a capacidade de *Bacillus* sp. RZ2MS9 em ser atraído e se mover em direção às raízes de milho, a metodologia desenvolvida por Dennis et al. (2013) foi adaptada. Plantas de milho axênicas crescidas *in vitro*, foram obtidas a partir das sementes, híbrido P4285H (Pioneer®), previamente desinfetadas superficialmente (com álcool 70% e hipoclorito), germinadas em placas de petri com papel filtro umedecido e transferidas para frascos contendo meio MS (Murashige e Skoog 1962) até atingir aproximadamente 10 cm de altura (7 dias).

Uma suspensão bacteriana da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi obtida inoculando uma colônia pura da bactéria (previamente crescida em LB sólido) em *erlenmeyer*, contendo 100 mL de meio de cultura líquido LB, sendo agitado constantemente por aproximadamente 6 h a 28°C até atingir a fase log que corresponde a 1×10^8 UFC.mL⁻¹.

As plantas foram transferidas para dentro de seringas de 50 mL contendo 7 mL de tampão PBS (NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g; 1 L de água destilada; pH 7,4), o suficiente para encobrir suas raízes. O ensaio de quimiotaxia consistiu na submersão das pontas das seringas, contendo as plantas, na solução bacteriana de RZ2MS9, o chamado “Tratamento incubado” (Figura 1A). Dois controles foram utilizados, um “Controle não incubado”, em que pontas das seringas, com plantas, não foram submergidas na solução bacteriana (Figura 1B) e um “Controle incubado”, que consistiu na submersão das seringas, contendo apenas tampão, sem a planta, na solução bacteriana (Figura 1C). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 1. Ensaio de quimiotaxia utilizando seringas contendo solução tampão PBS, plantas de milho crescidas *in vitro* e solução bacteriana de *Bacillus* sp. RZ2MS9. A) “Tratamento incubado” consiste na submersão das pontas das seringas, contendo as plantas, na solução bacteriana, B) “Controle não incubado” onde as pontas das seringas, com plantas, não são submergidas na solução bacteriana e C) “Controle incubado” consiste na submersão das seringas, contendo apenas tampão, sem plantas, na solução bacteriana

Trinta minutos após a submersão das seringas do “Tratamento incubado” (A) e do “Controle incubado” (C), as mesmas foram suspensas e, para todos os tratamentos, o PBS contendo as células possivelmente atraídas pelas raízes de milho, foi retirado da seringa, diluído e espalhado até secagem em meio de cultura LB para posterior contagem de UFC.mL⁻¹. As médias de UFC.mL⁻¹ dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando o programa R (R Core Team 2014).

2.2.3. Condições de crescimento e extração de DNA

Uma única colônia pura de RZ2MS9, crescida em meio LB sólido, foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido e mantido *overnight* sob agitação a 27°C e 200rpm. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação e o DNA genômico bacteriano foi extraído utilizando o kit *DNeasy® blood and tissue* (Qiagen, USA) seguindo as recomendações do fabricante, analisado em gel de agarose (1%) e quantificado no Qubit ® 2.0 fluorometer (Life Technologies).

2.2.4. Sequenciamento, montagem, anotação e análises

O DNA de *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi enviado ao Centro de Genômica Funcional da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP, e sequenciado por meio da plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA), após a construção de bibliotecas *pair-end*, gerando fragmentos com tamanho médio de 250 pb.

O programa SPAdes (versão 3.8.1) foi utilizado para realizar o controle de qualidade dos dados brutos e também para obter a montagem final, com os parâmetros *--careful -k 21,33,55,77,99,127*. As sequências codificadoras de proteínas foram inicialmente determinadas usando a *NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline* (PGAAP) versão 3.3 (Tatusova et al. 2016) e as características gerais do genoma (rRNA, tRNA, CDS, etc) foram retiradas da anotação fornecida pelo GenBank. Genes com peptídeos-sinal foram preditos pelo SignalP 4.1 Server (Petersen et al. 2011). Anotações funcionais adicionais com as bases de dados biológicos COG (*Cluster of Ortholog Groups*) e KO (*KEGG Orthology*) foram realizadas agrupando os genes em grupos de ortólogos e categorias funcionais, utilizando os programas COGnitor e BlastKOALA, respectivamente. *Clusters* de produção de metabólitos secundários foram examinados usando o programa *Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell* (antiSMASH, <http://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Medema 2011).

2.2.5. Busca de genes relacionados aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal

Os genes anotados foram investigados visando a identificação de possíveis candidatos envolvidos em funções de promoção de crescimento vegetal. Foram utilizados como base genes descritos previamente na literatura e comprovadamente relacionados aos mecanismos de: quimiotaxia, motilidade, formação de biofilme, *quorum sensing*, produção de compostos orgânicos voláteis, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, além de outros genes de atividades benéficas relevantes às plantas.

2.2.6. Submissão dos dados

O *draft* genômico de *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi depositado nos bancos DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso MJBFB00000000. A versão descrita nesse trabalho é a versão MJBFB0100000.

2.3. Resultados

2.3.1. Ensaio de quimiotaxia

Um comportamento significativo de atração (quimiotaxia) da bactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 em direção às plantas milho foi comprovado utilizando a metodologia descrita. Uma média de 2×10^7 UFC.mL⁻¹ foram observadas no “Tratamento incubado”, enquanto o “Controle incubado” apresentou uma média de 4×10^6 UFC.mL⁻¹, cerca de 10 vezes menos UFC.mL⁻¹. Além disso, não houve crescimento bacteriano nas placas de LB do “Tratamento não incubado”. A diferença entre as médias do “Tratamento incubado” e do “Controle incubado” foi significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.3.2. Características gerais do genoma de *Bacillus* sp RZ2MS9

O sequenciamento do genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9 por meio da plataforma Illumina gerou aproximadamente 14 milhões de *reads paired-end* illumina com um tamanho médio de 250 pb. O *draft* genômico dessa linhagem é composto por 33 *contigs*, com N50 de 1.097.374 pb, conteúdo médio de G+C de 35,05 % e cobertura de 620 vezes. O genoma bacteriano possui um total de 5.297.692 pb e sua predição resultou em 5.332 CDSs com um tamanho médio de 826 pb, além de 377 proteínas preditas como secretadas, esses dados e outras informações relevantes encontram-se organizados na Tabela 1.

Tabela 1. Características gerais do *draft* genômico de *Bacillus* sp. RZ2MS9

Tamanho do genoma ¹ (pb)	5.297.692
Cobertura ¹ (vezes)	620
Conteúdo G+C ¹ (%)	35,05
Número de <i>contigs</i> ¹	33
N50 ¹ (pb)	1.097.374
Genes totais ²	5.332
Genes codificadores de proteínas ²	5.221
Tamanho médio de genes codificadores ² (pb)	826
rRNAs ²	45
tRNAs ²	102
Pseudogenes ²	111
Genes com peptídeo sinal ³	377
Número de genes codificadores com COGs atribuídos ⁴	4.299 (82%)
Número de genes codificadores com KOs atribuídos ⁵	2.365 (45%)
Número de acesso NCBI	NZ_MJBF01000001.1

¹ Retiradas das métricas de montagem fornecidas pelo SPAdes (versão 3.8.1).

² Retiradas da anotação fornecida pelo GenBank.

³ Preditos pelo SignalP 4.1 Server.

⁴ Distribuição em grupos ortólogos e categorias funcionais COG (*Cluster of Ortholog Groups*) utilizando o programa COGnitor

⁵ Distribuição em grupos ortólogos e categorias funcionais KO (*KEGG Orthology*) utilizando o programa BlastKOALA

Foram atribuídas funções a 4.299 (82%) genes oriundos da anotação do genoma de RZ2MS9, os quais foram categorizados em uma ou mais famílias funcionais COG. As categorias COG mais abundantes foram a E “metabolismo e transporte de aminoácidos”, representando 7,8 % do número total de genes codificadores de proteínas do genoma bacteriano, seguida de S “função desconhecida” (7,0 %), K “transcrição” (6,9 %), R “funções gerais” (6,4%), J “tradução” (6,4%) e G “metabolismo e transporte de carboidratos” (5,6 %). Essa análise revelou que, com exceção dos genes *housekeeping* e daqueles pouco caracterizados, 2 classes principais de genes funcionais se destacam: transporte e metabolismo de aminoácidos (E) e de carboidratos (G) representando 13,4% dos genes anotados do genoma (Figura 2).

Figura 2. Distribuição de sequências codificadoras de proteínas de RZ2MS9 (82%) em classes funcionais COG (*Cluster of Ortholog Groups*) fornecidas pelo programa COGnitor. A) Proporção de sequências codificantes em cada categoria COG, o percentual é baseado no número total de genes anotados no genoma bacteriano. As categorias funcionais A, B, W e Y correspondentes a funções eucarióticas foram omitidas; B) Lista das categorias COG e suas respectivas funções

2.3.3. Genes relacionados às características de promoção de crescimento vegetal por RZ2MS9

No *draft* genômico de *Bacillus* sp. RZ2MS9 foram identificados genes relacionado a algumas de suas habilidades já comprovadas *in vitro* como quimiotaxia e motilidade, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos, além de outras habilidades não avaliadas *in vitro* para essa linhagem, porém que podem estar envolvidas em sua capacidade de promover o crescimento vegetal segundo dados da literatura. Esses genes encontram-se organizados no Anexo 1 juntamente com seus códigos de acesso NCBI, tamanhos, nomes pelos quais serão tratados no trabalho, classes KO (KEGG) e COG.

Interessantemente, um total de 11 *clusters* gênicos potencialmente envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários foram identificados no genoma de RZ2MS9 (Tabela 2). Alguns desses *clusters* estão diretamente ligados à competição durante a colonização por serem relacionados à produção de compostos antimicrobianos como bacteriocinas. Adicionalmente, cinco *clusters* gênicos de biossíntese de metabólitos secundários foram preditos para terpeno, microcina, NRPs e ‘outros’, além dos *clusters* 5 e 6, preditos por dirigir a síntese de sideróforos do tipo bacillibactina e petrobactina, respectivamente.

Tabela 2. *Clusters* gênicos biossintéticos de metabólitos secundários de *Bacillus* sp. RZ2MS9 definidos pelo antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*)

<i>Cluster</i> gênico	Produto	<i>Contig</i> (N. acesso NCBI)	Localização do <i>cluster</i> gênico
<i>Cluster</i> 1	Terpeno	<i>Contig</i> 01 (MJBFB01000001)	555397 - 577250 nt
<i>Cluster</i> 2	NRP	<i>Contig</i> 01 (MJBFB01000001)	727178 - 776334 nt
<i>Cluster</i> 3	Bacteriocina	<i>Contig</i> 12 (MJBFB01000012)	548782 - 562647 nt
<i>Cluster</i> 4	Microcina	<i>Contig</i> 14 (MJBFB01000014)	1 - 1375 nt
<i>Cluster</i> 5	Sideróforo	<i>Contig</i> 23 (MJBFB01000023)	38917 - 88642 nt
<i>Cluster</i> 6	Sideróforo	<i>Contig</i> 23 (MJBFB01000023)	372795 - 386502 nt
<i>Cluster</i> 7	Bacteriocina	<i>Contig</i> 29 (MJBFB01000029)	65481 - 75729 nt
<i>Cluster</i> 8	NRP	<i>Contig</i> 29 (MJBFB01000029)	90107 - 137123 nt
<i>Cluster</i> 9	Outros	<i>Contig</i> 30 (MJBFB01000030)	114527 - 158108 nt
<i>Cluster</i> 10	NRP	<i>Contig</i> 31 (MJBFB01000031)	39667 - 105575 nt
<i>Cluster</i> 11	Bacteriocina	<i>Contig</i> 31 (MJBFB01000031)	209019 - 215457 nt

2.4. Discussão

Uma das maiores limitações relacionadas ao uso prático de micro-organismos benéficos às plantas visando uma agricultura sustentável é a inconsistência e variabilidade dos resultados obtidos em ensaios laboratoriais, casa de vegetação e campo, ou mesmo entre diferentes condições de campo, prejudicando o desenvolvimento de produtos microbianos comerciais formulados (Parnell et al. 2016). Dessa forma, micro-organismos-chave candidatos a formulações bioinoculantes necessitam de uma exploração aprofundada dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal, refinando sua utilização específica e maximizando seu potencial benéfico.

Apesar da extensiva literatura sobre os modos de ação de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs), as características moleculares exatas que definem uma RPCP eficiente permanecem obscuras. Diversas linhagens de RPCPs têm sido geneticamente caracterizadas nos últimos 20 anos, revelando as bases moleculares de pelo menos alguns de seus mecanismos. Esses estudos têm evidenciado que a maioria das linhagens carregam mais de uma propriedade benéfica à planta, podendo ser hipotetizado que o acúmulo de genes contribuindo (tanto direta quanto indiretamente) com a promoção de crescimento vegetal tenha sido selecionado pela interação dessas bactérias com as plantas ao longo da evolução (Bruto et al. 2014).

Os progressos obtidos em tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) como Illumina (Bennett 2004), fornecem uma ferramenta útil por contribuir com o aumento do conhecimento de fatores e mecanismos genéticos envolvidos nessa interação benéfica. Com o advento dessas tecnologias, sequências genômicas de muitas linhagens de RPCPs tornaram-se disponíveis (Chen et al. 2007; Gupta et al. 2014, Liu et al. 2016), auxiliando também futuros esforços de engenharia genética e metabólica de RPCPs.

O estudo do genoma da rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 visando a busca de genes relacionados a sua interação benéfica, como promotora de crescimento vegetal, é de suma importância para o entendimento de seus modos exatos de ação, sua ecologia, bem como o melhor entendimento de uma possível atividade sinérgica de genes. Um *draft* genômico, apesar de não consistir em um produto finalizado com ordem e acurácia nos pares de base, são economicamente vantajosos, mais rápidos de serem obtidos e possuem um grande valor para uma variedade de estudos pois a maioria dos genes do organismo encontram-se representados (Mardis et al. 2002). Nesse contexto, Mavromatis et al. (2012) compararam versões de *drafts* de genomas a suas versões finais e concluíram que o sequenciamento baseado

em Illumina é uma abordagem custo-efetiva por gerar *drafts* de genomas microbianos sem perda significativa de informação.

Um *draft* genômico também pode fornecer uma estimativa do número de genes, suas classificações, e suas relações com conjuntos de genes de outros organismos. Uma limitação é a relativa falta de ordem nos *contigs* e suas orientações em relação aos demais, o que pode dificultar principalmente estudos comparativos (Land et al. 2015). É claro que uma sequência genômica finalizada é o estado mais desejável para um genoma, no entanto, um *draft* pode fornecer inúmeras informações sobre a biologia do organismo. O importante é que haja o entendimento das implicações associadas a essa estratégia (Mardis 2002). Uma das implicações do presente trabalho é que não se pode excluir a possibilidade de existência de um mecanismo de promoção de crescimento pelo *Bacillus* sp. RZ2MS9 apenas pela não verificação de genes relacionados a esse mecanismo em seu *draft* genômico, que pode não ter sido detectado devido à montagem incompleta do genoma.

O *draft* genômico do *Bacillus* sp. RZ2MS9 é composto por 33 *contigs*, muito abaixo da média de 190 *contigs* observada nos *drafts* de genomas bacterianos depositados (Land et al. 2015), retratando sua boa qualidade. Genes plasmidiais não foram detectados e, portanto, não incluídos na montagem do genoma. A partir desse *draft* genômico, buscou-se o melhor entendimento da biologia e dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal proporcionada por RZ2MS9. Todos os genes citados a seguir serão tratados de acordo com seus nomes, que podem ser consultados no Anexo 1 para a busca de seu respectivo número de acesso NCBI. A descrição do produto de cada gene apresentado no Anexo 1 foi feita primeiramente com base na anotação fornecida pelo KEGG e quando o gene não foi identificado por essa base de dados biológicos, a anotação fornecida pelo COG foi utilizada.

De acordo com a análise da classificação funcional dos genes nas famílias COG, é possível observar que uma alta proporção de genes foi atribuída às categorias E e G, relacionadas ao metabolismo e transporte de aminoácidos e carboidratos, respectivamente, os quais estão entre os principais compostos exsudatos pelas raízes (Huang et al. 2014). Isso indica o potencial de RZ2MS9 em competir e sobreviver na rizosfera com outros organismos com vantagens para obtenção de nichos e nutrientes.

Bactérias aeróbicas formadoras de esporos como *Bacillus* spp. possuem a habilidade de colonizar uma variedade de solos e ambientes vegetais e estão entre as principais bactérias nesses ambientes. Sua característica de formação de endósporos e, portanto, de persistir por mais tempo no ambiente e em armazenamento, é uma grande vantagem sobre bactérias que não possuem esse atributo e tem ganhado crescente atenção visando a formulação de bioinoculantes (Toyota 2015).

A formação de endósporo se inicia quando uma célula bacteriana, geralmente induzida por condições ambientais adversas ou privação nutricional, se divide assimetricamente resultando em dois compartimentos geneticamente idênticos, mas morfológicamente distintos: uma “célula-mãe” e um “pré-esporo”. Esses compartimentos permanecem unidos brevemente pela parede externa da célula até que a célula-mãe “engole” o pré-esporo (processo de engolfamento), o qual reside como uma organela dupla ligada à membrana dentro do citosol da célula-mãe. O pré-esporo eventualmente amadurece em uma célula parcialmente desidratada, dormente, que é liberada para o ambiente quando a célula-mãe sofre lise celular programada (Tan e Ramamurthi 2014). Esse processo pode ser dividido em 5 fases principais, quatro das quais são regulados por fatores sigma específicos de esporulação. *Spo0A* é o regulador principal que desencadeia o início da formação de esporo e os loci *spo* codificam proteínas com papéis na formação do esporo e até na regulação do processo e esses são nomeados de acordo com o estágio no qual uma mutação no *locus* gênico bloqueou a esporulação (Errington 1993). Além disso, alguns genes *cot* são requeridos para a montagem da camada protetora de proteína ao redor do esporo, enquanto as proteínas SSPs (*small acid-soluble spore*

proteins) se ligam ao DNA do esporo protegendo-o de danos externos como a radiação UV. Sob condições ambientais e nutricionais favoráveis, a resistência do esporo e propriedades de dormência são revertidas por compostos químicos que atuam como germinantes, nesse caso, genes *ger* e *ynd* possuem papel crucial (Tan e Ramamurthi 2014, Errington 1993). Todos os genes citados acima foram encontrados no genoma de RZ2MS9 corroborando as evidências de que essa linhagem forma esporos em condições limitadas de nutrientes, o que potencializa seu uso em formulações inoculantes comerciais.

O ensaio para avaliação da capacidade de quimiotaxia realizado no presente trabalho é uma abordagem inédita, e que apesar de simples foi eficiente em comprovar que *Bacillus* sp. RZ2MS9 é atraído pelas plantas de milho, mais especificamente pelos exsudatos radiculares secretados nas raízes dessas plantas, já que foram detectadas aproximadamente 10 vezes mais células bacterianas nas seringas que continham as plantas, e que foram submersas na solução bacteriana, que o controle sem a planta, utilizado apenas para detectar movimentos randômicos de células em direção ao tampão PBS. Quimiotaxia e motilidade são importantes estratégias usadas por bactérias para se mover em direção a moléculas atraentes, permitindo-lhes alcançar nichos com altas concentrações de nutrientes, como a rizosfera (Allard-Massicotte et al. 2016). Fan et al. (2012) comprovaram que exsudatos de raízes de milho contribuem para quimiotaxia e motilidade de *B. amyloliquefaciens* FZB42. Adicionalmente, Rudrappa et al. (2008) demonstraram que o ácido L-málico secretado por raízes de *Arabidopsis* sinalizam seletivamente e recrutam a rizobactéria benéfica *B. subtilis* FB17.

Quimiotaxia bacteriana é desencadeada quando moléculas estimulantes (exsudatos radiculares) se ligam ao seu quimiorreceptor de superfície celular cognato, ou proteína quimiotática metil-aceptora (MCPs), gerando sinais que se comunicam com o motor flagelar (genes *mot*) através de uma série de proteínas de quimiotaxia (*che*) (Allard-Massicotte et al. 2016). Foram encontrados no genoma de RZ2MS9, 13 genes codificando MCPs e genes *che*, incluindo *cheA*, *cheR*, *cheV* e *cheY*. Além disso, o genoma dessa rizobactéria contém os genes *motA* e *motB*, envolvidos na rotação flagelar e 30 genes associados com biossíntese e montagem de componentes flagelares incluindo os loci *fli*, *flh* e *flg*. Essa situação é similar a encontrada em várias espécies de *Bacillus* spp. promotores de crescimento vegetal, por exemplo em *B. subtilis* XF-1 (Guo et al. 2015) e *B. amyloliquefaciens* SQR9 (Zhang et al. 2015).

Os exsudatos liberados pelas raízes elicitam respostas em diferentes organismos do solo, que podem ser atraídos e trazer variadas consequências ao hospedeiro, incluindo efeitos deletérios. Frente a isso, RPCPs desenvolveram algumas estratégias de competição com outras linhagens também atraídas em direção aos exsudatos (Podile et al. 2013) que inclui a produção e excreção de uma vasta gama de antibióticos não ribossomicamente sintetizados (NRPs) de amplo espectro e peptídeos antimicrobianos produzidos ribossomicamente (como as bacteriocinas) (Stein 2005). Essa competição por nutrientes e nichos radiculares ainda contribui indiretamente com a promoção de crescimento vegetal por ser um mecanismo de supressão de fitopatógenos (Kamilova et al. 2005).

Genes codificando vias biossintéticas responsáveis pela produção de metabólitos secundários normalmente ficam espacialmente próximos em uma certa posição do cromossomo e são referidos conjuntamente como “*cluster* gênico” (Medema et al. 2015). O genoma de RZ2MS9 apresenta 11 desses *clusters* gênicos para a biossíntese de metabólitos secundários, a maioria deles envolvida na produção de NRPs variados e não especificados (3 *clusters*) e na produção de bacteriocinas (3 *clusters*), proteínas ribossomicamente sintetizadas que exibem atividade contra micro-organismos da mesma espécie (espectro curto) ou entre gêneros (amplo espectro) (Scholz et al. 2014). Além disso, um *cluster* de biossíntese de terpeno, cujos papéis biológicos e ecológicos permanecem desconhecidos, e um *cluster* de biossíntese de microcina, que parece estar envolvida com atividade nematicida bacteriana (Tyc et al. 2016), foram

identificados e possivelmente esses compostos são algumas das “armas” empregadas por essa rizobactéria na acirrada competição por nichos e nutrientes rizosféricos.

Bactérias possuem um mecanismo complexo de comunicação celular, conhecido como *Quorum Sensing* (QS), que controla a expressão de certas funções de maneira dependente de densidade celular. Esse mecanismo confere uma vantagem competitiva à bactéria em ambientes onde ocorrem mudanças frequentes nas condições ambientais, como o solo, permitindo-lhes adaptar rapidamente e sobreviver (Podile et al. 2013). QS de Gram-positivas, como *Bacillus* spp., é baseado na produção e liberação de peptídeos autoindutores, enquanto de Gram-negativas é realizado através de moléculas autoindutoras N-acil-homoserina lactonas (AHLs), ou indutores tipo I (AI1). Existe ainda um terceiro sistema de QS que participa no comportamento intraespecífico, interespecífico e até entre diferentes gêneros bacterianos. Esse sistema envolve a produção de moléculas sinalizadoras autoindutoras tipo 2 (AI2), mediado pela atividade da enzima LuxS (Lombardía et al. 2006), cujo gene responsável por sua codificação foi encontrado no genoma de RZ2MS9. Pela detecção de moléculas autoindutoras em uma dada concentração, alcançada apenas com alta densidade populacional, a transcrição de certos genes regulados por esse mecanismo é induzida ou reprimida na bactéria. Existem muitos processos importantes envolvidos na promoção de crescimento vegetal por RPCPs regulados por sistemas QS, entre eles a esporulação, quimiotaxia e motilidade, produção de antibióticos, sideróforos e formação de biofilme (Liaqat et al. 2013, Turovskiy et al. 2007).

Rizobactérias são também capazes de detectar moléculas de QS produzidas por outras bactérias (Steidle et al. 2001) e por plantas (Teplitski et al. 2000), e até mesmo interferir no QS de outras bactérias do solo por degradação enzimática de autoindutores, em um processo conhecido como *Quorum Quenching* (QQ) (Dong et al. 2002, Podile et al. 2013). Um gene (*ablD*) que codifica uma AHL hidrolase (ou AHL lactonase), foi encontrado no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9. A presença dessa enzima pode permitir que RZ2MS9 clive a ligação lactona de AHLs por hidrólise e tenha vantagem competitiva sobre Gram-negativas no solo por interromper a comunicação das mesmas (Liu et al. 2005). Esse mecanismo tem sido explorado visando especialmente o biocontrole de patógenos de plantas. Por exemplo, Park et al. (2008) identificaram uma enzima potencial degradadora de AHL, AiiA, de *B. thuringiensis* que pode efetivamente atenuar a virulência da bactéria Gram-negativa *Erwinia carotovora* no sistema radicular de plantas de pimenta por QQ.

Outra etapa de colonização vegetal competitiva por RPCPs inclui a adesão à raiz que pode ocorrer por ligação não específica ou por firme ancoramento, que geralmente são possíveis graças a proteínas do tipo adesinas (pili e fimbrias), flagelinas e lipopolissacarídeos (Chen et al. 2015, Rodriguez-Navarro et al. 2007, Buell e Anderson 1992). No genoma de RZ2MS9 foram encontrados alguns genes envolvidos na formação de pili e fimbrias (*pil* e *fim*), também responsáveis pela motilidade por espasmos (Mattick 2002), genes envolvidos na produção de flagelinas (*fliC*), subunidades dos flagelos que possuem também um papel crucial no reconhecimento de plantas hospedeiras e não hospedeiras para RPCPs, e genes relacionados a lipopolissacarídeos (*lps*), que contribuem com a colonização radicular (Podile et al. 2013).

A adesão capacita a formação bacteriana de biofilmes, que são comunidades bacterianas em que as células são incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ligados a uma superfície (Hall-Stoodley et al. 2004). O biofilme não só fortalece a interação entre plantas e RPCPs e auxilia na competição contra micro-organismos deletérios, como também fornece ao sistema radicular uma barreira protetiva contra o ataque de organismos patogênicos (Guo et al. 2015). O principal EPS utilizado por espécies do gênero *Bacillus* nesses sistemas é o poli-gama-glutamato, geralmente codificado por genes *pgs* (Morikawa et al. 2006), também identificados no genoma de RZ2MS9. Uma observação interessante é que o gene *spo0A* citado anteriormente por regular a entrada na via de esporulação, é também requerido para os estágios iniciais de desenvolvimento do biofilme (Branda et al. 2004).

Após a colonização eficiente da planta, RPCPs utilizam compostos liberados nos exsudatos radiculares como os carboidratos e aminoácidos e, em troca, produzem e fornecem uma série de substâncias que podem favorecer o crescimento vegetal entre elas fitormônios, compostos orgânicos voláteis e poliaminas. Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), como 2,3-butanediol e seu precursor 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), são emitidos por algumas das mais eficientes RPCPs, incluindo *Bacillus* spp. (Ryu et al. 2003), sendo os COVs mais estudados. Esses compostos produzidos por RPCPs promovem o crescimento vegetal especialmente por estimular o sistema radicular (Gutiérrez-Luna et al. 2010) e aumentar a resistência sistêmica a doenças (Farag et al., 2013). Presentes no genoma de RZ2MS9 foram encontrados genes envolvidos nas vias biossintéticas desses dois COVs: os genes *alsS* e *alsD*, responsáveis por codificar as enzimas acetolactato sintase (ALS) e acetolactato descarboxilase (ALD), respectivamente. ALS catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato em acetolactato, e ALD converte o acetolactato em acetoína. Subsequentemente, a acetoína pode ser liberada pela bactéria ou ser convertida em 2,3- butanediol pela enzima (R,R)-butanediol desidrogenase (*bdh*) (Niazi et al. 2014). Esses resultados sugerem que a linhagem RZ2MS9 tem o aparato genético básico para a produção dos COVs mais envolvidos no efeito de promoção de crescimento vegetal. As RPCPs *Bacillus* UCMB5113 e *Bacillus* FZB42 também possuem esse conjunto de genes e seus efeitos benéficos no crescimento de plantas foram atribuídos especialmente à ação desses genes (Niazi et al. 2014, Chen et al. 2007). COVs produzidos por outra RPCP, o *B. subtilis* GB03, parecem ainda desencadear um processo de acidificação da rizosfera de *Arabidopsis*, o que pode auxiliar também na solubilização de fosfato (Zhang et al. 2007).

Poliaminas são polímeros orgânicos de baixo peso molecular que desempenham atividades reguladoras multifuncionais de processos fisiológicos das plantas, assim como os fitormônios (Kuznetsov et al. 2006). Espermidina é uma poliamina produzida por RPCPs que tem atraído atenção especial por estar relacionada com o desenvolvimento de raízes laterais (Hummel et al. 2002) e desempenhar um papel protetivo contra vários estresses vegetais, incluindo estresses oxidativos, ácidos e osmóticos, assim como aqueles causados por ataques de patógenos (Xie et al. 2014). Genes *speE*, que codificam espermidinas sintases, envolvidas diretamente na síntese de espermidinas, foram encontradas no genoma de RZ2MS9, assim como genes responsáveis pelo transporte dessa poliamina (genes *poI*).

Outro mecanismo importante por meio do qual RPCPs podem estimular o crescimento vegetal é através da atividade da enzima ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase), responsável por reduzir os níveis de etileno na planta resultando em raízes mais longas. Essa enzima catalisa a quebra de ACC, o precursor imediato de etileno em plantas, a α - cetobutirato e amônia, prevenindo/reduzindo a produção de níveis inibidores no crescimento vegetal de etileno (Glick et al. 2007). No entanto, o gene que codifica a enzima ACC desaminase (*acdS*) não foi encontrado no genoma de RZ2MS9.

Com relação ao aumento da disponibilidade de nutrientes do solo às plantas, RPCPs possuem papel fundamental nesse processo por apresentarem mecanismos que incluem a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos e produção de sideróforos. Esses mecanismos, em conjunto, auxiliam no suprimento da demanda por nutrientes que limitam fortemente o desenvolvimento vegetal: nitrogênio, fósforo e ferro, respectivamente, os quais têm sido foco de estudos há décadas.

Bacillus sp. RZ2MS9 foi descrito como positivo para Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em ensaios *in vitro* (Batista 2012). Esse processo geralmente requer genes, chamados conjuntamente de genes *nif*, envolvidos na síntese e ativação do complexo da nitrogenase, a enzima central desse processo, que é composta por duas metaloproteínas: uma responsável pela redução do substrato que contém ferro e molibdênio (MoFe-proteína) e outra responsável pela ligação ao ATP e doadora de elétrons que contém ferro (Fe-proteína) (Rees e Howard 2000). Em bactérias fixadoras de nitrogênio, genes *nif* são tipicamente encontrados em um *cluster* de aproximadamente 20–24 kb

com 7 *operons* codificando 20 diferentes proteínas (Glick 2012). No entanto, recentemente foi comprovado que pelo menos 9 desses 20 genes são essenciais para a biossíntese de uma nitrogenase ativa (Wang et al. 2013). O fluxo de elétrons através da nitrogenase no processo de FBN envolve ainda a redução da Fe-proteína por proteínas doadoras de elétrons (ferredoxinas e/ou flavodoxinas) (Haaker e Klugkist 1987). Assim, além dos genes *nif*, o processo de FBN requer genes envolvidos na ativação da Fe-proteína, na biossíntese do cofator ferro-molibdênio, na doação de elétrons e genes regulatórios da síntese e função da enzima (Bruto et al. 2014). No genoma de RZ2MS9, não foi detectado nenhum gene *nif*, porém o genoma apresenta genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na biossíntese e transporte do cofator molibdênio (*moa*, *mod* e *moë*), na biossíntese de ferredoxinas e flavodoxinas (*fer* e *fld*) e na regulação do processo de fixação biológica de nitrogênio (*fix*).

Sabe-se que a FBN é um processo que demanda muita energia e, portanto, fixadores de nitrogênio de vida livre apresentam significância agrônômica limitada comparada à fixadores simbióticos. Fixadores de nitrogênio de vida livre colonizam as superfícies das plantas e podem até invadir espaços intercelulares, no entanto, nenhuma estrutura especializada é formada e a amônia não pode ser diretamente transferida à planta. Assim, tem sido relatado que bactérias de vida livre promotoras de crescimento devem desempenhar seu efeito benéfico preferencialmente por outros mecanismos que não envolvam a FBN (Olivares et al. 2013).

Ainda com relação ao ciclo do nitrogênio, o processo de desnitrificação, uma forma alternativa de respiração na qual a bactéria reduz nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-) a N_2 quando as concentrações de oxigênio são limitadas (Olivares et al. 2013), também tem mostrado correlação positiva direta com a colonização da rizosfera (Ghirardi et al. 2012). As enzimas envolvidas na desnitrificação são nitrato, nitrito, óxido nítrico e óxido nitroso redutases, codificadas pelos genes *nar*, *nir*, *nor*, e *nos*, respectivamente (Olivares et al. 2013). Desse conjunto de genes, apenas o gene *nor* não foi identificado no genoma de RZ2MS9.

Estudo anterior também demonstrou a capacidade de RZ2MS9 em solubilizar fosfato inorgânico (Batista 2012). Formas inorgânicas de P são geralmente solubilizadas por RPCPs através da produção e excreção de ácidos orgânicos que, através de seus grupos hidroxilas e carboxilas, quelam cátions ligados ao fosfato convertendo-o em formas solúveis (Hanif et al. 2015). Alguns ácidos orgânicos produzidos por RPCPs envolvidos na solubilização de fosfatos são os ácidos málico, glioxálico, succínico, fumárico, tartárico, α -ceto-butírico, oxálico, cítrico, láctico, 2-cetoglucônico e glucônico (Ahmed e Shahab 2011) e genes como *ldh* (lactato desidrogenase), *idh* (isocitrato desidrogenase) e *sdh* (succinato desidrogenase) detectados no genoma de RZ2MS9 estão envolvidos na síntese de alguns deles (Kwak et al. 2016). No entanto, o ácido glucônico (GA) é reconhecidamente o principal ácido orgânico responsável pela solubilização de fosfatos minerais por RPCPs e sua síntese é catalisada pela holoenzima glicose desidrogenase (GDH) que, juntamente a seu cofator Pirrolo-Quinolina Quinina (PQQ), catalisa a oxidação extracelular direta de glicose em GA (Ahmed e Shahab 2011). Adicionalmente, PQQ tem sido reportado como um agente promotor de crescimento vegetal (Choi et al. 2008). O genoma de RZ2MS9 possui um gene responsável pela codificação da enzima GDH (gene *gdh*), no entanto, os genes *pqq* do cofator não foram detectados. Em adição, a aquisição de fosfato inorgânico pode ser promovida por um sistema de transporte de baixa afinidade por fosfato, Pit, e dois sistemas de transporte com alta afinidade por fosfato, Pst e Phn (Liu et al. 2016) detectados no genoma de RZ2MS9, assim como genes regulatórios do processo.

Além da solubilização de fosfatos inorgânicos detectado *in vitro* em RZ2MS9, essa bactéria parece ser capaz de mineralizar fosfatos orgânicos pela produção de fosfatases, mais especificamente fosfatases alcalinas cujos genes responsáveis por sua codificação, *alk*, foram identificados no genoma. Essas fosfatases são assim classificadas devido ao seu pH ótimo de atividade, sendo, portanto, mais abundantes em solos neutros ou alcalinos (Sharma et al. 2013).

Juntos, esses mecanismos de solubilização e mineralização do fosfato insolúvel (inorgânico e orgânico, respectivamente) do solo podem ser grandes responsáveis pelo efeito promotor de crescimento da rizobactéria RZ2MS9 devido à biodisponibilização desse elemento tão fundamental às plantas.

Por fim, as bases genéticas relacionadas ao mecanismo de produção de sideróforos detectado *in vitro* pelo *Bacillus* sp. RZ2MS9 (Batista 2012) foram investigadas. Dois *clusters* completos de produção de sideróforos do tipo petrobactina e bacillibactina foram detectados utilizando o programa antiSMASH, ambos no contig 23. Membros do gênero *Bacillus* spp., em especial do grupo de *Bacillus cereus*, são conhecidos por produzir e utilizar esses dois tipos de sideróforos (Wilson et al. 2006). A biossíntese de sideróforos é geralmente regulada por uma proteína ferro-sensível Fur (Ollinger et al. 2006), cujo gene responsável pela síntese também está representado no genoma de RZ2MS9. Uma estratégia adotada por micro-organismos na aquisição competitiva de ferro do solo inclui também a síntese de receptores de sideróforos produzidos por outros organismos (Liu et al. 2016). O genoma de RZ2MS9 contém distintos sistemas de aquisição de ferro (*fév*, *afu* e *feo*), sendo 29 transportadores de ferro do tipo ABC, alguns deles relacionados ao transporte de enteroquelinas, sideróforos sintetizados por *Enterobacteria*.

Como visto, a obtenção do genoma bacteriano do *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi importante por, além de disponibilizar genes de interesse para transformação de plantas ou de outros micro-organismos futuramente, fornecer uma série de informações moleculares, levando a um melhor entendimento sobre seu efeito benéfico. No entanto, a obtenção desses dados é somente a primeira etapa de um processo mais complexo, e somente uma análise funcional dos genes encontrados irá confirmar se as funções atribuídas a esses genes apresentam efeito significativo na interação RZ2MS9-plantas. Métodos para validação, envolvendo a deleção e/ou silenciamento de genes são cruciais para a correta identificação do papel dos produtos gênicos finais na interação e serão utilizados futuramente.

REFERÊNCIAS

- Ahmed N, Shahab S (2011). Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. *International Journal of Microbiology*, 9, 4408-4412.
- Allard-Massicotte R, Tessier L, Lécuyer F, Lakshmanan V, Lucier JF, Garneau D, Beaugregard PB (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *mBio*, 7, e01664-16.
- Bailly A, Weisskopf L (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 79-85.
- Batista BD (2012). Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba-SP, Brasil.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1044-1051.
- Bennett S (2004). Solexa ltd. *Pharmacogenomics*, 5, 433-438.
- Branda SS, González-Pastor JE, Dervyn E, Ehrlich SD, Losick R, Kolter R (2004). Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186, 3970-3979.
- Brentrup F, Lammel J (2016). Nitrogen use efficiency, nitrogen balance, and nitrogen productivity—a combined indicator system to evaluate nitrogen use in crop production systems. *Proceedings of the 2016 International Nitrogen Initiative Conference "Solutions to improve nitrogen use efficiency for the world"*, Melbourne, Australia.

- Bruto M, Prigent-Combaret C, Muller D, Moënne-Loccoz Y (2014). Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. *Scientific Reports*, 4, 6261.
- Buell CR, Anderson AJ (1992). Expression of the *aggA* locus of *Pseudomonas putida* in vitro and in planta as detected by the reporter gene, *xyIE*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 6, 331-340.
- Crowley DE (2006). Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. Springer Netherlands, 169-198.
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Junge H (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25, 1007-1014.
- Chen Y, Shen X, Peng H, Hu H, Wang W, Zhang, X (2015). Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data*, 4, 33-42.
- Choi O, Kim J, Kim JG, Jeong Y, Moon JS, Park CS, Hwang I (2008). Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology*, 146, 657-668.
- Dennis PG, Seymour J, Kumbun K, Tyson GW (2013). Diverse populations of lake water bacteria exhibit chemotaxis towards inorganic nutrients. *The ISME Journal*, 7, 1661-1664.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1754-1759.
- Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC, Dixon R (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, 13, 162.
- Errington J (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 57, 1-33.
- Fan B, Carvalhais LC, Becker A, Fedoseyenko D, von Wirén N, Borriss, R (2012). Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*, 12, 116.
- Farag MA, Zhang H, Ryu CM (2013). Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 1007-1018.
- Franché C, Lindström K, Elmerich, C (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321, 35-59.
- Ghirardi S, Dessaint F, Mazurier S, Corberand T, Raaijmakers JM, Meyer JM, Lemanceau P (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent pseudomonads. *Microbial Ecology*, 64, 725-737.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26, 227-242.
- Glick BR (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Guo S, Li X, He P, Ho H, Wu Y, He Y (2015). Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42, 925-937.
- Gupta A, Gopal M, Thomas GV, Manikandan V, Gajewski J, Thomas G, Gupta R (2014). Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *PLoS one*, 9, e104259.

- Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, de la Cruz HR, Macías-Rodríguez L (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, 51, 75-83.
- Haaker H, Klugkist J (1987). The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 46, 57-71.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95-108.
- Hanif K, Hameed S, Imran A, Naqqash T, Shahid M, Van Elsas JD (2015). Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Frontiers in Microbiology*, 6, 583.
- Hernández-Salmerón JE, Hernández-León R, Orozco-Mosqueda MDC, Valencia-Cantero E, Moreno-Hagelsieb G, Santoyo G (2016). Draft genome sequence of the biocontrol and plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. *Standards in Genomic Sciences*, 11, 5.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 15-25.
- Huang XF, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. *Botany*, 92, 267-275.
- Hummel I, Couée I, El Amrani A, Martin-Tanguy J, Hennion F (2002). Involvement of polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica*. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1463-1473.
- Kamilova F, Validov S, Azarova T, Mulders I, Lugtenberg B (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7, 1809-1817.
- Kanchiswamy CN, Malnoy M, Maffei ME (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6, 151.
- Kuznetsov VV, Radyukina NL, Shevyakova NI (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, 583.
- Kwak Y, Park GS, Shin JH (2016). High quality draft genome sequence of the type strain of *Pseudomonas lutea* OK2 T, a phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium. *Standards in Genomic Sciences*, 11, 51.
- Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Poudel S (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, 15, 141-161.
- Liaqat I, Saiyed IA, Nusrat J (2013). Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*. *International Journal of Microbiology Research and Reviews*, 1, 061-067.
- Liu W, Wang Q, Hou J, Tu C, Luo Y, Christie P (2016). Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Scientific reports*, 6, 26710.
- Liu D, Lepore BW, Petsko GA, Thomas PW, Stone EM, Fast W, Ringe D (2005). Three-dimensional structure of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone hydrolase from *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11882-11887.
- Lombardía E, Rovetto AJ, Arabolaza AL, Grau RR (2006). A LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 4442-4452.

- MacLean D, Jones JD, Studholme DJ (2009). Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 287-296.
- Mardis E, McPherson J, Martienssen R, Wilson RK, McCombie WR (2002). What is finished, and why does it matter? *Genome Research*, 12, 669-671.
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 433-439.
- Mattick JS (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, 56, 289-314.
- Mavromatis K, Land ML, Brettin TS, Quest DJ, Copeland A, Clum A, Cottingham RW (2012). The fast-changing landscape of sequencing technologies and their impact on microbial genome assemblies and annotation. *PLoS one*, 7, e48837.
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Breitling R (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39, W339-W346.
- Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, Cruz-Morales P (2015). Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nature Chemical Biology*, 11, 625-631.
- Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. *Microbiology*, 152, 2801-2807.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15, 473-497.
- Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in action*. Springer Berlin Heidelberg, 215-243.
- Neilands JB (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26723-26726.
- Niazi A, Manzoor S, Asari S, Bejai S, Meijer J, Bongcam-Rudloff E (2014). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113: a rhizobacterium that improves plant growth and stress management. *PLoS One*, 9, e104651.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 486-494.
- Ollinger J, Song KB, Antelmann H, Hecker M, Helmann JD (2006). Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 3664-3673.
- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52, 413-435.
- Park SJ, Park SY, Ryu CM, Park SH, Lee JK (2008). The role of *AiiA*, a quorum-quenching enzyme from *Bacillus thuringiensis*, on the rhizosphere competence. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1518-1521.
- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM, DiLeo MV (2016). From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785-786.

- Podile AR, Vukanti RVNR, Sravani A, Kalam S, Dutta S, Durgeshwar P, Rao VP (2013). Root colonization and quorum sensing are the driving forces of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth promotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 407-413.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 602-609.
- Radzki W, Mañero FG, Algar E, García JL, García-Villaraco A, Solano BR (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104, 321-330.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing (Version 3.0. 2). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rees DC, Howard JB (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 559-566.
- Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruíz-Saínz JE (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272, 127-136.
- Rodríguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17, 319-339.
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148, 1547-1556.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4927-4932.
- Sashidhar B, Podile AR (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1-12.
- Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang Z, He Y, Dietel K, Borriss R (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 196, 1842-1852.
- Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R (2015). Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and Fertility of Soils*, 51, 321-330.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587.
- Souza RD, Ambrosini A, Passaglia LM (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38, 401-419.
- Steidle A, Sigl K, Schuegger R, Ihring A, Schmid M, Gantner S, Langebartels C (2001). Visualization of N-acetylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5761-5770.
- Stein T (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 845-857.
- Taghavi S, Van Der Lelie D, Hoffman A, Zhang YB, Walla MD, Vangronsveld J, Monchy S (2010). Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genetics*, 6, e1000943.
- Tan IS, Ramamurthi KS (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, 6, 212-225.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Ostell J (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, gkw569.

- Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 637-648.
- Toyota K (2015). *Bacillus*-related spore formers: attractive agents for plant growth promotion. *Microbes and Environments*, 30, 205-207.
- Turovskiy Y, Kashtanov D, Paskhover B, Chikindas ML (2007). Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. *Advances in Applied Microbiology*, 62, 191-234.
- Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P (2016). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology*.
- Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, Zhang B, Dixon R (2013). A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 9, e1003865.
- Wilson MK, Abergel RJ, Raymond KN, Arceneaux JE, Byers BR (2006). Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348, 320-325.
- Xie G, Su B, Cui Z (1998). Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. *Acta Microbiologica Sinica*, 38, 480-483.
- Xie SS, Wu HJ, Zang HY, Wu LM, Zhu QQ, Gao XW (2014). Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 655-663.
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Paré PW (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 839.
- Zhang N, Yang D, Wang D, Miao Y, Shao J, Zhou X, Shen Q (2015). Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics*, 16, 685.
- Zou C, Li Z, Yu D (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *The Journal of Microbiology*, 48, 460-466.
- Zuo Y, Zhang F (2011). Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant and Soil*, 339, 83-95.

3. ESTUDO FILOGENÉTICO E COMPARATIVO DE *Bacillus* sp. RZ2MS9

RESUMO

O grupo *Bacillus cereus lato sensu* tem recebido grande atenção quanto a sua classificação taxonômica e filogenética por ser um grupo que envolve espécies geneticamente muito próximas, porém com fenótipos distintos de interesse tanto agrônomo (*B. thuringiensis*) quanto clínico (*B. cereus stricto sensu* e *B. anthracis*). Para a análise filogenética da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi adotado um método de tipagem utilizando o gene *pycA*, que codifica a enzima piruvato carboxilase, o qual reproduz de forma rápida e confiável a classificação por hibridização digital DNA:DNA (dDDH) baseada no método filogenético de *Genome-Blast Distance Phylogeny* (GBDP). Nessa análise, *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentou-se filogeneticamente distante do clado altamente monomórfico de *B. anthracis*, patógeno humano, e se afiliou a um grupo, aqui tratado como Clado RZ2MS9, composto por linhagens de *B. thuringiensis* (*Bt*) comercializadas como produtos biopesticidas há mais de 60 anos, sugerindo sua possibilidade de uso seguro no campo. Estudos comparativos dos genomas das bactérias do Clado RZ2MS9 mostraram que os genes envolvidos em mecanismos de promoção de crescimento vegetal detectados no genoma de RZ2MS9 estão também presentes nas demais linhagens desse clado, o que pode indicar que plantas possivelmente constituem um nicho de colonização dessas bactérias entomopatogênicas e que *Bts* utilizados para controle de lagartas podem possuir um efeito agrônomo adicional de promoção de crescimento vegetal ainda pouco investigado. A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 terá sua classificação mantida a fim de evitar confusão quanto ao seu efeito fenotípico em aplicações agrônomicas.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*; RPCP; *pycA*; Taxonomia

ABSTRACT

The *Bacillus cereus* group has received great attention regarding its taxonomic and phylogenetic classification because of being a group that involves genetically closely related species, but with distinct phenotypes of both agronomic (*B. thuringiensis*) and clinical (*B. cereus stricto sensu* and *B. anthracis*) interest. For the phylogenetic analysis of the plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. RZ2MS9, a typing method was adopted using the *pycA* gene, that encodes the enzyme pyruvate carboxylase, which reproduces rapidly and reliably the classification by DNA:DNA (dDDH) hybridization based on the phylogenetic method *Genome-Blast Distance Phylogeny* (GBDP). In this analysis, *Bacillus* sp. RZ2MS9 was phylogenetically distant from the highly monomorphic clade of *B. anthracis*, a human pathogen, and affiliated with a group, here called Clado RZ2MS9, composed of *B. thuringiensis* (*Bt*) strains marketed as biopesticides for more than 60 years, suggesting its possibility of safe use in the field. Comparative studies of Clado RZ2MS9 genomes showed that genes involved in mechanisms of plant growth promotion detected in the genome of RZ2MS9 are also present in the genomes of the other strains of this clade, which may indicate that plants possibly constitute a niche of colonization of these entomopathogenic bacteria, and that *Bts* used to control caterpillars may have an additional agronomic effect of plant growth promotion that has not yet been well investigated. The *Bacillus* sp. RZ2MS9 will have its classification maintained to avoid confusion regarding its phenotypic effect in agronomic applications.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; PGPR; *pycA*; Taxonomy

3.1. Introdução

Bacillus spp. representa um dos mais diversos gêneros na classe Bacilli, e engloba principalmente bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, em formato de bastonetes, Gram-positivas, com baixo conteúdo de G+C e formadoras de esporos (Joung e Côté 2002). Esse gênero compreende mais de 300 espécies com nomes publicados (<http://www.bacterio.net/bacillus.html>), fenotipicamente heterogêneas, com representantes exibindo uma ampla gama de requisitos nutricionais, condições de crescimento, diversidade metabólica e composições nas bases do DNA.

A classificação filogenética e taxonômica do gênero *Bacillus* é bastante complexa visto que as fronteiras das espécies dentro desse gênero, definidas atualmente por dados de sequências gênicas, nem sempre estão de acordo com os limites definidos pela sua ecologia. Assim, o atual desafio na taxonomia bacteriana em geral, e particularmente na taxonomia de *Bacillus* spp., é encontrar uma maneira sistemática de conciliar os dados moleculares com a ecologia para uma classificação válida e biologicamente significativa (Maughan e Van der Auwera 2011).

Linhagens que claramente ilustram o desacordo entre métodos de classificação molecular e fenotípico/ecológico em *Bacillus* spp. pertencem ao grupo *Bacillus cereus*. Esse grupo, também chamado *B. cereus lato sensu*, é um subgrupo do grupo *B. subtilis* na filogenia universal baseada em rRNA (Priest 1993) e contém oito espécies aprovadas muito relacionadas: *B. cereus (stricto sensu)*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis* (Patiño-Navarrete e Sanchis 2016). Entre as espécies desse grupo, *B. cereus (stricto sensu)*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* são de longe os mais extensivamente estudados, o que pode ser comprovado pelo número de estudos de sequenciamentos genômicos realizados atualmente, sendo que dos 578 genomas sequenciados dentro do grupo *B. cereus*, 541 pertencem a essas três espécies (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Apesar de essas espécies serem diferenciadas por características fenotípicas e propriedades patológicas, análises de dados genômicos tem mostrado que elas são proximamente relacionadas, tanto em conteúdo genético quanto em sintenia (Liu et al. 2015, Helgason et al. 2000), e as sequências de seus genes 16S rRNA compartilham mais de 99% de similaridade (Ash et al. 1991), de modo que foi proposto que elas fossem considerados uma única espécie com base nessas evidências genéticas (Helgason et al. 2000), mas nenhum consenso sobre isso ainda foi alcançado.

As características fenotípicas típicas dessas espécies consistem na codificação de genes localizados em plasmídeos (Thomas et al. 2000; Van der Auwera et al. 2007). *B. thuringiensis* é definido pela presença de plasmídeos carregando genes *cry* codificadores de toxinas proteicas cristalinas com propriedades inseticidas inofensivas a humanos sendo, portanto, comercializado como biopesticidas com grande potencial de atacar insetos-praga de lavouras (Schnepf et al. 1998). *B. anthracis* causa a doença aguda, e muitas vezes letal, conhecida como anthrax e carrega dois grandes plasmídeos codificando os dois principais fatores patogênicos: pXO1 (codificando o complexo de toxina anthrax) e pXO2 (codificando uma cápsula) (Leppla 2006), enquanto *B. cereus (stricto sensu)* carrega, também em um plasmídeo, os genes *ces*, determinantes genéticos de uma toxina emética (cereulide) que pode causar síndromes de intoxicação alimentar (Hoton et al. 2005).

No entanto, essa classificação baseada em plasmídeos é evidentemente inviável, visto que esses elementos genéticos podem ser perdidos e são altamente móveis, especialmente entre as espécies do grupo *B. cereus lato sensu* (Van der Auwera et al. 2007). Recentemente, métodos genotípicos têm sido comumente aplicados para diferenciar membros desse grupo. Essas abordagens incluem análises de genes *housekeeping* únicos, como *gyrB* (Chen e Tsen 2002) ou múltiplos de cinco a sete genes *housekeeping* concatenados (*Multi Locus Sequencing Typing* - MLST) (Helgason et al. 2004). Apesar de essas abordagens fornecerem *insights* na diversidade genética e relações filogenéticas do grupo *B. cereus*, elas

ainda são incapazes de fornecer uma conclusão convincente. Assim, até hoje, a filogenia e taxonomia de bactérias desse grupo bacteriano estão sob intensa discussão e controvérsia (Okinaka e Keim 2016).

Liu et al. (2015) determinaram afiliações taxonômicas de linhagens do grupo *B. cereus lato sensu* depositadas no NCBI utilizando uma abordagem baseada em sequência genômica completa por *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP). Essa técnica moderna utiliza um método filogeneticamente confiável de hibridização digital DNA:DNA (dDDH). O resultado dessa análise por GBDP foi comparado com a filogenia baseada em sequências de genes 16S rRNA e no método MLST. Os resultados indicaram que a técnica GBDP foi capaz de separar claramente as linhagens em 30 grupos e que a filogenia baseada em sequências 16S rRNA não foi suficiente para diferenciá-las dentro desses grupos devido a sua alta conservação. No entanto, a técnica de MLST com 20 genes concatenados foi consistente com o resultado de GBDP e, ainda, um método rápido de tipagem foi proposto usando o gene *pycA*, que codifica a enzima piruvato carboxilase, o qual reproduziu a classificação proposta com base em GBDP.

Entre as diferentes espécies de *Bacillus* spp., membros do grupo *B. subtilis*, incluindo *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. sonorensis* e *B. tequilensis* têm sido identificados pela sua capacidade de promover o crescimento vegetal (Hossain et al. 2015). Entretanto, até nosso conhecimento, existem poucos relatos sobre a habilidade de representantes do grupo *Bacillus cereus lato sensu*, particularmente de espécies de *B. thuringiensis* (Qi et al. 2016, Kassogué et al. 2016), de agir como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs). Nesse sentido, um estudo comparativo entre a RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 e organismos proximamente relacionados, os quais pertencem à espécie *B. thuringiensis*, pode responder questões sobre a interação dessas espécies bacterianas com plantas, especialmente através da análise da presença/ausência e composição de genes envolvidos nos mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Dessa forma, o presente capítulo teve como objetivo realizar a análise filogenética da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 de acordo com o método rápido de tipagem utilizando o gene *pycA* proposto por Liu et al. (2015). Para essa análise, foram utilizados genomas completamente sequenciados e disponibilizados no NCBI das espécies de *B. cereus stricto sensu*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*. Além disso, visando observar se as características relacionadas à promoção de crescimento vegetal discutidas no Capítulo 2 estão também presentes nas espécies mais proximamente relacionadas ao *Bacillus* sp. RZ2MS9, foi analisada a distribuição de genes envolvidos nesses mecanismos usando análises comparativas. Por fim, a composição das sequências de aminoácidos dos produtos de três genes-chave dos mecanismos de solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de AIA, *gdh*, *fur* e *ipdC* respectivamente, foi comparada entre as linhagens proximamente relacionadas.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Seleção dos genomas e coleta dos dados

Os genomas utilizados para as análises filogenéticas foram aqueles pertencentes ao grupo *B. cereus* completamente sequenciados e disponíveis no banco de dados do NCBI em Agosto de 2016. Eles correspondem a 105 linhagens do grupo *B. cereus (lato sensu)* e incluem 31 sequências de *B. cereus (stricto sensu)*, 32 sequências de *B. thuringiensis* e 42 sequências de *B. anthracis*. A linhagem *Bacillus subtilis* 6051-HGW foi utilizada como *outgroup* (Anexo 2). Sequências nucleotídicas do gene *pycA* (*pyruvate carboxylase*, 3447 pb) foram recuperadas do *draft* genômico do *Bacillus* sp. RZ2MS9 (N. acesso OGY05819.1) e dos genomas dos organismos apresentados no Anexo 2 para a análise filogenética.

3.2.2. Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi montada com os genes *pycA* recuperados dos genomas dos organismos apresentados no Anexo 2. As sequências nucleotídicas foram alinhadas usando o MEGA6.06 (Tamura et al. 2013), por meio da ferramenta Clustal W (Thompson et al. 1994). A árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou e Nei 1987) e as distâncias genéticas foram estimadas de acordo com o modelo Kimura de dois parâmetros (Kimura 1980), onde todas as substituições foram incluídas em cálculos de distância *pairwise*. A confiabilidade de cada topologia de árvore foi avaliada usando 1.000 réplicas de *bootstrap*. A versão final da árvore filogenética foi editada usando o *software* TreeGraph 2 (Stöver e Müller 2010).

3.2.3. Estudos comparativos

O *Bacillus* sp. RZ2MS9, juntamente com os organismos do clado relacionado a ele, serão conjuntamente tratados como “Clado RZ2MS9” no presente trabalho. Com as sequências genômicas recuperadas do NCBI desses organismos, foram realizadas anotações funcionais utilizando as bases de dados biológicos COG (*Cluster of Ortholog Groups*) e KO (*KEGG Orthology*). Assim, os genes foram categorizados em grupos de ortólogos e categorias funcionais, através dos programas COGNITOR e BlastKOALA, respectivamente, de modo a padronizar a anotação funcional com aquela realizada com os genes de RZ2MS9, apresentada no Capítulo 2. *Clusters* de produção de metabólitos secundários foram examinados e recuperados dos genomas do Clado RZ2MS9 usando o programa *Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH)*, <http://antismash.secondarymetabolites.org/> (Medema et al. 2011). Os genes selecionados envolvidos nos mecanismos de interação com a planta foram manualmente buscados nas anotações de cada um dos organismos do clado em questão. Alinhamentos entre as proteínas codificadas pelos genes *gdb*, *fur* e *ipdC* das linhagens desse clado foram analisados através do *software* MEGA6.06 (Tamura et al. 2013). O alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *ipdC* foi gerado usando o T-Coffee (Notredame et al. 2000) e representado graficamente com o programa Boxshade versão 3.21. Esses programas encontram-se disponíveis, respectivamente, em: <http://tcofee.crg.cat/apps/tcofee/do:regular> e http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.

3.3. Resultados

3.3.1. Análise filogenética

Na árvore filogenética construída utilizando o gene *pycA* dos organismos estudados, o *Bacillus* sp. RZ2MS9 ficou estreitamente relacionado a um clado composto por sete bactérias, todas classificadas como *Bacillus thuringiensis* (Figura 3). *Bacillus* sp. RZ2MS9 juntamente com essas sete linhagens proximamente relacionadas compõem o “Clado RZ2MS9”, conforme mencionado anteriormente. Pode-se observar, ainda, que todas as linhagens classificadas como *Bacillus anthracis* se agruparam em um clado altamente homogêneo, identificado na Figura 3 como “Clado *B. anthracis*” e que linhagens de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* encontram-se misturadas dentro dos demais clados filogenéticos, sem um limite claro de distinção.

Figura 3. Árvore filogenética baseada nos genes *pycA* (piruvato carboxilase, 3447 pb) recuperados dos genomas do *Bacillus* sp. RZ2MS9 e de linhagens de *B. thuringiensis* (32 sequências), *B. cereus* (31 sequências) e *B. anthracis* (42 sequências) disponíveis no banco de dados do NCBI. O alinhamento, pela ferramenta ClustalW, e a construção da árvore filogenética foram realizados com o *software* MEGA6.06, utilizando o método Neighbor-Joining (NJ). As distâncias genéticas foram estimadas de acordo com o modelo Kimura de dois parâmetros e a confiabilidade de cada topologia de árvore foi avaliada usando 1.000 réplicas de *bootstrap*. A versão final da árvore foi editada com o *software* TreeGraph 2. A linhagem *Bacillus subtilis* 6051-HGW foi utilizada como *outgroup* e os números de acesso de todos os organismos podem ser consultados no Anexo 2

3.3.2. Estudos comparativos

Informações relevantes sobre as sequências genômicas dos organismos pertencentes ao Clado RZ2MS9 encontram-se representados na Tabela 3 e seus números de acesso podem ser consultados no Anexo 2. O tamanho total dos genomas desses organismos varia de 5,3 Mpb a 6,8 Mpb, com conteúdos de G+C muito similares, entre 34,91% e 35,29%.

Tabela 3. Informações genômicas das linhagens pertencentes ao Clado RZ2MS9 utilizadas nos estudos comparativos

Linhagem	Tamanho do cromossomo	Tamanho total do genoma (pb)	Conteúdo G+C (%) do cromossomo	Nº de plasmídeos	Nº total de genes	tRNA	rRNA
RZ2MS9 ¹	5.297.692	5.297.692	35,05	00	5.221	102	45
HD73 ²	5.646.799	5.908.575	35,19	07	6.169	104	36
YBT-1520 ³	5.602.565	6.580.536	34,91	11	6.720	099	39
HD-1 ⁴	5.631.672	6.767.044	34,92	13	6.928	095	41
HD-29 ⁵	5.701.188	6.742.233	34,96	10	6.903	115	42
YC-10 ⁶	5.675.007	6.784.135	35,29	09	6.028	107	39
YWC2-8 ⁷	5.674.369	6.227.942	35,29	06	6.253	094	15
Bc601 ⁸	5.630.000	6.114.170	35,30	06	5.931	107	39

¹ *Bacillus* sp. RZ2MS9, informações retiradas do Capítulo 2, presente trabalho

² *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, Zhu et al. 2015a

³ *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, Zhu et al. 2015a

⁴ *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, Zhu et al. 2015a

⁵ *B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, Zhu et al. 2015a

⁶ *B. thuringiensis* YC-10, Cheng et al. 2015

⁷ *B. thuringiensis* YWC2-8, Zhu et al. 2016

⁸ *B. thuringiensis* Bc601, Jia et al. 2016

Os genes dos organismos do Clado RZ2MS9 (entre 77 e 82%) foram categorizados nas famílias funcionais COG. O percentual de genes de cada linhagem atribuído a cada categoria COG está representado na Figura 4. Pode-se observar que essa distribuição funcional em categorias COG parece ser bastante conservada entre as linhagens comparadas, especialmente dentro das categorias que compõem os processos celulares e sinalização. Além disso, excluindo as categorias envolvendo genes *housekeeping* e aqueles pouco caracterizados, duas categorias (E - transporte e metabolismo de aminoácidos e G - transporte e metabolismo de carboidratos) parecem ser principalmente representadas em todos os isolados analisados.

Figura 4. À esquerda, distribuição de sequências codificadoras de proteínas das linhagens pertencentes ao Clado RZ2MS9 em classes funcionais COG (*Cluster of Ortholog Groups*) fornecidas pelo programa COGnitor. O número em cada quadrado representa o percentual arredondado de atribuição de sequências codificantes em cada categoria. O percentual de genes categorizados de cada linhagem está apresentado, entre parênteses, após o nome do isolado, essa proporção é baseada no número total de genes no genoma bacteriano. As categorias funcionais A, B, W e Y correspondentes a funções eucarióticas foram omitidas. À direita, lista das categorias COG e suas respectivas funções. ¹*Bacillus* sp. RZ2MS9, ²*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, ³*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, ⁴*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, ⁵*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, ⁶*B. thuringiensis* YC-10, ⁷*B. thuringiensis* YWC2-8, ⁸*B. thuringiensis* Bc601

O *software* antiSMASH encontrou de 9 a 11 *clusters* de biossíntese de metabólitos secundários nos genomas dos organismos do Clado RZ2MS9, sendo que todos eles apresentaram *clusters* de biossíntese dos sideróforos do tipo petrobactina e bacillibactina, além do antibiótico bacteriocina e NRPs não especificados. O *cluster* relacionado a síntese de terpeno não foi detectado no genoma de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520 e apenas no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi detectado um *cluster* para biossíntese de microcina (Figura 5). Os *clusters* relacionados à biossíntese dos sideróforos do tipo petrobactina e bacillibactina foram recuperados das linhagens do Clado RZ2MS9 através do antiSMASH e organizados graficamente na Figura 6.

Figura 5. Distribuição dos *clusters* de biossíntese de metabólitos secundários nos genomas dos organismos do Clado RZ2MS9 de acordo com o antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*). Quadrados pretos indicam a presença do *cluster* e os brancos indicam sua ausência

Figura 6. *Clusters* relacionados à biossíntese de sideróforo do tipo petrobactina (A) e bacillibactina (B) recuperados dos genomas do Clado RZ2MS9 através do programa antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*). Cores iguais em linhagens diferentes indicam o mesmo gene. Genes de cor branca representam genes não relacionados com *clusters* de metabólitos secundários. ¹*Bacillus* sp. RZ2MS9, ²*B. thuringiensis* YC-10, ³*B. thuringiensis* YWC2-8, ⁴*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, ⁵*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, ⁶*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, ⁷*B. thuringiensis* Bc601, ⁸*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29

Genes-chave envolvidos nos mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizobactérias, discutidos no Capítulo 2 do presente trabalho, foram analisados quanto à presença/ausência nos genomas das linhagens do Clado RZ2MS9. Todos os genes buscados foram detectados em todas as linhagens desse clado (Tabela 4). No entanto, a proporção de representantes genéticos dos genes *spo*, envolvido na esporulação, *mcp*, de quimiotaxia, e de genes de transportadores envolvidos nos mecanismos de solubilização de fosfato e produção de sideróforo foram levemente divergentes entre as linhagens. Os genes *spo0A*, *luxS*, *albD*, *alsD*, *bdb*, *gdb* e *fur* se mostraram conservados quanto ao tamanho dentre as espécies bacterianas analisadas, apenas no gene *ipdC*, uma pequena discrepância quanto ao tamanho foi observada.

Tabela 4. Mecanismos bacterianos relevantes na promoção de crescimento vegetal e distribuição de genes-chave envolvidos em cada mecanismo entre os organismos do Clado RZ2MS9

Mecanismo	Genes	RZ2MS9 ¹	HD73 ²	YBT1520 ³	HD-1 ⁴	HD-29 ⁵	YC-10 ⁶	YWC2-8 ⁷	Bc601 ⁸
Esporulação	<i>spo0A</i> (264)	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>spo</i>	46	46	43	44	45	44	45	45
Quimiotaxia	<i>mcp</i>	13	13	14	15	18	15	13	13
	<i>che</i>	6	6	6	6	6	6	6	6
Quorum sensing	<i>luxS</i> (157)	+	+	+	+	+	+	+	+
Quorum quenching	<i>albD</i> (250)	+	+	+	+	+	+	+	+
Compostos orgânicos voláteis	<i>alsS</i>	5	5	5	5	5	5	5	5
	<i>alsD</i> (252)	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>bdb</i> (350)	+	+	+	+	+	+	+	+
Solubilização de fosfato	<i>gdb</i> (261)	+	+	+	+	+	+	+	+
	Transportadores	12	12	12	12	14	12	12	12
Produção de sideróforo	<i>fur</i> (151)	+	+	+	+	+	+	+	+
	Transportadores	41	41	42	41	47	40	41	41
Produção de AIA	<i>trp</i>	7	7	7	7	7	7	7	7
	<i>ipdC</i>	+(561)	+(558)	+(558)	+(558)	+(558)	+(558)	+(558)	+(561)

¹*Bacillus* sp. RZ2MS9, ²*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, ³*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, ⁴*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, ⁵*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, ⁶*B. thuringiensis* YC-10, ⁷*B. thuringiensis* YWC2-8, ⁸*B. thuringiensis* Bc601. Os números entre parênteses indicam o tamanho dos genes (em pares de bases), + indica a presença do gene no genoma

A composição das sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *gdb*, envolvida no mecanismo de solubilização de fosfato, *fur*, relacionada ao controle do mecanismo de produção de sideróforo, e *ipdC*, envolvida em uma via de produção de AIA, foi analisada e comparada entre as correspondentes dos organismos do Clado RZ2MS9. Alinhamentos de 100% de identidade foram obtidos entre as sequências de aminoácidos da proteína Fur dos oito organismos e entre os aminoácidos da proteína Gdh dos mesmos, no entanto, com relação à proteína Ipdc, em *Bacillus* sp. RZ2MS9, 15 aminoácidos (2,7%) não corresponderam às sequências das demais proteínas dos organismos do clado, que alinharam com 100% de identidade entre elas (Figura 7).

RZ2MS9	1	MIHKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
Bc601	1	MIHKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
YWC2-8	1	---MKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
YC-10	1	---MKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
HD-29	1	---MKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
YBT-1520	1	---MKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
HD-1	1	---MKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
HD73	1	---MKKQYTVSTYLLDRLHELGLIEHIFGVPGDYNLAFLDDVVAHKNLKWIGNCNELNAAAYADGYARIKIGIAALITTFGVGELSAINGIA
consenso	1	*****
RZ2MS9	91	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
Bc601	91	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
YWC2-8	88	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
YC-10	88	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
HD-29	88	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
YBT-1520	88	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
HD-1	88	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
HD73	88	GSYAEHVPVIKITGTPPTKIMENGAI VHHTLGDGKDFHFSNMYREITIAQTNVTP EHA AEEIDRVLRACWNEKRPVHINLPIDVYNKPIN
consenso	91	*****
RZ2MS9	181	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
Bc601	181	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
YWC2-8	178	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
YC-10	178	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
HD-29	178	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
YBT-1520	178	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
HD-1	178	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
HD73	178	KPTEPIILNKPILSNKETLDMKLLHATSIINNAKPKVILADFEVDRFHAKESLHQFVEKTGFPIATFSMGKGIFPEKHPQFIGVYTG DVSS
consenso	181	*****
RZ2MS9	271	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
Bc601	271	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
YWC2-8	268	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
YC-10	268	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
HD-29	268	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
YBT-1520	268	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
HD-1	268	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
HD73	268	PYLKRKRIDESDCIISIGVKLTDITGGFTQGFTEQVIEIHPYTVKIIDKKYGPVVMQDVLQHLSDSIEHRNKDITLDVKPFIFILETSPFTE
consenso	271	*****
RZ2MS9	361	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
Bc601	361	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
YWC2-8	358	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
YC-10	358	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
HD-29	358	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
YBT-1520	358	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
HD-1	358	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
HD73	358	EFNPKAQMVTKQRFWQQMYHFLQENDVLIVEQGTFFFGSAAIPLPNNAYVGQPLWGSIGYTLPALLTQLANLSRRNIIIGDGSFQVT
consenso	361	*****
RZ2MS9	451	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
Bc601	451	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
YWC2-8	448	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
YC-10	448	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
HD-29	448	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
YBT-1520	448	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
HD-1	448	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
HD73	448	AQELSTILRQNLKPIIFLINNNGYTVERAIHGQNQLYNDIQMWDYNKLSMIFGSEEKSLTFKVENAEALAEATLVNIIFNKNQLIFIEVIM
consenso	451	*****
RZ2MS9	541	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
Bc601	541	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
YWC2-8	538	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
YC-10	538	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
HD-29	538	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
YBT-1520	538	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
HD-1	538	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
HD73	538	SQSDQPELLAKLGRFGQONS
consenso	541	*****

Figura 7. Alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *ipdC* das linhagens do Clado RZ2MS9. RZ2MS9 corresponde ao *Bacillus* sp. RZ2MS9 (N. acesso GenBank da proteína: OGY01885.1), Bc601 (*B. thuringiensis* Bc601, acesso: AMX77331.1), YWC2-8 (*B. thuringiensis* YWC2-8, acesso: ALL59570.1), YC-10 (*B. thuringiensis* YC-10, acesso: AKJ56914.1), HD-29 (*B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, acesso: AJA18749.1), YBT-1520 (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* YBT-1520, acesso: AHZ51336.1), HD-1 (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1, acesso: AIE33749.1) e HD73 (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD73, acesso: AGE78276.1). As seqüências foram obtidas do banco de dados do NCBI, alinhadas utilizando o T-Coffee e exibido por BoxShade. Preto e cinza indicam aminoácidos idênticos e similares, respectivamente

3.4. Discussão

A classificação taxonômica e filogenética do grupo *B. cereus lato sensu* tem recebido grande atenção por envolver espécies de grande interesse agrônomo (*B. thuringiensis*) proximamente relacionadas a agentes causais de doenças em humanos e animais (*B. cereus* e *B. thuringiensis*) (Savini 2016). A alta similaridade entre as sequências genômicas desses organismos indicam que eles deveriam ser classificados como uma única espécie do ponto de vista genético (Helgason et al. 2000). No entanto, essas três espécies são classificadas como distintas devido à grande relevância de suas diferenças fenotípicas (uma descrição fenotípica ainda é um elemento mandatório em uma proposta de espécie válida), as quais são codificadas por plasmídeos, elementos genéticos que podem ser facilmente perdidos ou trocados entre as bactérias (Van der Auwera et al. 2007) e que, comprovadamente, não servem como assinaturas de nenhuma dessas espécies (Liu et al. 2015). Assim, tentativas de classificação utilizando sequências genômicas têm tentado chegar a um consenso sobre a classificação de espécies do grupo *B. cereus*.

O método de tipagem com o gene *pycA* foi adotado no presente trabalho por reproduzir de forma rápida a classificação por hibridização digital DNA:DNA (dDDH) baseada no método filogenético de *Genome-Blast Distance Phylogeny* (GBDP) que calcula distâncias intergenômicas de forma confiável (Liu et al. 2015). A grande vantagem dessa classificação é a separação de todas as linhagens de *B. anthracis* em um clado altamente monomórfico, ou seja, que mostra poucas variações genéticas (Van Ert et al. 2007). Assim, pode-se classificar ou não um isolado como *B. anthracis* de acordo com sua filiação a esse clado. Uma hipótese para essa distinção genética de *B. anthracis* é que provavelmente seus genes cromossômicos tenham co-evoluído com os plasmídeos de virulência e sido adaptados especificamente aos possíveis ambientes hospedeiros desse grupo, que inclui os humanos (Kolsto et al. 2009).

As linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*, cujas sequências genômicas completas encontram-se disponíveis no banco de dados do NCBI, foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, onde o *Bacillus* sp. RZ2MS9 ficou filogeneticamente distante do clado monomórfico de *B. anthracis* e proximamente relacionado a um clado composto por sete linhagens, todas classificadas como *B. thuringiensis*, compondo o “Clado RZ2MS9”. *Bacillus thuringiensis*, comercialmente chamados de *Bt*, possuem atividade inseticida por carregarem plasmídeos contendo os genes *cry* que codificam proteínas cristalinas tóxicas a insetos suscetíveis. Essa espécie é explorada comercialmente para produção de biopesticidas usados a mais de 60 anos (Argôlo-Filho e Loguercio 2013, Sanchis e Bourguet 2008). Assim, é de conhecimento geral que linhagens dessa espécie ocorram na natureza essencialmente associadas a insetos, apresentando um ciclo entomopatogênico no qual a ingestão dos esporos e toxinas cristalinas levam à morte do inseto suscetível, seguida da germinação do esporo bacteriano, replicação celular dentro da larva morta até que os nutrientes sejam consumidos e liberação dos esporos subsequentemente formados no ambiente (Schnepf et al. 1998).

Sub-espécies de *Bt* representam cerca de 98% de biopesticidas pulverizáveis atualmente no mundo todo (Lacey et al. 2015). Produtos contendo toxinas específicas para lepidópteros são os mais encontrados no mercado pois a maioria dos bioinseticidas à base de *Bt* usados para controlar pragas agrícolas são formulados com as linhagens HD-1 e HD73, da subespécie *kurstaki* (*Btk*), que tem alta toxicidade sobre essa classe. Os produtos Dipel® e Javelin®, formulados com essas linhagens, tem grande destaque no mercado mundial (López et al. 2011). Linhagens similares de *Btk* têm sido também utilizados como biopesticidas efetivos para controle de lepidópteros, *Btk* YBT-1520 por exemplo é comercializado no produto Mianfeng® na China (Zhu et al. 2015a). O Clado RZ2MS9 inclui essas três linhagens de *Btk* comerciais citadas, além da sub-espécie *B. thuringiensis* serovar *galleriae* HD-29, também utilizada em formulação de biopesticida comercial (Zhu et al. 2015b). A proximidade do *Bacillus* sp. RZ2MS9 com essas linhagens sugere a possibilidade de liberação de seu uso comercial agrônomo. Outras três linhagens do clado também foram

descritas pelo potencial de controle de pragas: *Bt* YC-10 (Cheng et al. 2015), *Bt* YWC2-8 (Zhu et al. 2016) e *Bt* Bc601 (Jia et al. 2016) devido às proteínas codificadas pelos seus plasmídeos.

Classificações funcionais COG dos genes das oito linhagens do Clado RZ2MS9 apresentaram distribuição similar, com exceção da classe COG X, onde estão incluídos genes de transposons, ao qual nenhum gene proveniente do genoma do *Bacillus* sp RZ2MS9 foi atribuído. A sequência genômica de RZ2MS9, a única do clado que ainda não está finalizada, provavelmente não inclui transposons por serem elementos altamente repetitivos, as principais causas de não fechamento de genomas provenientes de sequenciamentos em plataformas que geram *reads* curtos, como Illumina (Ricker et al. 2012). A abundância de classes relacionadas ao transporte e metabolismo de aminoácidos e carboidratos nas linhagens de *B. thuringiensis* do clado RZ2MS9 sugere que esses genes também desempenhem papéis significativos na ecologia dessas linhagens.

Clusters responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários incluindo sideróforos do tipo petrobactina e bacillibactina, bacteriocinas e NRPs não especificados foram detectados em todos os genomas do Clado RZ2MS9. Tanto bacillibactina quanto petrobactina têm sido isolados de membros patogênicos e não patogênicos do grupo *B. cereus lato sensu* (Koppisch et al. 2008). Pela análise comparativa dos *clusters* de biossínteses desses sideróforos, pode-se observar uma variação significativa em suas composições de linhagem para linhagem, não claramente ligada a suas possíveis adaptações ecológicas por colonizarem diferentes nichos. Bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos, também costumam ser identificadas em membros do grupo *B. cereus lato sensu*, especialmente em *B. cereus stricto sensu* e *B. thuringiensis* (Xin et al. 2015) e podem aumentar a adaptação ambiental. No entanto, um *cluster* de biossíntese de microcina foi detectado apenas no genoma de RZ2MS9. A microcina plantazolicina, produzida pela bactéria promotora de crescimento *B. amyloliquefaciens* FZB42 tem sido descrita como um importante fator contra nematoides, reduzindo ovos em raízes, larvas juvenis no solo e galhas de plantas em tomates (Liu et al. 2013). Essa potencial propriedade nematicida de RZ2MS9, será investigada com mais detalhes futuramente.

Bacillus sp. RZ2MS9 foi originalmente isolado de rizosfera de guaranazeiro e os genes envolvidos em mecanismos de promoção de crescimento vegetal discutidos no Capítulo 2 são característicos de espécies que possuem uma interação ecológica altamente evoluída com plantas (Dimkpa et al. 2009, Compant et al. 2010). Recentemente, tem sido inferida a possibilidade de que linhagens de *Bt* não sejam exclusivamente associadas a insetos (Vidal-Quist et al. 2013), visto que representantes dessa espécie têm sido continuamente detectados na rizosfera (Hendriksen e Hansen 2002) e em uma variedade de espécies de plantas (Vidal-Quist et al. 2009, Bizzarri e Bishop 2007).

As propriedades dos genomas das bactérias do Clado RZ2MS9, como tamanho, número de genes codificados no cromossomo, conteúdo de G+C, número de tRNAs e rRNAs são bastante similares, mesmo sendo o genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9 representado ainda em forma de *draft* de sequência. Além disso, todos os genes envolvidos na interação benéfica com as plantas exibidos pela bactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 e discutidos no Capítulo 2 foram detectados em todos os genomas dos organismos do Clado RZ2MS9, com pequenas dissimilaridades quanto a frequência de alguns genes entre os genomas e na composição da proteína codificada pelo gene *ipdC* em relação às proteínas IpdC dos demais organismos. IpdC pertence a uma família de enzimas que exibe alta conservação, visto que a substituição de apenas alguns aminoácidos no sítio ativo pode deslocar a afinidade primária para outro substrato (Grady et al. 2016), ela está envolvida em uma via biossintética do fitormônio ácido indol acético, e será discutida em detalhes no Capítulo 4. Estudos de homologia em sequências dessa proteína tem demonstrado identidade de mais de 96% entre linhagens, inclusive aquelas com diferentes ecologias (Bruto et al. 2014), assim como a identidade (97,3%) observada na análise comparativa entre as linhagens do Clado RZ2MS9 para essa proteína.

As informações apresentadas suportam a ideia de que a interação entre *B. thuringiensis* e insetos não seja exclusiva e que essas linhagens mantiveram genes de interação com plantas ao longo da evolução. De fato, apenas recentemente a hipótese de interação entre bactérias *Bt* entomopatogênicas e plantas foi comprovada por Vidal-Quist et al. (2013), que trouxeram a noção de que essa interação pode ser um fator importante na sua ecologia e prevalência na natureza e que, mesmo que as plantas não representem o nicho ecológico preferencial de *Bts* utilizados para o biocontrole, provavelmente elas sejam um veículo para alcançar outros nichos para multiplicação e dispersão, e por isso esses genes foram mantidos evolutivamente.

Os estudos filogenéticos e comparativos do presente trabalho envolvendo a rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus* sp. RZ2MS9 e as linhagens comerciais de *B. thuringiensis* proximamente relacionadas nos levam a inferir que: primeiramente, pode-se excluir a filiação filogenética da linhagem RZ2MS9 com linhagens da espécie *B. anthracis*, altamente patogênicas a humanos; além disso, a proximidade do RZ2MS9 com linhagens de *Bt* comercializadas há anos sugere sua possibilidade de uso seguro no campo; ainda, linhagens de *Bt* entomopatogênicas podem possuir um potencial uso agrônomo adicional de promoção de crescimento vegetal não explorado, já que, na maioria das vezes, apenas efeitos sobre lagartas são observados nos experimentos envolvendo *Bt*, e não o efeito dessa bactéria sobre as plantas; por fim, *Bacillus* sp. RZ2MS9 pode ser filogeneticamente classificado como *B. thuringiensis*, no entanto, para evitar confusão quanto ao efeito fenotípico dessa bactéria em aplicações agrônomicas iremos manter sua classificação como *Bacillus* sp.

De fato, recentemente tem crescido as evidências sobre o potencial de linhagens de *Bt* em estimular o crescimento vegetal através de mecanismos diversos. Raddadi et al. 2008 reportaram pela primeira vez o potencial benéfico de linhagens *Bt* sobre o crescimento vegetal por exibirem determinantes genéticos de diversos mecanismos, incluindo a produção de Ácido Indol Acético (AIA), influência no balanço de etileno vegetal, aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, como o fosfato, e produção de sideróforos. Um estudo recente (Kassogué et al. 2016) demonstrou o efeito benéfico de três linhagens de *Bt* isoladas de solos agrícolas sobre a germinação de sementes de milho e sobre o vigor da planta. As linhagens testadas também mostraram diversos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal. Qi et al. 2016 provaram que *B. thuringiensis* linhagens AS17 *japonensis* e AS18 *kurstaki* podem aumentar a taxa de germinação de sementes de tomate e alongamento do seu caule através do tratamento de sementes tanto com filtrado bacteriano quanto com bactérias em suspensão, porém não foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito.

B. thuringiensis tem demonstrado um potencial benéfico em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo não leguminosas, como *Amaranthus viridis*, *Ocimum tenuiflorum*, *Abelmoschus esculentus* e *Capsicum annuum*, que tiveram incrementos significativos de crescimento pela aplicação combinada das linhagens *B. thuringiensis* A5-BRSC e *B. megaterium* ATCC 9885 (Bandopadhyay 2015), ou em leguminosas como a soja, na qual a linhagem *Bacillus thuringiensis* KR1 quando co-inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* SB1 (Mishra et al. 2009) apresentou efeito benéfico. Além disso, linhagens de *Bt* podem exibir atividade de biocontrole contra fungos (Sadfi et al. 2001, Gomaa 2012) e bactérias fitopatogênicas (Dong et al. 2004, Vidal-Quist et al. 2013), beneficiando indiretamente o crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

Argôlo-Filho RC, Loguerio LL (2013). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*, 5, 62-91.

- Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 343-346.
- Bandopadhyay S (2015). Effect of dual inoculation of plant growth promoting rhizobacteria on different non-leguminous plants under pot condition. *Indian Journal of Microbiology Research*, 2, 20-26.
- Bizzarri MF, Bishop AH (2007). Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94, 38-47.
- Bruto M, Prigent-Combaret C, Muller D, Moëgne-Loccoz Y (2014). Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. *Scientific Reports*, 4, 6261.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- Cheng F, Wang J, Song Z, Cheng JE, Zhang D, Liu Y (2015). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YC-10, a novel active strain against plant-parasitic nematodes. *Journal of Biotechnology*, 210, 17-18.
- Chen ML, Tsen HY (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 912-919.
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32, 1682-1694.
- Dong YH, Zhang XF, Xu JL, Zhang LH (2004). Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 954-960.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15, 203.
- Gomaa EZ (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology*, 50, 103-111.
- Helgason E, Økstad OA, Causant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Kolstø AB (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2627-2630.
- Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Causant DA, Kolstø AB (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 191-201.
- Hendriksen NB, Hansen BM (2002). Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 256-261.
- Hossain MJ, Ran C, Liu K, Ryu CM, Rasmussen-Ivey CR, Williams MA, Kloepper JW (2015). Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 631.
- Hoton FM, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology*, 151, 2121-2124.
- Jia N, Ding MZ, Gao F, Yuan YJ (2016). Comparative genomics analysis of the companion mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Bc601 and *Bacillus endophyticus* Hbe603 in bacterial consortium. *Scientific Reports*, 6.
- Joung KB, Côté JC (2002). Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 97-108.

- Kassogu A, Dicko AH, Traor D, Fan R, Valicente FH, Babana AH (2016). *Bacillus thuringiensis* strains isolated from agricultural soils in mali tested for their potentiality on plant growth promoting traits. *British Microbiology Research Journal*, 14, 1-7.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kolst AB, Tourasse NJ, kstad OA (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annual Review Of Microbiology*, 63, 451-476.
- Koppisch AT, Dhungana S, Hill KK, Boukhalfa H, Heine HS, Colip LA, Hersman LE (2008). Petrobactin is produced by both pathogenic and non-pathogenic isolates of the *Bacillus cereus* group of bacteria. *Biometals*, 21, 581-589.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41.
- Leppla SH (2006). *Bacillus anthracis* toxins. *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 323-347.
- Liu Y, Lai Q, Gker M, Meier-Kolthoff JP, Wang M, Sun Y, Shao Z (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5, 14082.
- Liu Z, Budiharjo A, Wang P, Shi H, Fang J, Borriss R, Huang X (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97, 10081-10090.
- Lpez , Fernndez-Bolaos JG, Kraus GA (Eds.). (2011). *Green trends in insect control* (No. 11). Royal Society of Chemistry.
- Maughan H, Van der Auwera G (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 789-797.
- Medema MH, Blin K, Cimerman P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Breitling R (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39, W339-W346.
- Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, Kundu S, Shankar Gupta H (2009). Enhanced soybean (*Glycine max* L.) plant growth and nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*-SB1 in presence of *Bacillus thuringiensis*-KR1. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 59, 189-196.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302, 205-217.
- Okinaka RT, Keim P (2016). The phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *Microbiology spectrum*, 4.
- Patio-Navarrete R, Sanchis V (2016). Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Research in Microbiology*.
- Priest FG (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria* (pp. 3-16). American Society of Microbiology.
- Qi J, Aiuchi D, Tani M, Asano SI, Koike M (2016). Potential of entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as plant growth promoting rhizobacteria and biological control agents for tomato *Fusarium* Wilt. *International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)*, 2.
- Raddadi N, Cherif A, Boudabous A, Daffonchio D (2008). Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Annals of Microbiology*, 58, 47-52.
- Ricker N, Qian H, Fulthorpe RR (2012). The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. *Genomics*, 100, 167-175.

- Sadfi N, Cherif M, Fliss I, Boudabbous A, Antoun H (2001). Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 101-117.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sanchis V, Bourguet D (2008). *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 11-20.
- Savini V (Ed.). (2016). *The Diverse Faces of Bacillus Cereus*. Academic Press.
- Schnepf E, Crickmore NV, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Dean DH (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 775-806.
- Stöver BC, Müller KF (2010). TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*, 11, 7.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Thomas DJI, Morgan JAW, Whipps JM, Saunders JR (2000). Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 118-124.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, Kachur SM (2007). Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PloS one*, 2, e461.
- Van der Auwera GA, Timmerly S, Hoton F, Mahillon J (2007). Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 164-172.
- Vidal-Quist JC, Rogers HJ, Mahenthiralingam E, Berry C (2013). *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 474-489.
- Vidal-Quist JC, Castañera P, González-Cabrera J (2009). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 749-759.
- Xin B, Zheng J, Xu Z, Song X, Ruan L, Peng D, Sun M (2015). The *Bacillus cereus* group is an excellent reservoir of novel lanthipeptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1765-1774.
- Zhu L, Peng D, Wang Y, Ye W, Zheng J, Zhao C, Yu Z (2015a). Genomic and transcriptomic insights into the efficient entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Scientific Reports*, 5, 14129.
- Zhu J, Zhang Q, Cao Y, Li Q, Zhu Z, Wang L, Li P (2016). The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *Hailuosis* YWC2-8. *Journal of Biotechnology*, 219, 38-39.
- Zhu L, Tian LJ, Zheng J, Gao QL, Wang YY, Peng DH, Sun M (2015b). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* strain HD-29, a typical strain of commercial biopesticide. *Journal of Biotechnology*, 195, 108-109.

4. *Bacillus* sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO E ALTERA A ARQUITETURA DO SISTEMA RADICULAR DE TOMATEIRO MICRO-TOM POR MEIO DE MECANISMO DEPENDENTE DE AUXINA

RESUMO

A maioria, se não todas, atividades fisiológicas das plantas é regulada por fitormônios. Em adição às plantas, muitas bactérias são também capazes de sintetizar e/ou modular o nível de alguns fitormônios incluindo a auxina Ácido Indol Acético (AIA), sendo esse o mecanismo mais comumente utilizado para explicar os efeitos positivos de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP). A produção de AIA pela RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi sugerida como um dos mecanismos relacionados ao seu expressivo efeito promotor de crescimento vegetal. No presente estudo, genes envolvidos nas vias biossintéticas do triptofano, o precursor desse fitormônio, e do AIA foram detectados no *draft* genômico de RZ2MS9, sugerindo que sua produção ocorra através da via IPA (indol-3-piruvato). Além disso, a influência do período de incubação da bactéria e da concentração do triptofano na produção do AIA produzido por RZ2MS9 foi comprovada. A incorporação de plantas-modelo para o estudo da interação plantas-bactérias tem mostrado grande potencial na investigação de mecanismos moleculares envolvidos na promoção de crescimento vegetal por RPCPs. Dessa forma, plantas de tomate anão Micro-Tom (MT) e seu mutante Δdgt , defeitivo na sensibilidade a auxinas, foram utilizadas para caracterizar os efeitos da inoculação de *Bacillus* sp. RZ2MS9 na promoção de crescimento vegetal. A inoculação de RZ2MS9 causou inibição no crescimento da raiz primária, seguida de aumento no comprimento de raízes laterais, resultando em aumento na área superficial total de raízes de plantas MT, efeitos característicos daqueles proporcionados por auxinas. Esse incremento radicular refletiu, ainda, em aumento da biomassa da parte aérea de plantas MT. Os mesmos efeitos não foram observados em plantas Δdgt , insensíveis a auxinas, sugerindo que a eliciação de promoção de crescimento em tomate anão MT por *Bacillus* sp. RZ2MS9 é associado à sua produção de AIA.

Palavras chaves: Plantas-modelo; *diageotropica*; RPCPs; AIA

ABSTRACT

Most, if not all, physiological activities of plants are regulated by phytohormones. In addition to plants, many bacteria are also able to synthesize and/or modulate the level of some phytohormones, including the auxin Indole Acetic Acid (IAA), which is the mechanism most commonly used to explain the positive effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). The production of IAA by the PGPR *Bacillus* sp. RZ2MS9 has been suggested as one of the mechanisms related to its expressive plant growth promoting effect. In the present study, genes involved in the biosynthetic pathways of tryptophan, the precursor of this phytohormone, and IAA were detected in the draft genome of RZ2MS9, suggesting that its production occurs via the IPA (indol-3-pyruvate) pathway. In addition, the influence of bacterial incubation period and concentration of tryptophan on the production of IAA produced by RZ2MS9 has been proven. The incorporation of model plants for the study of plant-bacteria interaction has shown great potential in the investigation of molecular mechanisms involved in plant growth promotion by PGPRs. Thus, Micro-Tom (MT) dwarf tomato plants and their mutant Δdgt , impaired in auxin sensitivity, were used to characterize the effects of *Bacillus* sp. RZ2MS9 in promoting plant growth. The inoculation of RZ2MS9 caused inhibition in the primary root growth, followed by increase in lateral root length, resulting in increased roots total surface area of MT plants, characteristic effects of those provided by auxins. This root growth also reflected in an increased biomass of MT plants shoot. The same effects were not observed in Δdgt plants, insensitive to auxins, suggesting that the elicitation of growth promotion in dwarf tomato MT by *Bacillus* sp. RZ2MS9 is associated with its production of IAA.

Keywords: Model plants; *diageotropica*; PGPR; IAA

4.1. Introdução

A produção bacteriana de hormônios vegetais, como as auxinas, exerce um importante papel na promoção de crescimento vegetal induzida por Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) (Patten e Glick 1996). Uma grande proporção (80%) de bactérias que colonizam a rizosfera têm sido relatadas como positivas para a produção desses hormônios (Zakharova et al. 1999) porém, somente mais recentemente, estudos apresentando linhagens de micro-organismos produtoras de auxinas pertencentes ao gênero *Bacillus* foram conduzidos (Shao et al. 2015a, Wahyudi et al. 2011). Dessa forma, o efeito de fitormônios produzidos por RPCPs desse gênero, apesar de ser cada vez mais associado ao seu potencial promotor de crescimento vegetal (Ali et al. 2009, Idris et al. 2007), ainda não é bem entendido (Shao et al. 2015b). A síntese de AIA por bactérias associadas às plantas é provavelmente uma das causas mais importantes de promoção de crescimento e produtividade em várias culturas, tendo alguns trabalhos demonstrado que a produção de auxinas, ao invés de fixação biológica de nitrogênio, é o principal fator responsável pelo crescimento da planta (Bloembergen e Lugtenberg, 2001, Steenhoudt e Vanderleyden 2000). *Bacillus* spp. possuem a habilidade de produzir endósporos tolerantes ao calor e dissecação e, por isso, possuem diversas vantagens sobre outras RPCPs, especialmente com relação à sobrevivência ao estresse severo do campo e à facilidade de armazenamento e dispersão de formulações comerciais (Toyota 2015). A produção de auxina e a formação desses endósporos por *Bacillus* spp. oferecem uma boa oportunidade de uso dessas características na promoção de crescimento vegetal e uma estratégia promissora de desenvolvimento de inoculantes bacterianos.

O Ácido-3-Indol-Acético (AIA) é a auxina produzida por bactérias mais abordada na literatura e desempenha um importante papel auxiliando na formação de raízes laterais, particularmente em dicotiledôneas, e na indução da formação de raízes adventícias em monocotiledôneas (McSteen 2010). A função do AIA exógeno está relacionada ao alongamento das células por estimular a síntese da parede celular ou desinibir a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da mesma, resultando em aumento da plasticidade da membrana (Bergfeld et al. 1988). Acredita-se que seu efeito benéfico para o crescimento e morfologia da raiz seja pelo maior acesso à água e nutrientes do solo. Do ponto de vista mutualístico, bactérias sintetizam auxinas visando perturbar processos fisiológicos vegetais em seu próprio benefício (Shih-Yung 2010), pois com uma maior área de entrada de nutrientes, aumenta-se também a área de exsudação radicular, havendo mais nutrientes disponíveis para essas bactérias (Etesami et al. 2015).

O AIA é um metabólito derivado de muitas vias dependentes e independentes de seu principal precursor, o aminoácido L-triptofano (Trp), o qual é formado a partir do corismato em uma série de etapas metabólicas codificadas pelos genes *trp* (Crawford 1975) (Figura 8). Quatro vias biossintéticas dependentes de Trp e uma independente de Trp têm sido propostas para a biossíntese de AIA. Mais de uma dessas vias podem estar presentes em uma bactéria (Patten e Glick 1996) e a maioria dos caminhos mostram semelhança com as vias descritas em plantas, embora alguns intermediários possam diferir (Spaepen e Vanderleyden 2011) (Figura 8).

Figura 8. Visão geral, compilada de Patten e Glick (1996) e Spaepen e Vanderleyden (2011), das vias biossintéticas de L-triptofano e ácido-3-indol-acético (AIA) em plantas e bactérias. Linhas pontilhadas indicam etapas pouco caracterizadas ou etapas intermediárias omitidas. Em preto, via biossintética do precursor L-triptofano (Trp), formado a partir do corismato pelos genes *trp*. Vias dependentes do Trp: em amarelo, via IAN (indol-3-acetonitrila), em azul, via IAM (indol-3-acetamida), em vermelho, via IPA (indol-3-piruvato) e em verde, via TRM (triptamina); via independente de Trp: em cinza

A via do IAM (Indol-3-Acetamida) é a via mais bem caracterizada em bactérias. Ocorre principalmente em fitopatógenos, sendo atribuída sua virulência à alta produção de AIA, mas também em bactérias fixadoras de nitrogênio como as do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Sekine et al. 1988, Spaepen e Vanderleyden 2011). A via consiste em duas etapas distintas: na primeira etapa, a enzima Trp mono-oxigenase (codificada pelo gene *iaaM*) converte Trp em IAM, na segunda etapa, IAM é hidrolisado à AIA e amônia por uma IAM hidrolase (codificada pelo gene *iaaH*) (Figura 8).

A via do IPA (Indol-3-Piruvato) é a principal via em plantas, sendo também demonstrada em bactérias promotoras de crescimento vegetal como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, alguns fitopatógenos e até mesmo em cianobactérias sendo, portanto, a via mais generalizada (Spaepen e Vanderleyden 2011). A via consiste em 3 etapas: na primeira etapa o precursor Trp é transaminado à IPA pela enzima aminotransferase, em seguida, IPA é descarboxilado a indol-3-acetaldeído (IAAld), o qual é então oxidado a AIA por uma desidrogenase (Figura 8). A etapa de descarboxilação do IPA é catalisada pela enzima-chave IPA descarboxilase (codificada pelo gene *ipdC*). A importância dessa enzima na via IPA, e consequentemente na biossíntese do AIA, tem sido demonstrada em diversos trabalhos onde sua inativação resultou em redução significativa da produção final de AIA (Patten e Glick 2002a, Hussain et al. 2015).

Na via da Triptamina (TRM), o Trp é primeiro descarboxilado à TRM por uma Trp descarboxilase e a TRM é diretamente convertida a IAAld por uma amina oxidase (Figura 8). Em bactérias, a atividade de enzimas intermediárias dessa via foi detectada há muito tempo em *Bacillus cereus* e *Azospirillum* (Perley e Stowe 1966, Hartmann et al. 1983). Por fim, na via IAN (Indol-3-Acetonitrila), mais comum em plantas, ocorre a conversão de IAN à AIA por meio da enzima nitrilase ou por uma via de duas etapas envolvendo a conversão inicial de IAN à indol-3-acetamida por uma nitrila hidratase, seguida de sua hidrólise à AIA por uma amidase. As rotas para produção de IAN ainda não são bem entendidas, podendo depender do Trp, onde ocorre a formação de Indol-3-Acetaldoxima (IAOx) que se

converte em IAN, ou então derivar do precursor antranilato, sem passar pelo Trp como intermediário (Patten e Glick 1996) (Figura 8). Com relação à via independente de Trp, tem sido proposto que os precursores dessa via sejam indol-3 glicerol fosfato ou indol (Normanly et al. 1993) (Figura 8). No entanto, essa via permanece pouco definida em termos de enzimas, intermediários e localização celular e até o momento foi sugerida em *Aspergillum brasilense*, sendo a enzima Trp acetiltransferase (codificada pelo gene *ysnE*) a mais indicada como pertencente à via, mas ainda sem evidências genéticas e bioquímicas claras (Prinsen et al. 1993).

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é um dos organismos mais bem estudados em pesquisas genéticas e tem sido cada vez mais proposto como modelo de estudos devido a sua importância agrônômica e a características não encontradas em outras plantas-modelo como produção de frutos, crescimento simpodial, folhas compostas, associações micorrízicas, entre outros (Kimura e Sinha 2008, Campos et al. 2010). Inicialmente desenvolvido como um cultivar ornamental, o tomateiro anão Micro-Tom (MT) (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom), lançado em 1989 por J. Scott, apresenta tamanho reduzido (menos que 15 cm de altura) e ciclo reprodutivo curto (aproximadamente 10 semanas). O mesmo foi utilizado como *background* genético, no qual mutações foram introgrididas criando uma coleção de mutantes bastante úteis principalmente no estudo do papel de hormônios em respostas vegetais (Carvalho et al. 2011). Um desses mutantes, conhecido como *diageotropica* (Δdgt) é um candidato particularmente promissor para avaliar o efeito de auxinas exógenas sobre o crescimento vegetal. Esse mutante foi desenvolvido a partir de uma mutação em apenas um gene que foi introgridido no MT (Hicks et al. 1989, Dobbs et al. 2007), causando um defeito associado ao sítio primário de percepção e ação de auxina, o que o torna praticamente insensível ao AIA exógeno (Kelly e Bradford 1986). Adicionalmente a sua incapacidade de alongar em resposta ao AIA, plantas Δdgt exibem um conjunto de anormalidades como caules finos, folhas verdes escuras e curvadas (Figura 9) e um sistema radicular praticamente desprovido de ramificação lateral (Zobel 1972, Kelly e Bradford, 1986).

Figura 9. Fenótipos apresentados pelo tomateiro-anão Micro-Tom (MT), à esquerda, e seu mutante *diageotropica* (Δdgt), defeituoso para sensibilidade a auxinas, à direita. Fonte: Pino-Nunes (2005)

A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, previamente isolada da rizosfera de plantas saudáveis de guaranazeiro amazônico, apresenta grande potencial de aplicação como promotor de crescimento de culturas de grande interesse comercial como milho e soja, sendo o mecanismo de produção de AIA por essa linhagem sugerido por contribuir com seu expressivo efeito promotor de crescimento (Batista 2012). Utilizando como base o *draft* genômico dessa linhagem, apresentado no Capítulo 2 (N. acesso NZ_MJBF01000001.1), uma busca de genes potencialmente envolvidos nas vias biossintéticas do L-triptofano e do AIA foi realizada. Foi estudada, ainda, a influência do período de incubação e da

concentração do precursor Trp na produção de AIA pelo *Bacillus* sp. RZ2MS9 e, assim como Galland et al. (2012), López-Bucio et al. (2007) e Ryu et al. (2005), que utilizaram diferentes linhagens vegetais mutantes defectivas na resposta a vias hormonais para elucidar o papel da sinalização fitormonal bacteriana na promoção de crescimento vegetal, no presente estudo, plantas de tomate MT e seu mutante Δdgt defectivo na sensibilidade à auxina foram utilizados para avaliar o papel desse hormônio na promoção de crescimento vegetal induzida pelo *Bacillus* sp. RZ2MS9.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material biológico

A linhagem bacteriana utilizada nesse estudo é o *Bacillus* sp. RZ2MS9 (pertencente à coleção de cultura do laboratório de Genética de Micro-organismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, Piracicaba - SP), originalmente isolada da rizosfera de guaranazeiro amazônico (Batista, 2012). Para uso experimental, a bactéria foi rotineiramente estriada em meio Luria - Bertani (LB) (peptona 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 5 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹) e incubada a 28°C por 24 h.

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom (MT) e seu mutante *diageotropica* (Δdgt), defectivo na percepção de auxina, foram obtidas da coleção do laboratório HCPD de mutantes Micro-Tom (<http://www.esalq.usp.br/tomato/index.html>) mantido na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, Piracicaba - SP, gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando A. Piotto.

4.2.2. Busca de genes possivelmente envolvidos na produção de triptofano e AIA em *Bacillus* sp. RZ2MS9

A anotação funcional do *draft* genômico do *Bacillus* sp. RZ2MS9, apresentada no Capítulo 2 do presente trabalho, foi utilizada para realizar uma busca manual de sequências codificantes relacionadas a enzimas envolvidas nas vias de biossíntese do triptofano e do AIA, especialmente em vias dependentes do precursor.

4.2.3. Efeito do período de incubação na produção de AIA por RZ2MS9

Visando avaliar a influência do período de incubação na produção do AIA por *Bacillus* sp. RZ2MS9, a linhagem bacteriana foi inoculada ($OD_{\lambda=600}$ inicial de 0,01) em tubos de ensaio contendo 30 mL de meio de cultura LB suplementado com 1 g.L⁻¹ de L-triptofano. Os tubos de ensaio (em triplicata) foram mantidos sob agitação, no escuro, a 180 rpm e a 28°C, e os filtrados da cultura foram analisados em diferentes tempos, por um período de 24 h de crescimento, em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech), $\lambda=520$ nm, após reação com reativo de Salkowski (Bric et al. 1991 adaptado para o método quantitativo por Husen, 2013). Além disso, foi acompanhado o crescimento de *Bacillus* sp. RZ2MS9 ao longo do tempo por meio de leitura, em espectrofotômetro, da densidade ótica de crescimento ($\lambda=600$) no meio de cultura.

4.2.4. Efeito da concentração de L-triptofano na produção de AIA por RZ2MS9

Para avaliar a influência do precursor L-triptofano na produção do AIA por *Bacillus* sp. RZ2MS9, a linhagem bacteriana foi inoculada ($OD_{\lambda=600}$ inicial de 0,01) em tubos de ensaio contendo 30 mL de meio de cultura LB

suplementado ou não com L-triptofano (variando em concentrações de 0 a 2 g.L⁻¹). Os tubos de ensaio (em triplicata) foram mantidos sob agitação, no escuro, a 180 rpm e a 28°C, e os filtrados da cultura foram analisados após 21 horas em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech), $\lambda=520\text{nm}$, após reação com reativo de Salkowski (Bric et al. 1991 adaptado para o método quantitativo por Husen, 2013). Além disso, foi quantificado o crescimento de *Bacillus* sp. RZ2MS9 nas diferentes concentrações de L-triptofano através de leitura, em espectrofotômetro, da densidade ótica de crescimento ($\lambda=600$) no meio de cultura 21 horas após o início do crescimento.

4.2.5. Bacterização de sementes

Para a bacterização das sementes, 1 mL de suspensão celular da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 (1×10^8 UFC.mL⁻¹) foi inoculado em frascos do tipo *erlenmeyer*, contendo 100 mL de meio de cultura líquido LB, sendo agitado constantemente por aproximadamente 6 h a 28°C até atingir a fase log que corresponde a 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Sementes de tomateiro Micro-Tom (MT) e de seu mutante *diageotropica* (Δdgt) foram imersas na suspensão bacteriana e mantidas sob agitação em tubos tipo *falcon* de 50 mL, a 180 rpm e 28°C, por aproximadamente 30 min. Os controles consistiram em sementes de MT e Δdgt imersas no meio de cultura LB sem crescimento bacteriano sob as mesmas condições descritas acima.

4.2.6. Delineamento experimental

O experimento consistiu em Delineamento Inteiramente Casualizado, em esquema fatorial (2 genótipos x 2 tratamentos), sendo os tratamentos os seguintes: sementes MT tratadas com a suspensão bacteriana de RZ2MS9 (MT_RZ2MS9) e controle, sem inoculação bacteriana (MT_controle); e sementes Δdgt tratadas com RZ2MS9 (Δdgt _RZ2MS9) e controle (Δdgt _controle). Foram utilizadas 9 repetições por tratamento.

4.2.7. Plantio e condições de crescimento vegetal

As sementes previamente tratadas foram então semeadas cuidadosamente, com o auxílio de uma pinça, em células de bandejas preenchidas previamente com substrato comercial à base de vermiculita expandida umedecida, sendo mantidas em casa de vegetação a temperatura controlada de 33°C. Após germinação, as plantas foram transferidas para vasos plásticos individuais (415 mL) contendo também vermiculita nas mesmas condições de umidade e temperatura. Tanto nas bandejas quanto nos vasos, as plantas foram irrigadas manualmente, todos os dias, recebendo aplicação de fertilizante solúvel Peters (20-20-20 + micronutrientes) após germinação. Esse ensaio foi conduzido em casa de vegetação instalada na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), no Departamento de Genética, município de Piracicaba - SP.

4.2.8. Avaliação dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento vegetal

Sessenta dias após a transferência das plantas para os vasos individuais, foi realizada a colheita e avaliação. Um total de 9 plantas de cada tratamento tiveram suas raízes separadas da parte aérea, lavadas e acondicionadas em potes contendo álcool 70%, e assim mantidas até a análise via *scanner*. As raízes foram espalhadas em camada transparente de água em bandeja (30 cm x 20 cm), e sua imagem foi capturada em resolução de 400 *dpi* (pontos por

polegada) com um sistema de *scanner* profissional Epson® Expression 11000XL. As imagens foram analisadas para comprimento total de raízes (CT), comprimento de raízes laterais (CRL), comprimento de raízes axiais (CRA), área superficial total de raízes (AS) e diâmetro médio total (DM) utilizando o *software* WinRHIZO Arabidopsis (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada). As dez classes de diâmetro fornecidas pelo *software* foram simplificadas em apenas duas (CRL e CRA), conforme metodologia proposta por Trachsel et al. (2009). Assim, para o comprimento das raízes laterais (CRL) foram considerados os fragmentos com diâmetro menor ou igual a 0,5mm, e para o das raízes axiais (CRA), os fragmentos com diâmetro maior que 0,5mm.

O peso seco da parte aérea (PSPA) foi aferido em balança analítica após secagem em estufa com ventilação forçada (temperatura = 70°C) por 3 dias.

4.2.9. Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância com a inoculação bacteriana e o genótipo da planta como fontes de variação usando o programa R (R Core Team 2014). As médias foram consideradas diferentes após teste de Tukey a 5% de significância.

Os coeficientes de correlação de Pearson entre a produção de AIA e a densidade celular, assim como entre a produção de AIA e a concentração de L-triptofano adicionado ao meio de cultura foram também calculados utilizando o R.

4.3. Resultados

4.3.1. Genes relacionados à biossíntese de triptofano e AIA presentes no genoma de *Bacillus* sp. RZ2MS9

Toda a sequência genômica de *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi minada para genes reconhecidamente envolvidos na biossíntese de triptofano e do AIA (pelas várias vias biossintéticas possíveis). As classificações funcionais desses genes, assim como seus números de acesso NCBI podem ser encontrados no Anexo 1. Genes *trp* (*trpA*, *trpB*, *trpC*, *trpD*, *trpE*, *trpF* e *trpG*) relacionados à produção do precursor triptofano foram detectados no genoma de RZ2MS9 e encontram-se representados na Figura 10.

Figura 10. Via bioquímica de biossíntese de L-triptofano. *trpE* codifica a subunidade maior da antranilato sintase; *trpG* codifica a subunidade menor ligante de glutamina da antranilato sintase e catalisa a reação da glutaminase; *trpD* codifica a antranilato fosforibosil transferase; *trpF* codifica PRA isomerase (fosforibosil antranilato isomerase); *trpC* codifica InGP sintase (indol-3-glicerol fosfato sintase); *trpA* codifica a subunidade α da triptofano sintase que converte InGP em indol; *trpB* codifica a subunidade β da triptofano sintase e converte indol e serina em triptofano e gliceraldeído-3-fosfato. Todos esses genes foram detectados no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9. Figura adaptada de Kagan et al. 2008

Com relação às vias biossintéticas do AIA, não foram identificados genes codificadores de enzimas da via IAM. Já na via IPA, três genes codificando possíveis aminotransferases podem estar envolvidos na reação de transaminação do Trp à IPA, enquanto o gene-chave IPA descarboxilase - *ipdC* pode ser responsável pela etapa de descarboxilação de IPA à IAAld em RZ2MS9. Apenas os genes responsáveis pela codificação de IAAld desidrogenase não foram encontrados para essa via. Com relação à via TRM, gene ligados à codificação de amina oxidases responsáveis pela conversão de TRM à IAAld foram observados. Para a via IAN, apenas genes de amidases foram identificados. O gene Trp acetiltransferase - *ysnE*, possivelmente envolvido em uma via independente de Trp não muito bem caracterizada, também não foi encontrado na sequência genômica do *Bacillus* sp. RZ2MS9 (Figura 11).

Figura 11. Visão geral das vias biossintéticas de L-triptofano e ácido-3-indol-acético (AIA). Os genes detectados no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9 estão sublinhados e destacados na figura. Linhas pontilhadas indicam etapas pouco caracterizadas ou etapas intermediárias omitidas

4.3.2. Efeito do período de incubação na produção de AIA por RZ2MS9

Um experimento de crescimento foi conduzido em meio LB suplementado com 1g.L^{-1} de L-triptofano para quantificar a produção de AIA bacteriano em diferentes intervalos de tempo durante o crescimento do *Bacillus* sp. RZ2MS9. Uma maior produção de AIA em sobrenadante da cultura foi observada quando a bactéria entrou na fase estacionária, a partir das 12 h de crescimento (Figura 12), sendo a produção média máxima da auxina ($55\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) alcançada com 21 h de crescimento. Apesar do decréscimo de produção de AIA ocorrido 3 h após o pico de produção (24 h após o início do crescimento), o experimento indicou que a produção de auxina é dependente da densidade celular bacteriana, evidenciado pela análise de uma correlação positiva e significativa entre a produção de auxina e a densidade celular bactéria ($r = 0,72$; $P = 0,0002479$). Durante a fase log de crescimento, a produção de AIA foi praticamente linear, com um baixo nível médio de auxina detectado ($10\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Figura 12. Curvas de crescimento e de produção de auxina por *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meio de cultura LB suplementado com 1 g.L⁻¹ de L-triptofano. Os dados mostrados são representativos de 3 repetições. Correlação positiva e significativa ($r = 0,72$; $P = 0,0002479$) entre produção de auxina e densidade celular foi observada

4.3.3. Efeito da concentração do L-triptofano na produção de AIA por RZ2MS9

Um segundo experimento de crescimento foi conduzido para quantificar a produção de AIA bacteriano em meio LB suplementado com diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5; 1 e 2 g.L⁻¹) de L-triptofano. A avaliação foi feita após 21 h de crescimento do *Bacillus* sp. RZ2MS9, momento em que houve o pico de produção observado no experimento anterior (Item 4.3.2.). Um aumento na produção de AIA em sobrenadante da cultura foi observado até a concentração de 1 g.L⁻¹ (Figura 13) e houve um leve decréscimo na concentração de 2 g.L⁻¹. O experimento indicou uma correlação positiva e significativa entre a produção de auxina e a concentração de L-triptofano acrescentado ao meio de cultura ($r = 0,76$; $P = 0,00104$). Além disso, o crescimento do *Bacillus* sp. RZ2MS9 parece não ser afetado em diferentes concentrações do precursor L-triptofano.

Figura 13. Crescimento e produção de auxina por *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meios de cultura LB suplementados com diferentes concentrações de L-triptofano (0; 0,1; 0,5. 1 e 2 g.L⁻¹). Os dados mostrados são representativos de 3 repetições. Correlação positiva e significativa ($r = 0,76$; $P = 0,00104$) entre produção de auxina e a concentração de L-triptofano adicionado ao meio de cultura foi observada

4.3.4. Efeito de promoção de crescimento em MT e Δdgt após aplicação bacteriana

Um dos parâmetros aferidos visando avaliar o efeito da inoculação de *Bacillus* sp. RZ2MS9 no aumento de biomassa em tomateiro MT e seu mutante Δdgt foi o Peso Seco da Parte Aérea (PSPA). Incremento altamente significativo ($p < 0,001$) de 24% no PSPA foi observado em plantas MT que receberam o tratamento bacteriano (MT_RZ2MS9) quando comparadas às plantas MT sem tratamento bacteriano (MT_Controle), enquanto plantas Δdgt inoculadas (Δdgt _RZ2MS9) e não inoculadas (Δdgt _Controle) não diferiram significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância para o mesmo parâmetro (Figura 14).

Figura 14. Efeito da rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 no peso seco da parte aérea (PSPA) (g) e nos fenótipos de plantas de tomate Micro-Tom (MT) e de seu mutante *diageotropica* (Δdgt) defeituoso na sensibilidade ao AIA, 60 dias após o plantio. Os dados representam a média de 9 repetições por tratamento. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre genótipos (MT x Δdgt), enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos (RZ2MS9 x Controle) dentro de cada genótipo pelo teste de Tukey a 5% de significância

A aplicação da RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 aumentou significativamente ($p < 0,001$) em 25, 26 e 17% o comprimento total de raízes (CT), o comprimento de raízes laterais (CRL) e a área superficial total de raízes (AS), respectivamente, de plantas MT_RZ2MS9 quando comparadas às plantas MT_Controle, enquanto não exerceu efeito significativo no incremento dessas variáveis quando se comparam plantas Δdgt _RZ2MS9 e Δdgt _Controle (Figura 15 A, B e D). O efeito de promoção de crescimento e alteração na arquitetura das raízes de plantas MT_RZ2MS9 com relação a plantas MT_Controle é claramente observado na Figura 16. Com relação ao parâmetro comprimento de raízes axiais (CRA) nenhuma diferença significativa entre os tratamentos MT_RZ2MS9 e MT_Controle nem entre Δdgt _RZ2MS9 e Δdgt _Controle foi observada (Figura 15 C). No entanto, o diâmetro médio total (DM) de plantas MT_RZ2MS9 foi significativo e 7% menor que de plantas MT_Controle, enquanto a inoculação não exerceu efeito

significativo sobre o diâmetro médio de raízes quando se comparam plantas Δdgt_RZ2MS9 e $\Delta dgt_Controle$ (Figura 15 E).

Figura 15. Respostas de plantas de tomate Micro-Tom (MT) (em cinza) e de seu mutante *diageotropica* (Δdgt), defeitivo na sensibilidade ao AIA, (em branco) à inoculação da rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9, 60 dias após o plantio, detectadas através da análise dos seguintes parâmetros referentes à arquitetura de raízes: A) Comprimento Total de Raízes (CT), B) Comprimento de Raízes Laterais (CRL), C) Comprimento de Raízes Axiais (CRA), D) Área Superficial Total de Raízes (AS) e E) Diâmetro Médio Total (DM). Os dados representam a média de 9 repetições por tratamento. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre genótipos (MT x Δdgt), enquanto diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos (RZ2MS9 x Controle) dentro de cada genótipo pelo teste de Tukey a 5% de significância

Figura 16. Efeito fenotípico sobre a arquitetura de raízes de (A) planta de tomate Micro-Tom (MT) inoculada com a rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 e (B) planta de tomate MT sem inoculação bacteriana - controle. Imagens capturadas em scanner profissional Epson® Expression 11000XL a 400 dpi.

4.4. Discussão

A maioria, se não todas, atividades fisiológicas das plantas é regulada por um ou mais hormônios vegetais (fitormônios). Em adição às plantas, muitas bactérias são também capazes de sintetizar e/ou modular o nível de alguns desses hormônios incluindo a auxina Ácido-3-Indol-Acético (AIA), sendo esse o mecanismo mais comumente utilizado para explicar os efeitos positivos de bactérias promotoras de crescimento vegetal (Glick 2015). A maioria dos estudos anteriores mostram que organismos produtores de AIA são Gram-negativos, poucas linhagens Gram-positivas, como *Bacillus* spp. eram conhecidas por produzir AIA até pouco tempo atrás (Mohite 2013). No entanto, a promoção de crescimento por *Bacillus* spp. tem sido atualmente apontada como diretamente relacionada a sinalização fitormonal por diferentes espécies bacterianas dentro desse gênero (Wahyudi et al. 2011). Inoculação de raízes de plantas com fitormônios produzidos por *B. subtilis* estimulou o crescimento vegetal assim como aumentou o nível de hormônio endógeno o que sugere que respostas de crescimento são mediadas por mudanças hormonais (Arkhipova et al. 2005). Faisal e Hasnain (2006) demonstraram o efeito fitoestimulatório de inóculos de *B. cereus* sob condições *in vitro* e de casa de vegetação. Experimentos conduzidos usando linhagens selvagens e mutantes de linhagens de *B. amyloliquefaciens* sugeriram o papel do AIA na promoção de crescimento vegetal (Idris et al. 2007). Ainda, um estudo de Ahmed e Hasnain (2010) demonstrou que a inoculação de duas linhagens de *Bacillus* produtoras de AIA aumentaram significativamente a altura da parte aérea, comprimento de raízes e o número de folhas nas plantas comparadas aos tratamentos não inoculados sugerindo o uso de *Bacillus* spp. produtores de AIA como efetivos inoculantes promotores de crescimento vegetal.

A rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi isolada de rizosfera de guaranazeiro amazônico e possui a capacidade de promover o crescimento de soja e milho. A linhagem foi constatada como produtora de AIA *in vitro* e esse mecanismo foi sugerido como grande contribuidor de seu expressivo efeito promotor de crescimento vegetal (Batista, 2012). A análise genômica de *Bacillus* sp. RZ2MS9 revelou que diversos genes potencialmente contribuem com seu efeito promotor de crescimento vegetal, como discutido no Capítulo 2. No presente capítulo, foi investigado o papel do fitormônio AIA secretado por RZ2MS9 e identificados genes possivelmente relacionados às vias biossintéticas desse hormônio e de seu precursor. Pelo uso do *draft* genômico de RZ2MS9, foi realizada uma varredura genômica, tendo como base estudos relacionados, visando identificar genes-chave nas vias biossintéticas do triptofano e do AIA nesse isolado.

Sabe-se que, basicamente, o precursor da formação do AIA bacteriano é o aminoácido L-triptofano (Trp), que pode ser obtido do meio ou ser produzido pela própria bactéria (Duca et al. 2014). Os genes para a produção de Trp foram detectados no genoma do *Bacillus* sp. RZ2MS9 sugerindo que essa bactéria não depende exclusivamente da presença desse precursor no meio externo para produzir o AIA. Mesmo que a maioria das bactérias produzam triptofano, níveis endógenos são muito baixos para levar a uma alta produção de AIA. Dessa forma, mesmo possuindo os genes para codificação de triptofano, bactérias produtoras de AIA adquirem a maioria do Trp de fontes exógenas, principalmente os exsudatos de sementes e raízes, onde sua quantidade depende da espécie, idade e estado nutricional da planta, assim como outros fatores ambientais (Patten et al. 2013).

Vários produtos intermediários nomeados Indol-3-Piruvato (IPA), Indol-3-Acetonitrila (IAN), Indol-3-Acetamida (IAM) ou Triptamina (TRM) estão envolvidos na biossíntese de AIA e as vias propostas para formação desse fitormônio são geralmente classificadas com base nesses compostos intermediários (Spaepen e Vanderleyden 2011). Apesar da diversidade de vias para produção de AIA, a biossíntese procariótica desse hormônio predominantemente parece seguir duas rotas principais: as vias IPA e IAM (Cassán et al. 2011). Dessa forma,

Lambrecht et al. (2000) propuseram dois principais padrões representativos de biossíntese de AIA nas interações planta-micro-organismos, dependendo do papel eco-fisiológico da rizobactéria: fitopatogênica ou promotora de crescimento. No caso de fitopatógenos, o AIA parece ser produzido preferencialmente via IAM, como ocorre em *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *Pseudomonas savastanoi* e *Erwinia herbicola* (Morris 1995, Clark et al. 1993). Em contraste, a maioria das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal como *Azospirillum* sp. e algumas espécies não patogênicas de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Enterobacter* spp. sintetizam AIA predominantemente através da via IPA (Patten e Glick 1996, Koga et al. 1991). É provável que o *Bacillus* sp. RZ2MS9 produza AIA através da via IPA, visto que o gene *ipdC* que codifica a enzima IPA descarboxilase responsável por converter IPA em indol-3-acetaldeído (IAAld) foi encontrado no genoma de RZ2MS9, assim como genes codificantes de aminotransferases responsáveis pela conversão de triptofano a IPA, na mesma via. No entanto, a exata contribuição do papel dessa via e cada enzima envolvida na produção de AIA por RZ2MS9 deverá ser explorada através de análises de quantificação mais precisas dos compostos intermediários durante a produção de AIA pela rizobactéria, utilizando a técnica de HPLC por exemplo, por meio de mutagênese desses genes e análise no fenótipo resultante, ou pela combinação dessas técnicas assim como foi realizado no trabalho de Shao et al. (2015a), que identificaram que *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, uma rizobactéria promotora de crescimento isolada de rizosfera de pepino, possui um conjunto completo de genes da via IPA e parece ser capaz de sintetizar AIA através de múltiplas vias. Um estudo pioneiro da mutagênese de genes relacionados à biossíntese de AIA em *Azospirillum brasilense* foi realizado por Barbieri e Galli (1993) e o mutante com baixa produção hormonal foi menos eficiente que a linhagem selvagem em aumentar o número, comprimento e densidade de raízes de *Triticum durum*. Resultados similares foram obtidos com um mutante de *Pseudomonas putida* nocauteado no gene *ipdC* (Patten e Glick 2002a) e de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 nocauteado nos genes responsáveis pela codificação da enzima nitrilase e AIA acetiltransferase - *ysnE* (Idris et al. 2007).

A habilidade de *Bacillus* sp. RZ2MS9 em sintetizar AIA foi determinada por reação do sobrenadante da cultura com o reagente de Salkowski, o qual detecta tanto AIA quanto alguns de seus intermediários, como IPA e IAM (Glickmann e Dessaux 1995). A reação produz uma quantidade proporcional de um complexo férrico, o qual é rosa em cor e pode ser quantificado por medição de absorvância a um comprimento de onda de 520 nm em espectrofotômetro (Bric et al. 1991). Pela quantificação da produção de AIA ao longo do crescimento do *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi observada que a concentração média de AIA permanece baixa ($6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e constante durante a fase log de crescimento, aumentando significativamente após 12 h, quando a bactéria entra na fase estacionária. O AIA é produzido por diversas culturas bacterianas, incluindo *Bacillus* spp. promotores de crescimento vegetal, especialmente quando estão na fase estacionária de crescimento, mesmo quando o L-triptofano exógeno está presente durante todo o ciclo de crescimento (Ali 2015, Shim et al. 2015, Patten et al. 2013; Swain et al. 2007).

Esse fato pode ser explicado por três hipóteses: primeiramente, alguns genes envolvidos na biossíntese do AIA podem ser induzidos em resposta a um sinal dependente de densidade celular (*Quorum Sensing*). N-acilhomoserina lactonas (AHLs) já foram caracterizadas por regular a produção bacteriana de AIA em Gram-negativas, como em *Azospirillum lipoferum* B518 (Boyer et al. 2008). A segunda hipótese que explica o aumento de produção de AIA bacteriano na fase estacionária de crescimento é a de que a expressão dos genes AIA é desencadeada por fatores de estresse incluindo exaustão de fonte de carbono e nitrogênio, redução na taxa de crescimento e privação de oxigênio (Ona et al. 2005). Em algumas bactérias Gram-negativas, a regulação da expressão de genes relacionados à biossíntese de AIA, incluindo o *ipdC*, é realizada pelo fator sigma *RpoS* de estresse e fase estacionária (Patten e Glick 2002b). A estimulação da síntese de AIA por esse fator pode fornecer um mecanismo pelo qual a bactéria promove exsudação radicular para obter nutrientes a partir de seu crescimento quando privadas de nutrientes. Além disso, não se pode

descartar uma terceira hipótese de que a bactéria pode ser capaz de obter o máximo de triptofano da massa bacteriana morta na fase estacionária, o que poderia resultar na maior produção de AIA durante essa fase (Swain et al. 2007).

Outro fato que merece ser destacado é que o nível de produção de AIA declinou no sobrenadante do meio de cultura durante a fase estacionária tardia. Tal fato aponta o consumo de alguns intermediários da biossíntese do AIA que também reagem com o reativo de Salkowski e/ou que o *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresenta uma atividade degradadora de AIA. Esse atributo de degradação de auxina é similar ao de *Bacillus* sp JH 2-2, uma rizobactéria promotora de crescimento de *Brassica juncea* L., que apresenta atividade produtora e degradadora de AIA (Shim et al. 2015). A exposição ao AIA em excesso pode causar danos nos tecidos vegetais devido à geração de espécies reativas de oxigênio, causando danos oxidativos e dificultando sistemas antioxidantes (de Melo et al. 2004, Wang et al. 2007), e bactérias que possuem essas características antagônicas parecem ser capazes de controlar essa concentração.

O L-triptofano, como já mencionado, é o principal precursor da síntese de AIA em bactérias. Nossos experimentos mostram que a biossíntese de quantidades significativas de AIA pelo *Bacillus* sp RZ2MS9 depende da presença exógena desse aminoácido já que baixas concentrações de AIA foram detectadas no sobrenadante da cultura quando não houve adição de L-triptofano, além disso, o triptofano exógeno parece não ser vital para o crescimento bacteriano pois não houve redução na densidade celular de RZ2MS9 quando esse aminoácido não foi adicionado ao meio de cultura.

A análise colorimétrica mostrou que com o aumento da concentração de L-triptofano de 0 a 1 g.L⁻¹, houve um aumento linear na produção de AIA por RZ2MS9, no entanto, houve uma ligeira redução na produção hormonal quando a bactéria foi crescida no meio suplementado com 2 g.L⁻¹ de L-triptofano. Esse fato foi também observado por Swain et al. (2007) na linhagem *Bacillus subtilis* CM5 e por Ali (2015) em diversas espécies de *Bacillus* spp. testadas. Nossos resultados estão, ainda, de acordo com pesquisas anteriores que mostram que a produção do AIA bacteriano, incluindo por espécies de *Bacillus* spp., é correlacionada ao aumento das concentrações de L-triptofano no meio de cultura (Shao et al. 2015b, Idris et al. 2007).

A fim de investigar o envolvimento da auxina produzida pelo *Bacillus* sp. RZ2MS9 na promoção de crescimento vegetal, foi estabelecido um modelo de estudo funcional utilizando plantas anãs de tomateiro Micro-Tom (MT) e seu mutante isogênico *diageotropica* (Δdgt), insensível à percepção de auxinas, sendo o efeito da inoculação bacteriana comparado entre essas plantas. A resposta das plantas à inoculação bacteriana foi avaliada através da análise de modificações fenotípicas na biomassa vegetal, expressa em Peso Seco da Parte Aérea (PSPA). Visto que sistema radicular de dicotiledôneas, como o tomate, é composto de raízes primárias ao longo das quais se ramificam raízes secundárias, ou laterais, as modificações na arquitetura da raiz foram detectadas através da análise de cinco parâmetros radiculares realizada pelo *software* WinRHIZO: Comprimento Total de Raízes (CT), Comprimento de Raízes Laterais (CRL), Comprimento de Raízes Axiais (CRA), sendo esses dois últimos parâmetros baseados em classes pré-determinadas de diâmetro, além da Área Superficial Total de Raízes (AS) e do Diâmetro Médio Total (DM).

A aplicação da bactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 causou um incremento significativo de cerca de 25% no PSPA, CT e CRL de plantas MT inoculadas com a bactéria quando comparadas às plantas MT não inoculadas, além disso, a bactéria perdeu o potencial de incremento dessas variáveis em plantas Δdgt , deficientes na percepção de auxinas, indicando a dependência do AIA na promoção de crescimento de plantas de tomate Micro-Tom por RZ2MS9. Além disso, pudemos observar que o CRA não foi afetado em plantas MT que receberam a bactéria e que o diâmetro médio total de raízes de plantas MT inoculadas com a bactéria teve uma redução significativa de 7% em comparação às plantas MT controle, enquanto esses parâmetros também não foram afetados pela inoculação bacteriana em plantas Δdgt .

A inibição do crescimento de raízes primárias e a indução do desenvolvimento de raízes laterais levando ao aumento da biomassa da parte aérea observados no presente estudo têm sido descritos como um fenótipo característico do desenvolvimento vegetal regulado por auxinas (Sukumar et al. 2013, Rahman et al. 2002). Esses hormônios parecem estar ligados a uma localização muito precisa em diferentes células e tecidos vegetais (Muday et al. 2012). Recentemente, foi descoberto que o conjunto de genes que respondem à auxina difere significativamente entre diferentes tipos celulares nas raízes, refletindo mecanismos complexos de resposta a esse hormônio em plantas (Salehin et al. 2015). O diâmetro médio total de raízes reduzido pela aplicação da bactéria é mais um indicativo que a bactéria induz o desenvolvimento de raízes laterais, que são caracterizadas por um diâmetro médio menor quando comparadas às raízes axiais. Apesar de raízes mais grossas possuírem maior capacidade de transporte de água e nutrientes e serem menos vulneráveis a condições edáficas adversas, raízes finas permitem uma exploração do solo muito maior (Richardson et al. 2009) e as modificações na arquitetura das raízes observadas no presente trabalho certamente tiveram grande influência na melhora da aquisição vegetal de água e nutrientes, refletindo no aumento da biomassa da parte aérea.

O uso de mutantes hormonais vegetais tem se tornado uma ferramenta importante na demonstração do efeito causado por bactérias produtoras de fitormônios quando aplicadas a plantas. O primeiro estudo a utilizar esses mutantes para investigar a indução de vias de sinalização hormonal em plantas em interação com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal foi reportado por Ryu et al. (2005). Diferentes linhagens de *Arabidopsis thaliana* mutantes defectivas em diversas respostas a vias hormonais foram utilizadas para demonstrar que a elicitação do crescimento *in vitro* de *A. thaliana* por linhagens de RPCPs envolveu sinalização de brassinosteróides, AIA, ácido salicílico e giberelinas (Ryu et al. 2005).

Mutantes de *A. thaliana* insensíveis a fitormônios também foram usados para investigar os efeitos de RPCPs como *Bacillus megaterium* (López-Bucio et al., 2007), *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 (Contesto et al. 2010, Galland et al. 2012), *B. subtilis* TpP-1, *Pseudomonas* sp. AvH-4, *P. aeruginosa* AS-17 (Ali 2015) e *Burkholderia phytofirmans* PsJN (Poupin et al. 2016) na promoção de crescimento vegetal e modificação de arquitetura radicular.

Assim como no presente estudo, *B. megaterium* causou inibição do crescimento de raízes primárias, seguido de um aumento no desenvolvimento de raízes laterais, porém esses efeitos não foram reduzidos nas plantas mutantes defectivas para percepção de AIA e etileno, sugerindo que o efeito promotor de crescimento por essa bactéria ocorre independentemente desses hormônios (López-Bucio 2007). Em contraste, a inoculação de *Arabidopsis* com a linhagem de rizobactéria *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 resultou em elongação dos pelos radiculares e no aumento do crescimento de raízes laterais em *Arabidopsis* selvagens, sendo esses efeitos abolidos em mutantes defectivos no transporte e sinalização de auxinas (Contesto et al. 2010) e etileno (Galland et al. 2012), indicando que essas vias são requeridas na promoção de crescimento e resposta da arquitetura da raiz por esse isolado. Estudos mais recentes utilizando também mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensíveis a auxinas e etileno demonstraram que a indução de crescimento vegetal por *B. subtilis* TpP-1, *Pseudomonas* sp. AvH-4, *P. aeruginosa* AS-17 (Ali 2015) e *Burkholderia phytofirmans* PsJN (Poupin et al. 2016) está associada à sinalização bacteriana desses hormônios.

Micro-Tom é uma planta-modelo com tamanho e ciclo de vida reduzidos, comparável a *Arabidopsis thaliana*, com a vantagem adicional de ter uma relevância agrônômica significativa, razão pela qual tem se tornado o próximo alvo, ou um modelo adicional promissor de dicotiledônea, para estudos genômicos de plantas (Carvalho et al. 2011). Existem diversos mutantes deficientes ou insensíveis a hormônios disponíveis a partir do Micro-Tom (Carvalho et al. 2011) e, portanto, uma ampla gama de processos estimulados por fitormônios pode ser estudada. Essa planta-modelo tem sido utilizada em análises de promoção de crescimento por uma ampla gama de micro-organismos, incluindo fungos e actinomicetos (Fiorini et al. 2016, Palaniyandi et al. 2014). Além disso, plantas de Micro-Tom e seu mutante

Adgt já foram utilizadas em combinação para confirmar a atividade do tipo auxina em matéria húmica (Canellas et al. 2011, Dobbs et al. 2007). No entanto, até nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo utilizando essa variedade de tomate juntamente com um de seus mutantes para a para investigação do impacto de hormônios produzidos por rizobactéria na promoção de crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

- Ahmed A, Hasnain S (2010). Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry*, 82, 313-319.
- Ali B (2015). Bacterial auxin signaling: comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum*. *Turkish Journal of Botany*, 39, 1-9.
- Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 519-526.
- Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, 201-209.
- Barbieri P, Galli, E. (1993). Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Research in Microbiology*, 144, 69-75.
- Batista BD (2012). Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba-SP, Brasil.
- Bergfeld R, Speth V, Schopfer P. (1988). Reorientation of microfibrils and microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles during auxin-mediated growth. *Botanica Acta*, 101, 57-67.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 343-350.
- Boyer M, Bally R, Perrotto S, Chaintreuil C, Wisniewski-Dyé F (2008). A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Research in Microbiology*, 159, 699-708.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 535-538.
- Campos ML, Carvalho RF, Benedito VA, Peres LEP (2010). Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 267-270.
- Canellas LP, Dantas DJ, Aguiar NO, Peres LEP, Zsögön A, Olivares FL, Piccolo A (2011). Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*, 159, 202-211.
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Peres LE (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7, 1.
- Cassán F, Perrig D, Sgroi V, Luna V (2011). Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Springer Berlin Heidelberg, 141-182.

- Clark E, Manulis S, Ophir Y, Barash I, Gafni Y (1993). Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar gypsophila. *Phytopathology*, 83, 234-240.
- Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Touraine B (2010). The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*, 232, 1455-1470.
- Crawford IP (1975). Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriological Reviews*, 39, 87.
- de Melo MP, de Lima TM, Pithon-Curi TC, Curi R (2004). The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 148, 103-111.
- Dobbss LB, Medici LO, Peres LEP, Pino-Nunes LE, Rumjanek VM, Façanha AR, Canellas LP (2007). Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Annals of Applied Biology*, 151, 199-211.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125.
- Etesami H, Alikhani HA, Hosseini HM (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, 2, 72-78.
- Faisal M, Hasnain S (2006). Growth stimulatory effect of *Ochrobactrum intermedium* and *Bacillus cereus* on *Vigna radiata* plants. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 461-466.
- Fiorini L, Guglielminetti L, Mariotti L, Curadi M, Picciarelli P, Scartazza A, Vannacci G (2016). *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. *Plant and Soil*, 400, 351-366.
- Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B, Touraine B, Desbrosses G (2012). The ethylene pathway contributes to root hair elongation induced by the beneficial bacteria *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *Plant Science*, 190, 74-81.
- Glick BR (2015). Modulating phytohormone levels in beneficial plant-bacterial interactions. *Springer International Publishing*, 65-96.
- Glickmann E, Dessaux Y (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793-796.
- Hartmann A, Singh M, Klingmüller W (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 916-923.
- Hicks GR, Rayle DL, Lomax TL (1989). The *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. *Science*, 245, 52-54.
- Husen E (2013). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 4.
- Hussain A, Shah ST, Rahman H, Irshad M, Iqbal A (2015). Effect of IAA on *in vitro* growth and colonization of *Nostoc* in plant roots. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 619-626.
- Kagan J, Sharon I, Beja O, Kuhn JC (2008). The tryptophan pathway genes of the Sargasso Sea metagenome: new operon structures and the prevalence of non-operon organization. *Genome Biology*, 9, R20.
- Kelly MO, Bradford KJ (1986). Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. *Plant Physiology*, 82, 713-717.

- Kimura S, Sinha N (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *CSH Protocols*, 3, 1-9.
- Koga J, Adachi T, Hidaka H (1991). Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 226, 10-16.
- Lambrecht M, Okon Y, Broek AV, Vanderleyden J (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Evolution*, 54, 59.
- López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Fariás-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 207-217.
- McSteen P (2010). Auxin and monocot development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2, a001479.
- Mohite B (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 638-649.
- Morris RO (1995). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In *Plant Hormones*. Springer Netherlands, 318-339.
- Muday GK, Rahman A, Binder BM (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends in Plant Science*, 17, 181-195.
- Normanly J, Cohen JD, Fink GR (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 10355-10359.
- Ona O, Van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 125-132.
- Palaniyandi SA, Damodharan K, Yang SH, Suh JW (2014). *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 766-773.
- Patten CL, Blakney AJ, Coulson TJ (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39, 395-415.
- Patten CL, Glick BR (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.
- Patten CL, Glick BR (2002a). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795-3801.
- Patten CL, Glick BR (2002b). Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor *RpoS*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 635-642.
- Perley JE, Stowe BB (1966). The production of tryptamine from tryptophan by *Bacillus cereus* (KVT). *Biochemical Journal*, 100, 169.
- Pino-Nunes LE (2005). Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom). Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba-SP, Brasil.
- Poupin MJ, Greve M, Carmona V, Pinedo I (2016). A complex molecular interplay of auxin and ethylene signaling pathways is involved in *Arabidopsis* growth promotion by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Van Onckelen H (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6, 609-609.
- Rahman A, Hosokawa S, Oono Y, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S (2002). Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiology*, 130, 1908-1917.

- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing (Version 3.0. 2). *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 305-339.
- Ryu CM, Hu CH, Locy RD, Kloepper JW (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, 268, 285-292.
- Salehin M, Bagchi R, Estelle M (2015). SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *The Plant Cell*, 27, 9-19.
- Scott JW (1989). Micro-Tom-a miniature dwarf tomato. *Florida Agricultural Experiment Station Circuit*, 370, 1-6.
- Sekine M, Ichikawa T, Kuga N, Kobayashi M, Sakurai A, Syōno K (1988). Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamide in *Bradyrhizobium* spp. *Plant and Cell Physiology*, 29, 867-874.
- Shao J, Li S, Zhang N, Cui X, Zhou X, Zhang G (2015a). Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial Cell Factories*, 14, 1.
- Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R (2015b). Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and Fertility of Soils*, 51, 321-330.
- Shih-Yung H (2010). IAA production by *Streptomyces scabies* and its role in plant microbe interaction. Tese de doutorado, Cornell University, Nova York, EUA.
- Shim J, Kim JW, Shea PJ, Oh BT (2015). IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *Journal of Basic Microbiology*, 55, 652-658.
- Spaepen S, Vanderleyden J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3, a001438.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS microbiology reviews*, 24, 487-506.
- Sukumar P, Legue V, Vayssières A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment*, 36, 909-919.
- Swain MR, Naskar SK, Ray RC (2007). Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish Journal of Microbiology*, 56, 103.
- Toyota, K. (2015). *Bacillus*-related spore formers: attractive agents for plant growth promotion. *Microbes and Environments*, 30, 205.
- Trachsel S, Messmer R, Stamp P, Hund A (2009). Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 119, 1413-1424.
- Wahyudi AT, Astuti RP, Widayawati A, Mery A, Nawangsih AA (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3, 34-40.
- Wang HH, Shan XQ, Wen B, Owens G, Fang J, Zhang SZ (2007). Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. *Environmental and experimental botany*, 61, 246-253.

- Zakharova EA, Shcherbakov AA, Brudnik VV, Skripko NG, Bulkhin NS, Ignatov VV (1999). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *European Journal of Biochemistry*, 259, 572-576.
- Zobel RW (1972). Genetics of the *diageotropica* mutant in the tomato. *Journal of Heredity*, 63, 94-97.

5. *Bacillus* sp. RZ2MS9 PROMOVE O CRESCIMENTO DE MILHO E SOJA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

RESUMO

Bioinoculantes formulados com Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) consistem em uma fonte barata e não danosa ao ambiente de suplementação nutricional vegetal e apresentam, portanto, grande potencial na substituição ou redução do uso de fertilizantes minerais visando sistemas agrícolas sustentáveis. Por esse motivo, a busca por micro-organismos que possuam a capacidade de manter relações benéficas, especialmente com gramíneas, é cada vez maior. As culturas do milho e da soja representam mais de 80% da área cultivada com grãos no Brasil, considerando o tamanho desses mercados, incrementos relativamente modestos de crescimento e produtividade podem gerar riqueza significativa ao país. No presente estudo, o efeito sobre o desenvolvimento e produtividade de milho e soja com a aplicação da RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi avaliado em condições de campo e comparado com o desempenho de bioinoculantes comerciais. No milho, o efeito da inoculação bacteriana foi, ainda, associado à adubação nitrogenada para verificar a possibilidade de redução desses insumos. *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentou efeitos significativos no desenvolvimento tanto de soja (comparáveis aos efeitos de rizóbios) quanto de milho os quais, porém, não refletiram em aumento significativo de produtividade de ambas as culturas. No entanto, o potencial do *Bacillus* sp. RZ2MS9 é bastante claro pois, com um custo de produção inferior a R\$1,00 por hectare, sua inoculação causou incremento de 16 sacas de milho por hectare com redução de 30% na adubação nitrogenada, assim como um incremento de 11 sacas de soja por hectare, ambos comparados ao controle não inoculado. Diversos fatores físicos e químicos do solo, fatores ambientais e o próprio genótipo da planta podem influenciar na atuação de RPCPs em condições de campo, sendo imprescindível, portanto, dar continuidade a estudos utilizando o *Bacillus* sp. RZ2MS9 em diferentes condições para obtenção de resultados consistentes.

Palavras-chave: RPCP; Bioinoculantes; Nitrogênio; Agricultura sustentável

ABSTRACT

Bioinoculants formulated with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) are a cheap and non-harmful source of nutrient supplementation and therefore have great potential in replacing, or reducing, the use of mineral fertilizers for sustainable agricultural systems. For this reason, the search for microorganisms that have the capacity of maintain beneficial relationships, especially with grasses, is growing. Maize and soybean crops account for more than 80% of the area planted with grains in Brazil, considering the size of these markets, relatively modest increases in growth and yield can generate significant gains for the country. In the present study, the effect on development and yield of maize and soybean by the application of the PGPR *Bacillus* sp. RZ2MS9 was evaluated under field conditions and compared to the performance of commercial bioinoculants. In maize, the effect of bacterial inoculation was also associated with nitrogen fertilization to verify the possibility of reducing these inputs. *Bacillus* sp. RZ2MS9 showed significant effects on the development of both soybean (comparable to the effects of rhizobia) and maize, but did not reflect on a significant increase in yield of both crops. However, the potential of *Bacillus* sp. RZ2MS9 is very clear because, with a production cost of less than R\$1.00 per hectare, its inoculation caused an increase of 16 sacks of maize per hectare with a 30% reduction in nitrogen fertilization, as well as an increase of 11 sacks of soybean per hectare, both compared to uninoculated control. Several physical and chemical factors of the soil, environmental factors and the plant genotype itself can influence the performance of PGPR in field conditions. Therefore, it is essential to continue the studies using *Bacillus* sp. RZ2MS9 under different conditions to obtain consistent results.

Keywords: PGPR; Bioinoculant; Nitrogen; Sustainable agriculture

5.1. Introdução

O consumo global de fertilizantes minerais cresce atualmente cerca de 1,8% por ano com uma estimativa de alcançar 200,5 milhões de toneladas de nutrientes até o final de 2018 (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO 2015). Segundo o *International Plant Nutrition Institute* (IPNI 2016), no Brasil, durante o ano agrícola de 2015, foram utilizados aproximadamente 3,6 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados. Deste montante, 70% é proveniente de importações. Além disso, pelas estimativas realizadas pela Petróleo Brasil S/A (PETROBRAS 2009), o consumo de ureia no País apresenta um crescimento de 3,4% ao ano, sendo a cultura do milho a principal consumidora, em torno de 30% (1,3 milhões de toneladas por ano). A necessidade crescente de produzir mais alimentos é o principal fator responsável por essa demanda de nutrientes minerais, no entanto, as fontes químicas encontram sérias restrições econômicas e principalmente ambientais e, portanto, os próximos anos são extremamente promissores para a consolidação de pesquisas utilizando micro-organismos como bioinoculantes (Hungria e Megias 2013).

Bioinoculantes, ou inoculantes microbianos, são preparações contendo células vivas ou latentes de micro-organismos que, quando aplicados às sementes, superfície vegetal ou solo, colonizam a rizosfera ou interior da planta e promovem seu crescimento por aumentar a disponibilidade de elementos nutricionalmente importantes através de processos biológicos diretos ou indiretos, ou ambos (Vessey 2003). Esses produtos são uma fonte barata e não danosa ao ambiente de suplementação nutricional vegetal em vista de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes minerais em sistemas agrícolas sustentáveis.

O milho (*Zea mays* L.) é o principal cereal cultivado no Brasil. Em janeiro de 2017, uma área de aproximadamente 16 milhões de hectares (28,5% da área total cultivada com grãos no Brasil) foram destinados à cultura no país, com uma produtividade média de 5.249 Kg.ha⁻¹ e produção total de 84,5 milhões de toneladas, havendo uma perspectiva global de aumento na demanda e no preço do grão (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2017). Cerca de 2,25 milhões de hectares plantados com milho no Brasil (14% da área cultivada com milho) são destinados à produção de silagem, uma atividade cada vez mais significativa na produção de alimento para as atividades pecuárias (Pereira 2013).

A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a aproximadamente 60% da área total cultivada com grãos no país. O cultivo da mesma ocorre em todo território, e atualmente no Brasil, a área plantada de soja atingiu o recorde de 33,8 milhões de hectares com uma produtividade média de 3.072 Kg.ha⁻¹ e produção total de 103,8 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Considerando o tamanho desses mercados, incrementos relativamente modestos de crescimento e produtividade podem gerar ganhos econômicos significativos ao país.

Assim como o presente trabalho, alguns esforços vêm sendo realizados no sentido de se buscar micro-organismos que possuam a capacidade de manter relações benéficas, especialmente com gramíneas. A exemplo, a bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* tem apresentado um grande potencial de resposta em associação com a cultura do milho e trigo (Hungria et al. 2010). Outra perspectiva interessante e buscada por décadas, porém com resultados pouco animadores, é a incorporação nas plantas de genes envolvidos no crescimento vegetal (Hungria e Megias 2013). Tais genes podem ser encontrados em bactérias promotoras do crescimento de plantas, como aqueles apresentados no Capítulo 2 do presente trabalho.

Com relação à soja, uma das características mais importantes dessa cultura, e parte do sucesso de sua produção especialmente no Brasil, é a utilização maciça das bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* spp.. Perante a limitação de nitrogênio mineral, essas bactérias formam nódulos nas raízes de leguminosas, e dentro

desses nódulos, realizam a transformação do nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados (amônio ou nitrato), pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), tornando-os disponíveis para planta hospedeira e suprindo cerca de 80% das necessidades de N nessas espécies (De Bruijn 2015, Alves et al. 2003). Estima-se que o Brasil possa economizar cerca de US\$ 7 bilhões em fertilizantes nitrogenados anualmente (Nogueira e Hungria 2013) e tenha deixado de emitir 250 mil toneladas de óxido nitroso, um gás de efeito estufa extremamente nocivo, para a atmosfera, em 2015, devido a essa eficiente associação (Ferreira 2015). Sem o rizóbio, a soja brasileira teria seu custo de produção muito elevado, afetando diretamente sua competitividade no mercado mundial (Mendes e Reis Júnior 2010). Entretanto, bactérias de vida livre, incluindo representantes do gênero *Bacillus* spp., também podem beneficiar o crescimento da soja (Stefan et al. 2010). Essas bactérias podem inclusive ser utilizadas em consórcio com rizóbios, incrementando sua performance (Masciarelli et al. 2014).

Por décadas, diferentes espécies de micro-organismos têm sido estudadas visando a produção de formulações bioinoculantes nas mais variadas culturas vegetais incluindo *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azobacter*, *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Serratia* (Babalola 2010). Entretanto, membros do gênero *Bacillus* spp. se destacam pela facilidade de formulação e maior sobrevivência em campo e em armazenamento (Toyota 2015) e têm sido objetos de estudo há mais de 40 anos (Merriman et al. 1974), com alguns produtos liberados para comercialização, como o Kodiak® (*B. subtilis* GB03), Rhizovital® (*B. amyloliquefaciens* FZB42), Ballad® (*B. pumilus* QST 2808), Subtilex® (*B. subtilis* MBI 600) e outros (Bettiol et al. 2012). Particularmente no Brasil, o inoculante comercializado Rizolyptus®, que auxilia no enraizamento de mini-estacas e estacas de eucaliptos é composto por isolados de *B. subtilis* (<http://www.biosoja.com.br/produto-rizolyptus.php>).

A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, isolada da rizosfera de plantas saudáveis de guaranazeiro amazônico, apresenta grande potencial de aplicação inoculante como promotor de crescimento de milho e soja. Plantas inoculadas com essa bactéria tiveram incrementos expressivos na altura (25,9% em soja e 35,5% em milho), no peso seco da parte aérea (95,8% em soja, 235,5% em milho) e no peso seco do sistema radicular (247,8% em milho) em relação ao controle, não inoculado, em condições de casa de vegetação (Batista 2012, Batista et al. submetido para publicação). No entanto, seu potencial benéfico na promoção de crescimento dessas culturas ainda não havia sido avaliado em condições de campo, assim como seu potencial de incremento de produtividade. Dessa forma, no presente capítulo, o efeito no desenvolvimento e produtividade de milho e soja com a inoculação de *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi avaliado em condições de campo, sendo seu desempenho comparado a inoculantes comercialmente disponíveis para as culturas do milho (linhagens de *Azotobacter* spp. Baraúna) e da soja (rizóbio SEMIA 5080) e ao efeito da ausência de inoculação (controle negativo).

5.2. Material e métodos

5.2.1. Material biológico

O efeito promotor de crescimento vegetal da rizobactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi testado em campo nas culturas de milho e soja por bacterização de sementes (milho híbrido 30A37PW® - Morgan Sementes e Biotecnologia, e soja cultivar INTACTA RR2-PRO® - Monsanto), sendo seu desempenho comparado a um produto comercial cedido gentilmente pela empresa Baraúna, composto por linhagens de *Azotobacter* spp. promotoras de crescimento em milho, e ao rizóbio recomendado para soja *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080 gentilmente cedido pela Dra. Mariângela Hungria, da EMBRAPA Soja.

5.2.2. Caracterização das áreas experimentais

5.2.2.1. Milho

O experimento em campo com milho foi conduzido de Outubro de 2015 a Março de 2016 em uma área de 0,3 hectares (latitude 23°31'59" sul, longitude 49°14'40" oeste, altitude 669 m) na fazenda “Chapadão Chão Quente”, no município de Taquarituba - SP, gentilmente disponibilizada por Rodrigo E. M. de Almeida. O experimento foi instalado em área anteriormente ocupada com pastagem do gênero *Urochloa*. A precipitação e temperatura médias da região durante a condução do experimento são exibidas na Figura 17. As características químicas da área de estudo antes do plantio de milho estão apresentadas na Tabela 5.

Figura 17. Temperatura média e precipitação pluviométrica na cidade de Taquarituba – SP nos meses de condução do experimento com o milho (Fonte: NASA Power, 2017 – dados de temperatura; Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas-CIIAGRO, 2017 – dados de precipitação)

Tabela 5. Resultados da análise de solo para avaliação da fertilidade da área experimental em Taquarituba - SP

Perfil	pH	MO	P	K	Ca	Mg	Al	SOB	CTC	SB	V%	Cu	Fe	Zn	Mn	B
Solo de Taquarituba - Textura muito argilosa																
cm	CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³	mmolc.dm ⁻³					%		mg.dm ⁻³					
0 a 20	5,2	37	27	2,1	40	22	2	64	98	65	11	38	0,9	2,1	0,34	
20 a 40	4,5	21	8	0,6	19	15	8	35	82	42	0,6	20	0,3	0,9	0,38	

P extraído por resina aniônica; Cu, Fe, Zn, Mn extraídos em DTPA; B extraído em H₂O quente; MO: matéria orgânica; SOB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; SB: saturação da CTC por bases

5.2.2.2. Soja

O experimento em campo com soja foi conduzido de Dezembro de 2015 a Abril de 2016 em uma área de 1 hectare da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP (latitude 22 42' 30" sul, longitude 47 38' 30" oeste, altitude 546m), no município de Piracicaba-SP, com a colaboração do grupo de estágio “PACES –

Projetando Agricultura Compromissada em Sustentabilidade”. O experimento foi instalado em área anteriormente ocupada por soja (Safr de 2014/2015) e tremço branco - *Lupinus albus* (inverno 2015). A precipitação e temperatura médias da região durante a condução do experimento são exibidas na Figura 18. As características químicas da área de estudo antes do plantio de soja estão apresentadas na Tabela 6.

Figura 18. Temperatura média e precipitação pluviométrica na área experimental situada na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP no período de condução do experimento, de 11/12/15 a 02/04/16 (Fonte: Série de Dados Climatológicos ESALQ, 2017)

Tabela 6. Resultados da análise de solo para avaliação da fertilidade da área experimental na ESALQ/USP, Piracicaba- SP

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SOB	CTC	SB	SA	S	SO ₄	Cu	Fe	Zn	Mn	B
CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³	-----mmolc.dm ⁻³ -----						V%		m%	mg.dm ⁻³	-----mg.dm ⁻³ -----					
Solo da ESALQ – Piracicaba – Textura média																		
4,8	7	37	1,6	18	5	25	0	25	50	50	0	6	1,1	22	2,1	8,2	0,22	

P extraído por resina aniônica; Cu, Fe, Zn, Mn extraídos em DTPA; B extraído em H₂O quente; MO: matéria orgânica; H+Al: acidez potencial; SOB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; SB: saturação da CTC por bases; SA: saturação Al

5.2.3. Preparo do inóculo bacteriano e tratamento de sementes

Os inóculos bacterianos de RZ2MS9 e rizóbio SEMIA 5080 foram preparados no laboratório de Genética de Micro-organismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, na ESALQ/USP, Piracicaba-SP, e levados para as áreas experimentais. Um microlitro de suspensão celular da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 (1×10^8 UFC.mL⁻¹) foi inoculado em *erlenmeyer*, contendo 1L de meio de cultura líquido LB (peptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹), agitado constantemente por aproximadamente 6 h a 28°C até atingir a fase log que corresponde a 1×10^8 UFC.mL⁻¹. O mesmo foi feito para a linhagem 5080 de rizóbio, no entanto o mesmo foi crescido em meio de cultura Levedura-Manitol (LM) a pH 6,8 (Vincent 1970) até a concentração de 1×10^8 UFC.mL⁻¹. O inoculante comercial Baraúna foi cedido pela empresa já na concentração de 1×10^8 UFC.mL⁻¹.

As sementes foram tratadas em betoneira com aplicação de 100 mL de Cropstar®, um inseticida sistêmico comercializado pela empresa Bayer (apenas no milho), 10 mL de solução açucarada (10%) e 30 mL de cada inoculante para cada 5 Kg de sementes, que foram secas à sombra antes do plantio mecânico.

5.2.4. Delineamento experimental

5.2.4.1. Milho

O experimento com o milho foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em arranjo de parcelas subdivididas com três repetições. Os fatores consistiram em fertilização nitrogenada, com quatro níveis (0, 60, 70 e 100 Kg.ha⁻¹) e inoculantes, com três níveis (controle – sem inoculação, inoculante comercial e *Bacillus* sp. RZ2MS9). A dose de 100 Kg.ha⁻¹ de nitrogênio representa o padrão adotado atualmente pela fazenda.

5.2.4.2. Soja

O experimento com a soja foi conduzido em Delineamento de Blocos Casualizados (DBC) com 3 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos consistiram em três tipos de inoculação (controle – sem inoculação bacteriana, rizóbio SEMIA 5080 e *Bacillus* sp. RZ2MS9).

5.2.5. Plantio e condução do experimento

5.2.5.1. Milho

O milho foi mecanicamente semeado no dia 27 de Outubro de 2015. As parcelas experimentais consistiram em 7 linhas de largura, com espaçamento entrelinhas de 45 cm, por 20 m de comprimento, sendo o espaçamento entre plantas de aproximadamente 35 cm. Antes do plantio, a adubação foi realizada de acordo com o resultado da análise química do solo, com aplicação de 80 Kg.ha⁻¹ de P₂O₅ e 60 Kg.ha⁻¹ de K₂O. As aplicações das diferentes doses de nitrogênio mineral (nitrato de amônio) em cobertura e reaplicação dos inoculantes bacterianos (concentração 1x10⁸ UFC.mL⁻¹, 1 L.ha⁻¹) ocorreram no estágio V2 de desenvolvimento fenológico, que é caracterizado por duas folhas totalmente desenvolvidas (Borém et al. 2015). Para a aplicação dos inoculantes foi usada bomba costal e a aplicação do fertilizante mineral foi feita manualmente. Os tratos culturais foram feitos de acordo com o manejo da fazenda

5.2.5.2. Soja

A soja foi mecanicamente semeada no dia 11 de Dezembro de 2015. As parcelas experimentais consistiram em 7 linhas de largura, com espaçamento entrelinhas de 45 cm, por 20 m de comprimento. De acordo com o resultado da análise do solo, no plantio foi realizada adubação no sulco de semeadura com 500 Kg de 4-14-8 e 115 Kg de Cloreto de potássio (60% de K₂O). Em estágio V4 de desenvolvimento da soja (Fehr e Caviness 1977), foram aplicados 5 L.ha⁻¹ de glifosato (Roundup®). Em V5, mais uma subdose de 1 L.ha⁻¹ de glifosato (Roundup®) foi aplicada. Em R1, foi realizada uma aplicação preventiva de 0,6 L.ha⁻¹ de Opera®, fungicida (BASF). Em R3, houve aplicação de 2 L.ha⁻¹ de Sett®, fertilizante líquido Ca+B da Stoller. Por fim, em R4 foram aplicados 0,30 L.ha⁻¹ de Orkestra®, fungicida (BASF).

5.2.6. Avaliação dos parâmetros relacionados à promoção de crescimento vegetal e produtividade

5.2.6.1. Milho

Na maturação, nos dias 9 e 11 de Março de 2016, seis plantas de cada parcela foram selecionadas randomicamente e suas alturas (Altura de Planta – AP) foram aferidas com ajuda de uma tábua métrica (tomando como base a distância da superfície do solo até a extremidade do pendão), assim como a altura da superfície do solo até a inserção da primeira espiga (AE). Para cada parcela, 10 espigas foram selecionadas aleatoriamente, despalhadas, e seus comprimentos foram medidos com régua milimetrada (Comprimentos de Espiga - CE). As espigas dos 5 metros centrais das 3 linhas centrais de cada parcela (área útil), foram colhidas e despalhadas manualmente, os grãos foram removidos das espigas através de um debulhador mecânico e a massa de grãos (MG) por parcela foi aferido em balança. Os valores obtidos na área útil foram ajustados para 13% de umidade e extrapolados para Kg.ha^{-1} com o intuito de indicar a produtividade. De cada parcela, 1000 grãos foram coletados randomicamente também para aferição de massa.

5.2.6.2. Soja

No início do florescimento (R1), os seguintes parâmetros envolvidos no desenvolvimento vegetal foram determinados para vinte plantas por tratamento, em cada bloco: altura (aferida da superfície do solo até a ponta do meristema apical utilizando uma tábua métrica) e o diâmetro do caule (aferida na altura do primeiro nó com auxílio de paquímetro digital). A colheita da soja foi realizada dia 02 de Abril de 2016. Foram retiradas 20 plantas inteiras de cada tratamento em cada bloco para aferição da massa total, contagem do número de vagens, massa de grãos e massa de 1000 grãos, todos provenientes dessas 20 plantas.

5.2.7. Análises estatísticas

5.2.7.1. Milho

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, sendo os diferentes bioinoculantes e as doses de nitrogênio as fontes de variação, utilizando o programa R (R Core Team 2014). As médias foram consideradas significativamente diferentes após teste Student-Newman-Kews (SNK) a um nível de 5% de significância.

5.2.7.2. Soja

Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância usando o programa R (R Core Team 2014). As médias foram consideradas significativamente diferentes após teste Student-Newman-Kews (SNK) a um nível de 5% de significância.

5.3. Resultados

5.3.1. Milho

A análise de variância indicou que a interação entre as doses de nitrogênio aplicadas e os inoculantes testados tiveram influência significativa nas variáveis: Comprimento da Espiga (CE), Altura da Planta (AP) e Altura da Espiga (AE). As variáveis Massa de Grãos (MG) e Massa de 1000 Grãos (M1000G) foram influenciadas significativamente apenas pelas doses de nitrogênio (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de variância (quadrado médio - QM) dos dados de comprimento da espiga (CE), altura da planta (AP), altura da inserção da espiga (AE), massa de grãos (MG) e massa de 1000 grãos (M1000G) após aplicação dos inoculantes (*Bacillus* sp. RZ2MS9, inoculante comercial e controle não inoculado) sob diferentes doses de nitrogênio aplicadas em milho

FV	GL	-----QM-----				
		CE	AP	AE	MG	M1000G
Inoculantes (I)	2	8,7583	0,003275	0,007789	0,701	1113,48
Resíduo 1	6	3,9472	0,009988	0,014062	0,7874	689,03
Doses N (N)	3	21,9556**	0,168777**	0,051759**	3,1711*	1486,57*
IxN	6	12,5250**	0,015976*	0,18206**	0,6139	135,3
Resíduo 2	198	2,3444	0,007097	0,006116	0,6796	339,37
CV (%)		9,67	3,89	6,63	10,53	5,28

* significativo a 0,05 e ** significativos a 0,1

Pelos dados apresentados na Tabela 8, pode-se observar que o comprimento da espiga é significativamente reduzido com a aplicação do inoculante comercial na dose 0 de N. Já na dose 100, o inoculante comercial e o RZ2MS9 aumentam significativamente o comprimento das espigas em 9 e 6 %, respectivamente em relação ao controle sem inoculação bacteriana.

Tabela 8. Médias dos comprimentos das espigas de plantas de milho submetidas a diferentes doses de nitrogênio e inoculações (*Bacillus* sp. RZ2MS9, inoculante comercial e controle não inoculado). Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas, e maiúsculas iguais nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste SNK ao nível de 5% de significância

Doses N	Inoculantes		
	RZ2MS9	Comercial	Controle
0	15,77 aA	14,10 bA	15,57 aA
60	15,87 aA	15,43 aA	16,13 aA
70	16,57 aA	16,07 aA	16,07 aA
100	16,30 aA	16,77 aA	15,37 bA

Houve resposta significativa da altura da planta e da inserção da espiga à interação entre doses de nitrogênio e inoculação, com ajuste de um modelo de regressão polinomial quadrático para a bactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 em função das diferentes doses de N e ajuste de um modelo linear crescente para a bactéria comercial e para o controle em função das diferentes doses de N (Figura 19). Através das derivações das equações de regressão, alturas máximas de planta (2,197cm) e de inserção da espiga (1,217cm) foram obtidas com a aplicação da bactéria *Bacillus* sp. RZ2MS9 nas doses de 67 Kg.ha⁻¹ N e 53 Kg.ha⁻¹ N, respectivamente. Já com relação ao inoculante comercial, para cada 10 Kg.ha⁻¹ de N adicionado observa-se um aumento de 0,02 m na altura planta e 0,01 m na altura da espiga, enquanto no controle, a cada 10 Kg.ha⁻¹ de N adicionado, obtém-se um aumento de 0,01 m na altura da planta e na altura da espiga.

Figura 19. Resposta da Altura de Plantas e Altura da Inserção de Espigas com a inoculação de: A e D) *Bacillus* sp. RZ2MS9, B e E) inoculante comercial e C e F) controle não inoculado, respectivamente, em função da aplicação das diferentes doses de nitrogênio

As variáveis Massa Total de Grãos e Massa de 1000 Grãos foram influenciadas apenas pelas doses de nitrogênio e não tiveram influências significativas dos inoculantes (Tabela 7). Em ambos os casos houve ajuste de modelo linear crescente (Figura 20), onde para cada 10 Kg.ha⁻¹ de N aplicado, a massa de grãos aumenta 0,14 Kg e a massa de 1000 grãos aumenta 2,9 g.

Figura 20. Massa de Grãos (A) e Massa de 1000 Grãos (B) de milho em função da aplicação de diferentes doses de nitrogênio

Embora não tenha sido observado um resultado estatisticamente significativo entre as Massas de Grãos e Massas de 1000 Grãos de acordo com a inoculação bacteriana, se consideradas todas as doses de nitrogênio, a aplicação do *Bacillus* sp. RZ2MS9 proporcionou uma produtividade média final de 12.018 Kg.ha⁻¹ contra 11.389 Kg.ha⁻¹ do controle não inoculado, uma diferença de 629 Kg.ha⁻¹, ou 10,5 sacas de milho por hectare. Na dose de 70 Kg.ha⁻¹ N, a produtividade proporcionada pela inoculação do *Bacillus* sp. RZ2MS9 alcançou 12.785 Kg.ha⁻¹ contra 11.807 Kg.ha⁻¹ do controle, uma diferença de 978 Kg.ha⁻¹, ou de 16,3 sacas de milho por hectare reduzindo em 30% a dose de N adotada pela fazenda (Tabela 9).

Tabela 9. Médias da produtividade de milho submetido a diferentes doses de nitrogênio e inoculações (*Bacillus* sp. RZ2MS9, inoculante comercial e controle não inoculado). Diferenças não significativas de acordo com o teste SNK ao nível de 5% de significância

Doses N	Inoculantes		
	RZ2MS9	Comercial	Controle
0	10.651,85	9.377,78	11.022,22
60	12.074,07	11.674,07	11.214,81
70	12.785,19	11.629,63	11.807,41
100	12.562,96	12.933,33	11.511,11
Média	12.018,52	11.403,70	11.388,89

5.3.2. Soja

A aplicação do *Bacillus* sp. RZ2MS9 na soja aumentou significativamente sua altura e seu diâmetro em 4 e 8%, respectivamente, com relação ao controle não inoculado (Figura 21 A e B). A altura promovida por RZ2MS9 foi significativamente diferente e maior inclusive que a altura promovida pelo rizóbio SEMIA 5080 (Figura 21 A). Além disso, as aplicações do *Bacillus* sp. RZ2MS9 e do rizóbio SEMIA 5080 aumentaram significativamente em 29 e 39%, respectivamente, a massa de 20 plantas quando comparadas ao controle não inoculado. Esse incremento não foi significativamente diferente entre os inoculantes bacterianos (Figura 21 C).

Figura 21. Médias das alturas (A) e diâmetros (B), aferidas no início do estágio R1, e massa de 20 plantas (C), aferida na colheita, da soja para cada tratamento adotado: controle não inoculado, rizóbio SEMIA 5080 e *Bacillus* sp. RZ2MS9. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância

O rizóbio SEMIA 5080 aumentou significativamente em 39% o número médio de vagens nas 20 plantas avaliadas (Figura 22 A). Com relação à massa de grãos das 20 plantas, apesar de um aumento de 11 e 36% com a aplicação de RZ2MS9 e rizóbio, respectivamente, os tratamentos não mostraram diferenças significativas entre eles (Figura 22 B), assim como a massa de 1000 grãos (Figura 22 C). As massas médias de grãos das 20 plantas avaliadas refletiram nas produtividades expressas em Kg.ha^{-1} apresentadas na Tabela 10. Apesar da diferença não ter sido significativa estatisticamente, a inoculação com RZ2MS9 levou a uma produção de soja de 6.584 Kg.ha^{-1} , enquanto a inoculação com o rizóbio levou à produção de 8.039 Kg.ha^{-1} e o controle não inoculado apenas 5.929 Kg.ha^{-1} . Isso reflete em 655 Kg.ha^{-1} a mais que o controle aplicando o *Bacillus* sp. RZ2MS9, ou 11 sacas de soja a mais por hectare, e 2.110 Kg.ha^{-1} a mais que o controle aplicando o rizóbio SEMIA 5080, ou 35 sacas de soja a mais por hectare.

Figura 22. Médias dos números de vagens (A), massa de grãos (B) e massa de 1000 grãos (C) provenientes de 20 plantas de soja colhidas por bloco para os tratamentos adotados: controle não inoculado, rizóbio SEMIA 5080 e *Bacillus* sp. RZ2MS9. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de significância

Tabela 10. Médias da produtividade de soja de acordo com os tratamentos adotados: *Bacillus* sp. RZ2MS9, rizóbio SEMIA 5080 e controle não inoculado. Diferenças não significativas de acordo com o teste SNK ao nível de 5% de significância

Tratamentos	Produtividade (Kg.ha^{-1})
RZ2MS9	6.584,2
Rizóbio	8.039,4
Controle	5.928,7

5.4. Discussão

O uso excessivo de fertilizantes minerais em culturas agrícolas se tornou uma ameaça séria ao meio ambiente. Além disso, o preço desses insumos tem aumentado de maneira expressiva especialmente em países importadores como o Brasil (Hungria e Megías 2013). Nesse cenário, a popularidade e o mercado potencial de inoculantes microbianos contendo Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) têm aumentado substancialmente (Berg 2009). Esses inoculantes representam uma possível solução para a redução da fertilização mineral sem comprometimento da produtividade e agem através de diversos mecanismos que incluem especialmente

a produção de fitormônios, fixação de nitrogênio não simbiótica, solubilização de P e supressão de fitopatógenos (Ahemad e Kibret 2014). Os efeitos destes micro-organismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos e vão desde efeitos benéficos sobre a germinação das sementes até a produção de grãos (Viruel et al. 2014).

A inoculação de sementes com inoculantes bacterianos líquidos se destaca pela facilidade de uso e por requerer reduzida quantidade de produto, e por isso se tornou a forma mais comum de uso prático, podendo ser aplicado mecanicamente no momento da semeadura em campo (Deaker et al. 2004). No presente trabalho a aplicação do inoculante líquido formulado com a RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9 foi comparado ao desempenho de inoculantes utilizados comercialmente nas culturas do milho e da soja em condições de campo. Parâmetros envolvidos no desenvolvimento vegetal, assim como parâmetros produtivos, foram avaliados. No experimento conduzido com a cultura do milho, o efeito da inoculação com RZ2MS9 foi, ainda, associado à adubação nitrogenada com o intuito de verificar uma possível redução do uso desses fertilizantes quando combinada à aplicação bacteriana. Não foram necessárias alterações drásticas nas práticas adotadas nos plantios tanto do milho quanto da soja, já que ambos convencionalmente apresentam a etapa de tratamento de sementes antes do plantio. Além disso, o custo de produção do inoculante, se considerado apenas o meio de cultura no qual RZ2MS9 foi crescido, foi inferior a R\$1,00 por hectare plantado, tanto da soja quanto do milho. Atualmente, inoculantes comerciais formulados com *Azospirillum* spp. situam-se na faixa de R\$11,00 por hectare (Chavarria e Mello 2011), mas é claro que os gastos com infraestrutura e propriedade intelectual também devem ser considerados.

Com relação ao experimento realizado com o milho, os resultados para o comprimento da espiga indicaram efeito positivo da inoculação conjuntamente com adubação nitrogenada na cultura. Na dose 0 de nitrogênio, RZ2MS9 não apresentou efeito significativo sobre esse parâmetro. A deficiência de nutrientes como o nitrogênio já foi reportada por influir negativamente no tamanho de espigas, especialmente até o estágio R3, estágio de enchimento de grãos (Repke et al. 2013). No entanto, na dose 100 de nitrogênio, espigas provenientes do tratamento com RZ2MS9 se mostraram em média 6% mais compridas que espigas do tratamento não inoculado. Assim como no presente trabalho, Cavallet et al. (2000) obtiveram crescimento significativo de 6% no comprimento de espigas provenientes dos tratamentos inoculados com um produto à base de *Azospirillum* spp. Estes mesmos autores encontraram correlação positiva e significativa entre o comprimento da espiga e a produtividade de grãos.

Pela análise de regressão foi observada uma resposta quadrática para a Altura das Plantas (AP) e Altura da Inserção de Espiga (AE) com a aplicação de RZ2MS9 em função das crescentes doses de N mineral, o que pode refletir em economia de adubação nitrogenada. Os valores máximos observados para AP e AE foram de 2,197 m e 1,217 m para as doses aplicadas de 67 e 53 Kg.ha⁻¹ de N, respectivamente, com a inoculação de RZ2MS9. Para alcançar essas mesmas AP e AE utilizando o inoculante comercial, são necessários 73 e 122 Kg.ha⁻¹ de N e, com o controle, 87 e 66 Kg.ha⁻¹ de N, respectivamente. Dessa forma, considerando a AP, a aplicação de RZ2MS9 fornece uma economia de 6 Kg.ha⁻¹ de N com relação ao inoculante comercial e de 20 Kg.ha⁻¹ de N em relação ao controle para obter a mesma AP de 2,197 m. Já com relação à AE, a aplicação de RZ2MS9 proporciona uma economia de 69 Kg.ha⁻¹ de N quando comparada ao inoculante comercial e de 13 Kg.ha⁻¹ de N quando comparado ao controle não inoculado para alcançar a mesma AE de 1,217 m.

O aumento da altura de plantas de milho e inserção da espiga proporcionado por RZ2MS9 pode estar associado a estímulos da bactéria pela sua produção e liberação do fitormônio Ácido Indol Acético (AIA) discutido no Capítulo 4. Esse fitormônio é responsável por processos de divisão e expansão celular e pode levar ao alongamento do colmo (ĐorĐević et al. 2015) e, como consequência, afetar a altura final das plantas. Um dos efeitos mais proeminentes do AIA, entretanto, é o aumento da área superficial de raízes, que possibilita maior volume de exploração

do solo e, conseqüentemente, maior aquisição de água e nutrientes (Vacheron et al. 2013). Plantas crescendo melhor, em troca, liberam maiores quantidades de carbono (C) nos exsudatos. A liberação de mais C solicita aumento da atividade microbiana e esse processo continua como um ciclo. O processo todo torna mais N disponível no solo, assim a planta é capaz de adquirir mais desse nutriente (Adesemoye et al. 2009). Nesse sentido, a inoculação com RPCPs foi reportada por aumentar a aquisição de N pela planta, e em alguns casos, afetar positivamente o crescimento de uma série de gramíneas como cana-de-açúcar (Suman et al. 2005), arroz (Islam et al. 2009), trigo (Kapulnik et al. 1985), milho e sorgo (Lin et al. 1983). De fato, em *Azospirillum* spp., a produção de auxina (AIA), ao invés da FBN, é geralmente considerada por ser a maior responsável pela estimulação do crescimento (Dobbelaere et al. 1999).

De maneira geral, existe uma correlação positiva entre os parâmetros altura de planta e altura de inserção da espiga (Santos et al. 2002). Porém, segundo Cavallet et al. (2000) plantas de milho muito altas podem apresentar efeitos negativos ligados ao tombamento. Por outro lado, Possamai et al. (2001) afirmam que as perdas e a pureza dos grãos na colheita mecanizada, dentre outros fatores, são diretamente influenciadas pela altura das plantas e, principalmente, pela altura de inserção da espiga. Assim, plantas mais altas e com inserção de espigas também mais altas apresentam vantagens na colheita. De acordo com Silva et al. (2006), a altura da planta é ainda um parâmetro que determina o grau de desenvolvimento da cultura; esses autores encontraram correlação positiva entre esse parâmetro e a produtividade e inferiram que plantas maiores tendem a ser mais produtivas provavelmente por sofrerem menos estresse durante o desenvolvimento e por isso acumulam maiores quantidades de reservas no colmo. Além disso, alturas, tanto de planta quanto de inserção de espiga, têm correlação direta com a produção de biomassa verde e biomassa seca (Newmann et al. 2017), características altamente desejadas na produção de milho planta inteira para ensilagem.

O efeito inibitório sobre os incrementos de altura das plantas e da inserção da espiga sob doses mais altas de nitrogênio com aplicação de RZ2MS9 é característico de efeitos proporcionados por bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas. O processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) demanda muita energia, portanto, quando há muito N disponível, a atividade da nitrogenase é paralisada (Luciński et al. 2002). Além disso, bactérias diazotróficas podem ter sua colonização inibida em altas concentrações de N fertilizante, como observado por Fuentes-Ramírez et al. (1999) em cana-de-açúcar, onde o número de *Acetobacter diazotrophicus* diminuiu em plantas fertilizadas com altas doses de N quando comparado ao número de bactérias em plantas que receberam pequenas doses de fertilizante nitrogenado.

Mesmo que os genes relacionados ao processo de FBN em RZ2MS9 não tenham sido detectados em seu genoma, como demonstrado no Capítulo 2, e esse não seja o mecanismo principal pelo qual bactérias de vida livre beneficiem o crescimento vegetal (Olivares et al. 2013), não se pode ignorar que essa bactéria foi positiva para FBN *in vitro*; assim não se descarta a possibilidade que seu efeito benéfico sobre o crescimento vegetal possa ocorrer também por FBN ou por uma combinação de mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal cujos genes foram detectados em seu genoma (N. acesso NZ_MJBF01000001.1), especialmente a produção de AIA e solubilização de P.

Os parâmetros massa de grãos e massa de 1000 grãos, e conseqüentemente a produtividade, não tiveram influência significativa da inoculação bacteriana, sendo afetados apenas pelas doses de nitrogênio com um aumento linear desses parâmetros conforme os níveis de adubação foram aumentando. O nitrogênio é um elemento essencial ao pleno crescimento, desenvolvimento e produtividade da cultura do milho, uma vez que participa da estruturação dos aminoácidos, substâncias presentes na constituição das proteínas. A formação dos grãos é influenciada pela presença de proteínas na planta e a produção do grão é, portanto, dependente do suprimento de N (Inamullah et al. 2011) que, somado ao seu alto preço, acaba representando 75% dos custos relacionados à adubação do milho, e cerca

de 40% dos custos totais de produção da cultura (Machado et al. 1998). Na literatura, existem relatos tanto do efeito significativo da interação entre RPCP e doses crescentes de nitrogênio (Oliveira et al. 2012, Moraes et al. 2016, Machado et al. 1998) quanto o efeito significativo apenas das doses do fertilizante (Basi 2013, Marini et al. 2015) sobre a produtividade final do milho em condições de campo.

Como relatado, os efeitos positivos da bactéria RZ2MS9 sobre o crescimento vegetal de milho parecem não ter refletido em incrementos significativos na produtividade final da cultura. A ausência de resposta quanto à inoculação bacteriana pode estar relacionada a uma série de fatores físicos e químicos do solo e a fatores ambientais (Praveen Kumar et al. 2014). As condições do solo e climáticas podem influenciar a estabilidade, a sobrevivência e até mesmo a atuação desses organismos no solo não proporcionando, assim, os benefícios esperados (Okon e Labandera-Gonzalez 1994). Outro fato bastante destacado é a especificidade da associação entre a bactéria e a planta, sendo consenso que o genótipo da planta é um fator determinante para a obtenção dos benefícios oriundos da inoculação (Moreira 2014). Nesse sentido, Dotto et al. (2010) e Alves (2007) relataram resultados contrastantes de produtividade de diferentes híbridos de milho com aplicação bacteriana de *Herbaspirillum seropedicae* nas mesmas condições de adubação. Portanto, torna-se imprescindível dar continuidade em estudos utilizando a RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9, avaliando diferentes condições de campo, com aplicações em diferentes genótipos, em diferentes períodos de instalação da cultura para obtenção de resultados mais consistentes.

Linhagens de *Azotobacter* são estudadas desde 1901 (Beijerinck 1901) e são utilizadas como bioinoculantes por aumentar o crescimento vegetal tanto por FBN quanto pela produção de reguladores de crescimento como AIA, giberelinas e citocininas (Wani et al. 2016). Entretanto, o inoculante comercial utilizado, composto por linhagens desse gênero, apresentou um efeito benéfico vegetal menos expressivo que o efeito proporcionado pela bactéria RZ2MS9. E, assim como o presente trabalho, o desempenho de *Azotobacter* spp. já foi reportado como inferior ao de *Bacillus* spp. (Kloepper e Beauchamp 1992, Gholami et al. 2012).

Ainda que experimentos com fertilização nitrogenada proporcionem produtividades superiores quando comparado ao uso de inoculantes bacterianos, isso não reduz o potencial de seu uso (Hungria 2011). Mesmo que não significativa estatisticamente, a aplicação bacteriana de RZ2MS9 no milho, com uma redução de 30% da adubação nitrogenada, proporcionou uma produtividade final de 16,3 sacas de milho por hectare a mais que o controle não inoculado. Economicamente isso reflete em aproximadamente R\$570,00 a mais por hectare devido ao incremento de produtividade (valor médio da saca do milho de R\$35,00 atualmente de acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA, 2017), e uma economia de R\$30 por hectare com a redução da adubação nitrogenada, sem adicionar o ganho ambiental do processo pela redução das perdas de fertilizante para mananciais e atmosfera, dependendo de sua fonte. Tudo isso com um custo inferior a R\$1,00 por hectare. Nesse sentido, a utilização de micro-organismos na agricultura apresenta grande potencial de contribuir para a economia de fertilizantes nitrogenados cooperando com o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

Com relação ao experimento da soja, incrementos significativos nos parâmetros envolvidos no desenvolvimento vegetal avaliados (altura, diâmetro e peso de plantas) foram observados em plantas inoculadas tanto com o *Bacillus* sp. RZ2MS9 quanto com o rizóbio. *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080, um rizóbio simbiote que apresenta alta especificidade com a cultura da soja, tem sido estudado há décadas e é recomendado para a cultura da soja desde 1992 (Bizarro 2004, Vargas et al. 1992). O fato de o *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentar resultados de desenvolvimento da soja comparáveis com aqueles proporcionados por essa linhagem é um indício forte de seu potencial promotor de crescimento nessa cultura. Linhagens de *Bacillus* spp. já foram reportadas como promotores de crescimento em soja, tais como *Bacillus cereus* UW85 responsável por aumentar a emergência de plantas, nodulação,

altura da parte aérea, comprimento de raiz e produtividade de sementes de soja em condições de campo (John Bullied et al. 2002). Um ponto relevante a ser mencionado é que essa linhagem de *B. cereus* UW85 teve seus resultados significativamente influenciados pelo local, estação de crescimento e formulação inoculante (Halverson e Handelsman 1991). *B. thuringiensis* também já foi reportado como promotor de crescimento em soja, afetando uma variedade de parâmetros, incluindo nodulação, fixação de N e produtividade em condições de campo e em vaso (Schmidt et al. 2015). Outra espécie de *Bacillus*, o *B. subtilis*, descrito como promotor de crescimento em soja, teve seu efeito benéfico sobre a cultura atribuído à sua produção de fitormônios, como o AIA, solubilização de P e inibição de fungos patogênicos (Tsigie et al. 2011). O efeito estimulatório do desenvolvimento radicular de soja por *B. subtilis* levou a um incremento na aquisição de água e nutrientes minerais (Araujo et al. 2005). Além disso, sabe-se que os pelos radiculares são sítios de infecção de rizóbios, e é possível que os efeitos proporcionados por essa bactéria sobre o crescimento da soja possam ser atribuídos ao aumento do número de sítios de infecção disponíveis para os rizóbios (Araújo e Hungria 1999). Apesar da nodulação da soja não ter sido avaliada no presente trabalho, o efeito da aplicação de RZ2MS9 na soja pode ter ocorrido pelo incremento de seu sistema radicular, devido a sua produção comprovadamente efetiva de AIA, disponibilizando mais sítios de infecção por rizóbios do solo remanescentes do cultivo da soja previamente plantada na mesma área.

Para os parâmetros envolvidos na produtividade da soja, no entanto, a aplicação bacteriana, tanto de RZ2MS9 quanto do rizóbio, não forneceu incrementos significativos quando comparada ao controle não inoculado. Existem muitos fatores que interferem na FBN e podem diminuir o efeito de rizóbios, especialmente temperatura, umidade, pH do solo, uso de produtos químicos como pesticidas, fungicidas, inseticidas além também da concentração de células bacterianas viáveis no inoculante (Figueiredo et al. 2008). É difícil apontar apenas um fator como responsável pelo efeito não significativo de rizóbios na produtividade da soja no presente experimento e por isso mais avaliações devem ser realizadas em diferentes condições experimentais. No entanto, o potencial de incremento de produtividade é claro e, apesar de não significativos, aumentos na produtividade da soja que recebeu a aplicação do rizóbio e do *Bacillus* RZ2MS9 foram de 35 e 11 sacas por hectare a mais que o controle, respectivamente, que equivalem a incrementos de R\$2.625,00 e R\$825,00 oriundos da produtividade adicional proporcionada comparada ao controle não inoculado (valor médio da saca da soja de R\$75,00 atualmente segundo o CEPEA, 2017).

Muitos estudos têm retratado ainda, que o efeito benéfico ao vegetal proporcionado pelos rizóbios poderia ser potencialmente melhorado com a adição de RPCPs (Aung et al. 2013). E de fato, a coinoculação ou inoculação mista produzindo efeitos múltiplos, tem superado os resultados obtidos quando organismos são utilizados de forma isolada em uma variedade de leguminosas (Martins et al. 2004, Kumar e Chandra 2008, Sánchez et al. 2014).

Efeitos benéficos de diversas linhagens de *Bacillus* sobre a nodulação, fixação biológica de nitrogênio, aquisição de nutrientes e até mesmo produtividade de grãos quando em coinoculação com rizóbios têm sido descritos, como os de *B. megaterium* (Elkoca et al. 2010), *B. thuringiensis* (Mishra et al. 2009), *B. subtilis* (Elkoca et al. 2010, Tsigie et al. 2011, Araújo e Hungria 1999), *B. cereus* (John Bullied et al. 2002). E, de acordo com nosso conhecimento, Histick® N/T (Becker Underwood Inc.) é o único inoculante comercial formulado com rizóbios que incorporou uma RPCP, o *B. subtilis* linhagem MBI600, visando controle biológico. Nesse cenário, o potencial da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 em potencializar o efeito benéfico de rizóbios na soja será avaliado futuramente.

Cabe ainda salientar que *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentou efeitos positivos sobre o desenvolvimento de tomateiro (Capítulo 4), milho e soja demonstrando seu grande potencial de atuar em uma ampla gama de hospedeiros, característica altamente desejável na formulação de bioinoculantes por questões práticas.

REFERÊNCIAS

- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58, 921-929.
- Ahemad M, Kibret M (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26, 1-20.
- Alves BJ, Boddey RM, Urquiaga S (2003). The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and soil*, 252(1), 1-9.
- Alves G (2007). Efeito da inoculação de bactérias Diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Bulkborderia* em genótipos de milho. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.
- Araújo FF, Henning AA, Hungria M (2005). Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1639-1645.
- Araújo FD, Hungria M (1999). Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/ *Bradyrhizobium elkanii*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 1633-1643.
- Aung TT, Buranabanyat B, Piromyong P, Longtonglang A, Tittabutr P, Boonkerd N, Teamroong N (2013). Enhanced soybean biomass by co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and plant growth promoting rhizobacteria and its effects on microbial community structures. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 3858-3873.
- Babalola OO (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32, 1559-1570.
- Basi S (2013). Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho (2013). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Chopinzinho – PR, Brasil.
- Batista BD (2012). Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba-SP, Brasil.
- Beijerinck MW (1901). Über oligonitrophile mikroben. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg.*, 7, 561-582.
- Berg G (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11-18.
- Bettiol W, Morandi MAB, Pinto ZV, Paula Júnior TD, Correa EB, Moura AB, Bezerra JL (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. *Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente (Documento) 113p*.
- Bizarro MJ (2004). Inoculação de soja em solo submetido a diferentes sistemas de manejo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, Brasil.
- Borém A, Galvão JCC, Pimentel MA (2015). Milho: do plantio à colheita. Viçosa: Ed. UFV.
- Cavallet LE, Pessoa ADS, Helmich JJ, Helmich PR, Ost CF (2000). Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4, 129-132.
- CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (2017). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq, Piracicaba-SP. Indicador de preços de milho, disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/milho.aspx>> e Indicador de preços de soja, disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx>>. Acesso em: Fevereiro de 2017.

- CIIAGRO – Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. Disponível em: <www.udop.com.br/download/estatistica/economia_chuvas/1994a2016_historico_chuva_taquaritiba.pdf>. Acesso em: Fevereiro de 2017.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_13_12_03_45_boletim_graos_fevereiro_2017.pdf>. Acesso em: Fevereiro de 2017.
- Chavarria G, Mello N (2011). Bactérias do gênero *Azospirillum* e sua relação com gramíneas. *Revista Plantio Direto*, 125
- Deaker R, Roughley RJ, Kennedy IR (2004). Legume seed inoculation technology - a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1275-1288.
- De Bruijn FJ (2015). Biological nitrogen fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing, 215-224.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212, 153-162.
- DorĐević S, Stanojević D, Pantić V, Šimić B (2015). Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) seedlings by bacterial auxin, in vitro. In *50th Croatian & 10th International Symposium on Agriculture, 16-20 February 2015, Opatija, Croatia. Proceedings* (pp. 230-234). University of Zagreb, Faculty of Agriculture.
- Dotto AP, do C Lana M, Steiner F, Frandoloso JF (2010). Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5.
- Elkoca E, Turan M, Donmez MF (2010). Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'elkoca-05'). *Journal of plant nutrition*, 33, 2104-2119.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2015) World fertilizer trend and outlook to 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4324e.pdf>> Acesso em: Novembro de 2015
- Fehr WR, Caviness CE (1977). Stages of soybean development. Iowa State University Cooperative Extension Service, Special Report 80.
- Ferreira AL (2015). Fixação biológica de nitrogênio pode reduzir as emissões de GEE na agricultura. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8313328/fixacao-biologica-de-nitrogenio-pode-reduzir-as-emissoes-de-gee-na-agricultura>>. Acesso em: Novembro de 2016.
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J, Martínez-Romero E (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 117-128.
- Gholami A, Biyari A, Gholipoor M, Asadi Rahmani H (2012). Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43, 1263-1272.
- Halverson LJ, Handelsman J (1991). Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2767-2770.
- Hungria M, Megías M (2013). Uma década de ouro se aproxima para a microbiologia do solo: expectativas da pesquisa, da indústria, dos agricultores e da sociedade. In *Iberoamerican conference on beneficial plant-microorganism-environment interactions*. Anais CNPSO, 510-517.
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425.

- Hungria M (2011). *Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo*. Embrapa Soja.
- Inamullah NR, Shah NH, Arif M, Siddiq M, Mian IA (2011). Correlations among grain yield and yield attributes in maize hybrids at various nitrogen levels. *Sarhad Journal of Agriculture*, 27, 531-538.
- IPNI (International Plant Nutrition Institute). Evolução do consumo aparente de N, P, K e Total de NPK no Brasil. Disponível em: <<http://brasil.ipni.net/article/BRS-3132>>. Acesso em: Junho de 2016.
- Islam MR, Madhaiyan M, Deka BH, Yim W, Lee G, Saravanan VS, Sa T (2009). Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 1213-1222.
- John Bullied W, Buss TJ, Kevin Vessey J (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. *Canadian Journal of Plant Science*, 82, 291-298.
- Figueiredo MVB, Lira Júnior MA, Araújo ASF, Silveira JAG (2008). Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N₂. In: Figueiredo MVB, Burity HA, Stamford NP Santos CERS (Org.). *Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Guaíba: Agrolivros, 39-64.
- Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 881-887.
- Kloepper JW, Beauchamp CJ (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1219-1232.
- Kumar R, Chandra R. (2008). Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in lentil. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4, 297-301.
- Lin W, Okon Y, Hardy RW (1983). Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1775-1779.
- Luciński R, Polcyn W, Ratajczak L (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*, 49, 537-546.
- Machado AT, Sodek L, Döbereiner J, Reis VM (1998). Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33, 961-970.
- Marini D, Guimarães VF, Dartora J, Lana MDC, Pinto Júnior AS (2015). Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. *Revista Ceres*, 62, 117-123.
- Martins A, Kimura O, Goi SR, Baldani JI (2004). Effect of co-inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia on development of common bean plants (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Floresta e Ambiente*, 11, 33-39.
- Masciarelli O, Llanes A, Luna V (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169, 609-615.
- Mendes IC, Reis Junior FB. Micro-organismos do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/188/>>. Acesso em: Junho de 2015.
- Merriman PR, Price RD, Kollmorgen JF, Piggott T, Ridge EH (1974). Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Crop and Pasture Science*, 25, 219-226.
- Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, Bisht JK, Kundu S, Gupta HS (2009). Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 753-761.

- Morais TPD, Brito CHD, Brandão AM, Rezende WS (2016). Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. *Revista Ciência Agronômica*, 47, 290-298.
- Moreira JCF (2014). Milho safra submetido à inoculação com bactérias diazotróficas associativas e doses de nitrogênio. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso, Rondonópolis – MT, Brasil.
- NASA Power (2017). Disponível em <www.power.larc.nasa.gov>. Acesso em: Fevereiro de 2017
- Neumann M, Leão GFM, Coelho MG, Figueira DN, Spada CA, Perussolo LF (2017). Aspectos produtivos, nutricionais e bioeconômicos de híbridos de milho para produção de silagem. *Arquivos de Zootecnia*, 66, 51-57.
- Nogueira MA, Hungria M (2013). Oportunidades e ameaças à contribuição da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas no Brasil. In *Iberoamerican conference on beneficial plantmicroorganism-environment interactions*, Microorganisms for future agriculture, Sevilha. Anais, CNPSO.
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 1591-1601.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 486-494.
- Oliveira MD, Zucareli C, Spolaor LT, Domingues AR, Ferreira AS (2012). Desempenho agrônômico do milho sob adubação mineral e inoculação das sementes com rizobactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16, 1040-1046.
- Praveen Kumar G, Mir Hassan Ahmed SK, Desai S, Leo Daniel Amalraj E, Rasul A (2014). In vitro screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *International journal of bacteriology*, 2014.
- Pereira JRA (2013). O mercado de silagem de milho no Brasil. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/mypoint/253066/p_o_mercado_de_silagem_de_milho_no_brasil_cadeia_produtiva_graos_milho_silagem_mercado_5217.aspx> Acesso em: Outubro de 2016.
- PETROBRÁS - Petróleo Brasileiro S.A. Análise do Mercado de Fertilizantes. 2009. Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/agrominerais/livros/AnaliseMercado.pdf>>. Acesso em: Junho de 2016.
- Possamai JM, Souza CD, Galvão JCC (2001). Sistemas de preparo do solo para o cultivo do milho safrinha. *Bragantia*, 60, 79-82.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing (Version 3.0. 2). *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Repeke RA, Cruz SJS, da Silva CJ, Figueiredo PG, Bicudo SJ (2013). *Azospirillum brasilense* efficiency in combination with doses of nitrogen in the development of maize. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 12, 214-226.
- Sánchez AC, Gutiérrez RT, Santana RC, Urrutia AR, Fauvart M, Michiels J, Vanderleyden J (2014). Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, 62, 105-112.
- Santos PG, Juliatti FC, Buiatti AL, Hamawaki OT (2002). Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho em Uberlândia, MG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 597-602.
- Schmidt J, Messmer M, Wilbois KP (2015). Beneficial microorganisms for soybean (*Glycine max* (L.) Merr), with a focus on low root-zone temperatures. *Plant and Soil*, 397, 411-445.
- Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba – SP, Departamento de Engenharia de Biosistemas. Disponível em: <www.esalq.usp.br/departamentos/leb/postocon.html>. Acesso em: Janeiro de 2017.

- Silva DD, Vitorino ACT, Souza LD, Gonçalves MC, Roscoe R (2006). Culturas antecessoras e adubação nitrogenada na cultura do milho, em sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 5, 75-88.
- Stefan M, Dunca S, Olteanu Z, Oprica L, Ungureanu E, Hritcu L, Cojocaru D (2010). Soybean (*Glycine max* [L] Merr.) inoculation with *Bacillus pumilus* Rs3 promotes plant growth and increases seed protein yield: relevance for environmentally-friendly agricultural applications. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 5, 131-138.
- Suman A, Gaur A, Shrivastava AK, Yadav RL (2005). Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Plant Growth Regulation*, 47, 155-162.
- Toyota K (2015). *Bacillus*-related spore formers: attractive agents for plant growth promotion. *Microbes and Environments*, 30, 205-207.
- Tsigie A, Tilak KV, Saxena AK (2011). Field response of legumes to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 971.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Prigent-Combaret C (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356.
- Vargas MAT, MENDES IDC, Suhel AR, Peres JRR (1992). *Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja*. Planaltina, DF, Brazil: EMBRAPA-CPAC.
- Vessey JK (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- Vicent JM (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *Blackwell Scientific*.
- Viruel E, Erazzú LE, Martínez Calsina L, Ferrero MA, Lucca ME, Siñeriz F (2014). Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14, 819-831.
- Wani SA, Chand S, Wani MA, Ramzan M, Hakeem KR (2016). *Azotobacter chroococcum* - a potential biofertilizer in agriculture: an overview. In *Soil Science: Agricultural and Environmental Perspectives*. Springer International Publishing, 333-348.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescente aumento na população mundial tem levado a uma alta demanda alimentar que somente poderá ser suprida pelo incremento da produtividade vegetal, já que as áreas de plantio apresentam limitações físicas e as fontes de recursos naturais relativas à fertilização química são finitas. Nesse sentido, o uso de micro-organismos associados a plantas tem se mostrado a alternativa mais sustentável de aumento de produtividade pelo seu potencial de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes minerais. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) efetivas, especialmente em gramíneas, têm sido, portanto, cada vez mais buscadas em diferentes regiões do mundo, e o *Bacillus* sp. RZ2MS9, um representante da biodiversidade amazônica brasileira, se apresenta como um grande candidato por seu expressivo efeito benéfico em diferentes culturas de interesse global, como o tomateiro, o milho e a soja. O genoma dessa bactéria, e os genes detectados potencialmente envolvidos em seu efeito benéfico, apresentados no Capítulo 2, fornecem as bases necessárias para a confirmação futura do papel de cada um dos mecanismos bacterianos e seu efeito na interação, o que irá certamente colaborar com o direcionamento das aplicações práticas dessa bactéria, aumentando os possíveis benefícios no campo. Sua classificação filogenética, exibida no Capítulo 3, sugere a potencial possibilidade de seu uso seguro no campo por se afiliar proximamente com bactérias já utilizadas na agricultura há mais de 60 anos. Além disso, a capacidade do *Bacillus* sp. RZ2MS9 em aumentar as raízes e biomassa da parte aérea de tomateiro Micro-Tom, enquanto não proporcionou os mesmos efeitos em tomateiros mutantes insensíveis a auxinas, sugere a participação do mecanismo de produção de AIA na promoção de crescimento vegetal desencadeada por RZ2MS9, como demonstrada no Capítulo 4. Finalmente, os resultados da aplicação dessa bactéria nas culturas do milho e da soja em condições de campo, exibidos no Capítulo 5, são bastante promissores por demonstrarem incrementos significativos de desenvolvimento e tendência à incremento de produtividade com redução da aplicação nitrogenada. Os resultados adquiridos no presente trabalho vão, portanto, de encontro à grande expectativa na obtenção de linhagens microbianas efetivas visando sistemas agrícolas mais sustentáveis.

ANEXOS

ANEXO A. Genes de mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal detectados no genoma de *Bacillus* sp. RZ2MS9 apresentados com seus números de acesso NCBI, tamanho do gene em pares de bases (entre parênteses), produto codificado, classificação KO (*KEGG Orthology*) fornecida pelo programa BlastKOALA e classificação COG (*Cluster of Ortholog Groups*) fornecida pelo programa COGnitor (Continua)

Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Esporulação	OGY04772.1 (219)	sig3.4	<i>RNA polymerase sporulation-specific sigma factor</i>	K03091	COG1595
Esporulação	OGY05779.1 (259)	sig3.4	<i>RNA polymerase sporulation-specific sigma factor</i>	K03091	COG1191
Esporulação	OGY05780.1 (239)	sig3.4	<i>RNA polymerase sporulation-specific sigma factor</i>	K03091	COG1191
Esporulação	OGY05943.1 (252)	sig3.4	<i>RNA polymerase sporulation-specific sigma factor</i>	K03091	COG1191
Esporulação	OGY06203.1 (237)	sig3.4	<i>RNA polymerase sporulation-specific sigma factor</i>	K03091	COG1191
Esporulação	OGY06746.1 (264)	spo0A	<i>Response regulator, stage 0 sporulation protein A</i>	K07699	COG0745
Esporulação	OGY02638.1 (122)	spo0F	<i>Response regulator, stage 0 sporulation protein F</i>	K02490	COG2204
Esporulação	OGY03170.1 (251)	spo0M	<i>Sporulation-control protein</i>	K06377	COG4326
Esporulação	OGY06303.1 (182)	spo0B	<i>Stage 0 sporulation protein B (sporulation initiation phosphotransferase)</i>	K06375	COG3290
Esporulação	OGY05944.1 (146)	spoIIAB	<i>Stage II sporulation protein AB (anti-sigma F factor)</i>	K06379	COG2172
Esporulação	OGY05945.1 (116)	spoIIAA	<i>Stage II sporulation protein AA (anti-sigma F factor antagonist)</i>	K06378	COG1366
Esporulação	OGY05961.1 (215)	spoIIM	<i>Stage II sporulation protein M</i>	K06384	COG1300
Esporulação	OGY05781.1 (305)	spoIIIGA	<i>Stage II sporulation protein GA (sporulation sigma-E factor processing peptidase)</i>	K06383	
Esporulação	OGY04739.1 (823)	spoIIE	<i>Stage II sporulation protein E</i>	K06382	COG2208
Esporulação	OGY03361.1 (384)	spoIIP	<i>Stage II sporulation protein P</i>	K06385	COG0860
Esporulação	OGY03519.1 (384)	spoIIP	<i>Stage II sporulation protein P</i>	K06385	COG0860
Esporulação	OGY03050.1 (287)	spoIIR	<i>Stage II sporulation protein R</i>	K06387	COG0531
Esporulação	OGY02686.1 (339)	spoIID	<i>Stage II sporulation protein D</i>	K06381	COG2385
Esporulação	OGY02690.1 (301)	spoIIQ	<i>Stage II sporulation protein Q</i>	K06386	COG0739
Esporulação	OGY02692.1 (90)	spoIIID	<i>Stage III sporulation protein D</i>	K06283	COG1609
Esporulação	OGY06055.1 (214)	spoIIIAH	<i>Stage III sporulation protein AH</i>	K06397	COG0341
Esporulação	OGY06056.1 (220)	spoIIAG	<i>Stage III sporulation protein AG</i>	K06396	
Esporulação	OGY06057.1 (210)	spoIIAF	<i>Stage III sporulation protein AF</i>	K06395	
Esporulação	OGY06058.1 (390)	spoIIAE	<i>Stage III sporulation protein AE</i>	K06394	
Esporulação	OGY06059.1 (92)	spoIIAD	<i>Stage III sporulation protein AD</i>	K06393	COG2271
Esporulação	OGY06060.1 (67)	spoIIAC	<i>Stage III sporulation protein AC</i>	K06392	COG3152
Esporulação	OGY06061.1 (171)	spoIIAB	<i>Stage III sporulation protein AB</i>	K06391	COG0161
Esporulação	OGY06062.1 (308)	spoIIAA	<i>Stage III sporulation protein AA</i>	K06390	COG3854
Esporulação	OGY03838.1 (492)	spoIVA	<i>Stage IV sporulation protein A</i>	K06398	COG0699
Esporulação	OGY06041.1 (432)	spoIVB	<i>Stage IV sporulation protein B</i>	K06399	COG0750
Esporulação	OGY06308.1 (286)	spoIVFB	<i>Stage IV sporulation protein FB</i>	K06402	COG1994
Esporulação	OGY06309.1 (248)	spoIVFA	<i>Stage IV sporulation protein FA</i>	K06401	COG0739
Esporulação	OGY06274.1 (519)	spoVB	<i>Stage V sporulation protein B</i>	K06409	COG2244
Esporulação	OGY05790.1 (638)	spoVD	<i>Stage V sporulation protein D</i>	K08384	COG0768
Esporulação	OGY05934.1 (490)	spoVAF	<i>Stage V sporulation protein AF</i>	K06408	COG0697
Esporulação	OGY05935.1 (189)	spoVAE	<i>Stage V sporulation protein AE</i>	K06407	
Esporulação	OGY05936.1 (116)	spoVAE	<i>Stage V sporulation protein AE</i>	K06407	
Esporulação	OGY05937.1 (338)	spoVAD	<i>Stage V sporulation protein AD</i>	K06406	COG0304
Esporulação	OGY05938.1 (152)	spoVAC	<i>Stage V sporulation protein AC</i>	K06405	COG1568
Esporulação	OGY05939.1 (138)	spoVAB	<i>Stage V sporulation protein AB</i>	K06404	COG0811
Esporulação	OGY05940.1 (206)	spoVAA	<i>Stage V sporulation protein AA</i>	K06403	

(Continuação)

Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Esporulação	OGY05568.1 (318)	<i>spoVK</i>	<i>Stage V sporulation protein K</i>	K06413	COG0464
Esporulação	OGY05653.1 (86)	<i>spoVS</i>	<i>Stage V sporulation protein S</i>	K06416	COG2359
Esporulação	OGY05733.1 (26)	<i>spoVM</i>	<i>Stage V sporulation protein M</i>	K06414	
Esporulação	OGY04487.1 (506)	<i>spoVB</i>	<i>Stage V sporulation protein B</i>	K06409	COG2244
Esporulação	OGY04725.1 (97)	<i>spoVG</i>	<i>Stage V sporulation protein G</i>	K06412	COG2088
Esporulação	OGY04731.1 (178)	<i>spoVT</i>	<i>Stage V sporulation protein T</i>	K04769	COG2002
Esporulação	OGY03282.1 (91)	<i>spoVS</i>	<i>Stage V sporulation protein S</i>	K06416	COG2359
Esporulação	OGY02830.1 (116)	<i>spoVAE</i>	<i>Stage V sporulation protein AE</i>	K06407	
Esporulação	OGY02831.1 (338)	<i>spoVAD</i>	<i>Stage V sporulation protein AD</i>	K06406	COG0332
Esporulação	OGY02832.1 (158)	<i>spoVAC</i>	<i>Stage V sporulation protein AC</i>	K06405	COG1368
Esporulação	OGY04589.1 (471)	<i>spoVR</i>	<i>Stage V sporulation protein R</i>	K06415	COG2719
Esporulação	OGY04554.1 (71)	<i>cotJA</i>	<i>Spore coat protein JA</i>	K06332	
Esporulação	OGY04555.1 (87)	<i>cotJB</i>	<i>Spore coat protein JB</i>	K06333	
Esporulação	OGY04556.1 (189)	<i>cotJC</i>	<i>Spore coat protein JC</i>	K06334	COG3546
Esporulação	OGY05647.1 (180)	<i>cotE</i>	<i>Spore coat protein E</i>	K06328	
Esporulação	OGY02101.1 (169)	<i>cotB</i>	<i>Spore coat protein B</i>	K06325	
Esporulação	OGY02483.1 (150)	<i>cotX</i>	<i>Spore coat protein X</i>	K06342	
Esporulação	OGY02485.1 (161)	<i>cotX</i>	<i>Spore coat protein X</i>	K06342	
Esporulação	OGY02945.1 (82)	<i>cotF</i>	<i>Spore coat protein CotF</i>		COG5577
Esporulação	OGY03372.1 (152)	<i>cotF</i>	<i>Spore coat protein CotF</i>		COG5577
Esporulação	OGY03381.1 (358)	<i>cotH</i>	<i>Spore coat protein CotH</i>	K06330	COG5337
Esporulação	OGY06712.1 (171)	<i>cotF</i>	<i>Spore coat protein CotF</i>		COG5577
Esporulação	OGY02215.1 (52)	<i>sspK</i>	<i>Small acid-soluble spore protein K (minor)</i>	K06428	
Esporulação	OGY03675.1 (59)	<i>sspH</i>	<i>Small acid-soluble spore protein H (minor)</i>	K06425	
Esporulação	OGY04721.1 (52)	<i>sspF</i>	<i>Small acid-soluble spore protein F (minor alpha/beta-type SASP)</i>	K06423	
Esporulação	OGY05464.1 (44)	<i>sspN</i>	<i>Small acid-soluble spore protein N (minor)</i>	K06431	
Esporulação	OGY05470.1 (49)	<i>sspO</i>	<i>Small acid-soluble spore protein O (minor)</i>	K06432	
Esporulação	OGY05472.1 (40)	<i>sspP</i>	<i>Small acid-soluble spore protein P (minor)</i>	K06433	
Esporulação	OGY06408.1 (69)	<i>sspI</i>	<i>Small acid-soluble spore protein I (minor)</i>	K06426	
Esporulação	OGY01571.1 (142)	<i>gerQ</i>	<i>Spore germination protein Q</i>	K06305	
Esporulação	OGY01749.1 (500)	<i>gerKA</i>	<i>Spore germination protein KA</i>	K06295	COG0619
Esporulação	OGY02269.1 (71)	<i>gerPF</i>	<i>Spore germination protein PF</i>	K06304	
Esporulação	OGY03157.1 (71)	<i>gerPF</i>	<i>Spore germination protein PF</i>	K06304	
Esporulação	OGY04209.1 (73)	<i>gerPA</i>	<i>Spore germination protein PA</i>	K06299	
Esporulação	OGY04210.1 (68)	<i>gerPB</i>	<i>Spore germination protein PB</i>	K06300	
Esporulação	OGY04211.1 (204)	<i>gerPC</i>	<i>Spore germination protein PC</i>	K06301	COG3707
Esporulação	OGY04212.1 (64)	<i>gerPD</i>	<i>Spore germination protein PD</i>	K06302	COG0145
Esporulação	OGY04213.1 (128)	<i>gerPE</i>	<i>Spore germination protein PE</i>	K06303	
Esporulação	OGY04214.1 (71)	<i>gerPF</i>	<i>Spore germination protein PF</i>	K06304	
Esporulação	OGY04826.1 (204)	<i>gerD</i>	<i>Spore germination protein D</i>	K06294	
Esporulação	OGY06342.1 (349)	<i>gerM</i>	<i>Spore germination protein M</i>	K06298	COG5401
Esporulação	OGY06345.1 (74)	<i>gerE</i>	<i>LuxR family transcriptional regulator of spore coat protein</i>	K01994	COG2197
Esporulação	OGY01679.1 (374)	<i>yndE</i>	<i>Spore germination protein</i>	K06311	COG0531
Esporulação	OGY01680.1 (489)	<i>yndD</i>	<i>Spore germination protein</i>	K06310	COG0697

(Continuação)

Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Esporulação	OGY05035.1 (397)	<i>yndF</i>	<i>Spore germination protein</i>	K06312	COG0789
Esporulação	OGY05036.1 (363)	<i>yndE</i>	<i>Spore germination protein</i>	K06311	COG0531
Esporulação	OGY05037.1 (524)	<i>yndD</i>	<i>Spore germination protein</i>	K06310	COG0697
Quimiotaxia	OGY05251.1 (574)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY05371.1 (660)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY04230.1 (575)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY03407.1 (660)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY02875.1 (500)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY02907.1 (563)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY02908.1 (564)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY02933.1 (666)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY02116.1 (430)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY02139.1 (580)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY01706.1 (313)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY01807.1 (660)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY01824.1 (658)	<i>mcp</i>	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	K03406	COG0840
Quimiotaxia	OGY03723.1 (672)	<i>cheA</i>	<i>Two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA</i>	K03407	COG0643
Quimiotaxia	OGY03697.1 (302)	<i>cheV</i>	<i>Two-component system, chemotaxis family, response regulator CheV</i>	K03415	COG0784
Quimiotaxia	OGY03719.1 (260)	<i>cheR</i>	<i>Chemotaxis protein methyltransferase</i>	K00575	COG1352
Quimiotaxia	OGY04334.1 (285)	<i>cheR</i>	<i>Chemotaxis protein methyltransferase CheR</i>	K00575	COG1352
Quimiotaxia	OGY03724.1 (122)	<i>cheY</i>	<i>Two-component system, chemotaxis family, response regulator CheY</i>	K03413	COG2201
Quimiotaxia	OGY04333.1 (896)	<i>cheA</i>	<i>Two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA</i>	K03407	COG0784
Quimiotaxia	OGY06357.1 (264)	<i>motA</i>	<i>Chemotaxis protein/Flagellar motor component MotA</i>	K02556	COG1291
Quimiotaxia	OGY06356.1 (262)	<i>motB</i>	<i>Chemotaxis protein/Flagellar motor component MotB</i>	K02557	COG1360
Quimiotaxia	OGY03726.1 (277)	<i>motA</i>	<i>Chemotaxis protein/Flagellar motor component MotA</i>	K02556	COG1291
Quimiotaxia	OGY03725.1 (225)	<i>motB</i>	<i>Chemotaxis protein/Flagellar motor component MotB</i>	K02557	COG1360
Motilidade	OGY03713.1 (460)	<i>fliD</i>	<i>Flagellar hook-associated protein 2</i>	K02407	COG1345
Motilidade	OGY03708.1 (99)	<i>fliE</i>	<i>Flagellar hook-basal body complex protein FliE</i>	K02408	COG1677
Motilidade	OGY03707.1 (527)	<i>fliF</i>	<i>Flagellar M-ring protein FliF</i>	K02409	COG1766
Motilidade	OGY03706.1 (334)	<i>fliG</i>	<i>Flagellar motor switch protein FliG</i>	K02410	COG1536
Motilidade	OGY03704.1 (434)	<i>fliI</i>	<i>Flagellum-specific ATP synthase</i>	K02412	COG1157
Motilidade	OGY03691.1 (328)	<i>fliM</i>	<i>Flagellar motor switch protein FliM</i>	K02416	COG1868
Motilidade	OGY03690.1 (119)	<i>fliNY</i>	<i>Flagellar motor switch protein FliN/FliY</i>	K02417	COG1886
Motilidade	OGY03688.1 (252)	<i>fliP</i>	<i>Flagellar biosynthetic protein FliP</i>	K02419	COG1338
Motilidade	OGY03687.1 (91)	<i>fliQ</i>	<i>Flagellar biosynthetic protein FliQ</i>	K02420	COG1987
Motilidade	OGY03686.1 (253)	<i>fliR</i>	<i>Flagellar biosynthetic protein FliR</i>	K02421	COG1684
Motilidade	OGY03712.1 (122)	<i>fliS</i>	<i>Flagellar protein FliS</i>	K02422	COG1516
Motilidade	OGY03692.1 (74)	<i>fliN</i>	<i>Flagellar motor switch/ type III secretory pathway protein FliN</i>		COG1886
Motilidade	OGY03702.1 (369)	<i>fliK</i>	<i>Flagellar hook-length control protein FliK</i>		COG3144
Motilidade	OGY03705.1 (229)	<i>fliH</i>	<i>Flagellar biosynthesis protein FliH</i>		COG1317
Motilidade	OGY03712.1 (122)	<i>fliS</i>	<i>Flagellar protein FliS</i>	K02422	COG1516
Motilidade	OGY03722.1 (545)	<i>fliNY</i>	<i>Flagellar motor switch protein FliN/FliY</i>	K02417	COG1776

(Continuação)

Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Motilidade	OGY06590.1 (72)	<i>flhF</i>	<i>Flagellar biosynthesis protein FlhF</i>		COG1766
Motilidade	OGY06717.1 (132)	<i>flhD</i>	<i>Flagellar capping protein FlhD</i>		COG1345
Motilidade	OGY03705.1 (229)	<i>flhH</i>	<i>Flagellar biosynthesis protein FlhH</i>		COG1317
Motilidade	OGY03684.1 (688)	<i>flhA</i>	<i>Flagellar biosynthesis protein FlhA</i>	K02400	COG1298
Motilidade	OGY03685.1 (348)	<i>flhB</i>	<i>Flagellar biosynthesis protein FlhB</i>	K02401	COG1377
Motilidade	OGY03683.1 (436)	<i>flhF</i>	<i>Flagellar biosynthesis protein FlhF</i>	K02404	COG1419
Motilidade	OGY03158.1 (111)	<i>flgL</i>	<i>Flagellin and related hook-associated protein FlgL</i>		COG1344
Motilidade	OGY03710.1 (135)	<i>flgB</i>	<i>Flagellar basal-body rod protein FlgB</i>	K02387	COG1815
Motilidade	OGY03709.1 (137)	<i>flgC</i>	<i>Flagellar basal-body rod protein FlgC</i>	K02388	COG1558
Motilidade	OGY04640.1 (257)	<i>flgG</i>	<i>Flagellar basal-body rod protein FlgG</i>	K02392	COG4786
Motilidade	OGY03700.1 (407)	<i>flgE</i>	<i>Flagellar hook protein FlgE</i>	K02390	COG1749
Motilidade	OGY03715.1 (432)	<i>flgK</i>	<i>Flagellar hook-associated protein 1 FlgK</i>	K02396	COG1256
Motilidade	OGY03714.1 (287)	<i>flgL</i>	<i>Flagellar hook-associated protein 3 FlgL</i>	K02397	COG1344
Motilidade	OGY03701.1 (192)	<i>flgD</i>	<i>Flagellar basal-body rod modification protein FlgD</i>	K02389	COG1843
Quorum sensing	OGY06628.1 (157)	<i>luxS</i>	<i>luxS autoinducer biosynthesis</i>	K07173	COG1854
Quorum quenching	OGY05307.1 (250)	<i>ablD</i>	<i>N-acyl homoserine lactone hydrolase</i>	K13075	COG0491
Adesão	OGY03387.1 (328)	<i>pilA</i>	<i>Pilus assembly protein, major pilin PilA</i>		COG4969
Adesão	OGY02999.1 (264)	<i>pilA</i>	<i>Pilus assembly protein, major pilin PilA</i>		COG4969
Adesão	OGY06075.1 (280)	<i>fimV</i>	<i>Pilus assembly protein FimV</i>		COG3170
Adesão	OGY06143.1 (121)	<i>fimV</i>	<i>Pilus assembly protein FimV</i>		COG3170
Adesão	OGY03694.1 (385)	<i>flhC</i>	<i>Flagellin</i>	K02406	COG1344
Adesão	OGY03695.1 (266)	<i>flhC</i>	<i>Flagellin</i>	K02406	COG1344
Adesão	OGY04675.1 (358)	<i>lbs</i>	<i>Lipopolysaccharide biosynthesis protein</i>		COG3754
Adesão	OGY05366.1 (689)	<i>lbs</i>	<i>Lipopolysaccharide biosynthesis protein</i>		COG1442
Biofilme	OGY03577.1 (367)	<i>pgsA</i>	<i>Poly-gamma-glutamate synthesis protein</i>	K07282	COG2843
Biofilme	OGY05163.1 (411)	<i>pgsA</i>	<i>Poly-gamma-glutamate synthesis protein</i>	K07282	COG2843
COVs ¹	OGY03582.1 (76)	<i>alsS</i>	<i>Acetolactate synthase small subunit</i>		COG0440
COVs ¹	OGY03583.1 (571)	<i>alsS</i>	<i>Acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type</i>		COG0028
COVs ¹	OGY03946.1 (169)	<i>alsS</i>	<i>Acetolactate synthase small subunit</i>		COG0440
COVs ¹	OGY03947.1 (566)	<i>alsS</i>	<i>Acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type</i>		COG0028
COVs ¹	OGY04497.1 (562)	<i>alsS</i>	<i>Acetolactate synthase large subunit</i>		COG0028
COVs ¹	OGY04496.1 (252)	<i>alsD</i>	<i>Alpha-acetolactate decarboxylase</i>		
COVs ¹	OGY04496.1 (252)	<i>alsD</i>	<i>Alpha-acetolactate decarboxylase</i>	K01575	COG3527
COVs ¹	OGY01716.1 (350)	<i>bdb</i>	<i>(R,R)-butanediol dehydrogenase</i>	K00004	COG1063
Poliamina	OGY01551.1 (275)	<i>speE</i>	<i>Spermidine synthase</i>	K00797	COG0421
Poliamina	OGY04534.1 (161)	<i>speE</i>	<i>Spermidine synthase</i>		COG0421
Poliamina	OGY04054.1 (266)	<i>potC</i>	<i>ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component II</i>	K11070	COG1177
Poliamina	OGY04056.1 (327)	<i>potA</i>	<i>ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase components</i>	K11072	COG3842

(Continuação)

Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Poliamina	OGY04055.1 (282)	<i>potB</i>	<i>ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component I</i>	K11071	COG1176
Poliamina	OGY05886.1 (366)	<i>pot</i>	<i>ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase components</i>	K10112	COG3842
Poliamina	OGY01816.1 (365)	<i>pot</i>	<i>ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase components</i>	K05816	COG3842
Poliamina	OGY04053.1 (349)	<i>potD</i>	<i>Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein</i>	K11069	COG0687
FBN ²	OGY06562.1 (161)	<i>moaC</i>	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme</i>	K03637	COG0315
FBN ²	OGY06598.1 (169)	<i>moaB</i>	<i>Molybdopterin biosynthesis enzyme MoaB</i>	K03638	COG0521
FBN ²	OGY03299.1 (77)	<i>moaD</i>	<i>Molybdopterin converting factor, small subunit</i>	K03636	COG1977
FBN ²	OGY03303.1 (337)	<i>moaA</i>	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme MoaA</i>	K03639	COG2896
FBN ²	OGY05418.1 (78)	<i>moaD</i>	<i>Molybdopterin converting factor, small subunit</i>	K03636	COG1977
FBN ²	OGY05423.1 (338)	<i>moaA</i>	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme MoaA</i>	K03639	COG2896
FBN ²	OGY06558.1 (77)	<i>moaD</i>	<i>Molybdopterin converting factor, small subunit</i>	K03636	COG1977
FBN ²	OGY06564.1 (337)	<i>moaA</i>	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme MoaA</i>	K03639	COG2896
FBN ²	OGY04866.1 (224)	<i>modB</i>	<i>ABC-type molybdate transport system, permease component</i>	K02018	COG4149
FBN ²	OGY03500.1 (272)	<i>modA</i>	<i>ABC-type molybdate transport system, periplasmic component</i>	K02020	COG0725
FBN ²	OGY04867.1 (268)	<i>modA</i>	<i>ABC-type molybdate transport system, periplasmic component</i>	K02020	COG0725
FBN ²	OGY03301.1 (429)	<i>moeA</i>	<i>Molybdopterin biosynthesis enzyme</i>	K03750	COG0303
FBN ²	OGY05420.1 (435)	<i>moeA</i>	<i>Molybdopterin biosynthesis enzyme</i>	K03750	COG0303
FBN ²	OGY05421.1 (338)	<i>moeB</i>	<i>Molybdopterin biosynthesis adenylyltransferase</i>	K21029	COG0476
FBN ²	OGY06561.1 (429)	<i>moeA</i>	<i>Molybdopterin biosynthesis enzyme</i>	K03750	COG0303
FBN ²	OGY03864.1 (82)	<i>fer</i>	<i>Ferredoxin</i>	K05337	COG1141
FBN ²	OGY03967.1 (148)	<i>fldA</i>	<i>Flavodoxin</i>	K03839	COG0716
FBN ²	OGY05394.1 (147)	<i>fldA</i>	<i>Flavodoxin</i>	K03839	COG0716
FBN ²	OGY02276.1 (471)	<i>fix</i>	<i>Signal transduction histidine kinase involved in nitrogen fixation and metabolism regulation</i>		COG5000
FBN ²	OGY03883.1 (604)	<i>fix</i>	<i>Signal transduction histidine kinase involved in nitrogen fixation and metabolism regulation</i>		COG5000
FBN ²	OGY05122.1 (458)	<i>fix</i>	<i>Signal transduction histidine kinase involved in nitrogen fixation and metabolism regulation</i>		COG5000
FBN ²	OGY06511.1 (484)	<i>fix</i>	<i>Signal transduction histidine kinase involved in nitrogen fixation and metabolism regulation</i>		COG5000
Denitrificação	OGY03306.1 (176)	<i>narJ</i>	<i>Nitrate reductase assembly protein NarJ, required for insertion of molybdenum cofactor</i>	K00373	COG2180
Denitrificação	OGY03307.1 (491)	<i>narH</i>	<i>Nitrate reductase beta subunit</i>	K00371	COG1140
Denitrificação	OGY03308.1 (1227)	<i>narG</i>	<i>Nitrate reductase alpha subunit</i>	K00370	COG5013
Denitrificação	OGY03305.1 (229)	<i>narI</i>	<i>Nitrate reductase gamma subunit</i>	K00374	COG2181
Denitrificação	OGY03298.1 (389)	<i>narK</i>	<i>Nitrate/nitrite transporter NarK</i>	K02575	COG2223
Denitrificação	OGY02309.1 (402)	<i>narK</i>	<i>Nitrate/nitrite transporter NarK</i>	K08177	COG2223
Denitrificação	OGY03290.1 (801)	<i>nirB</i>	<i>Nitrite reductase (NADH) large subunit</i>	K00362	COG1251
Denitrificação	OGY03291.1 (105)	<i>nirD</i>	<i>Nitrite reductase (NADH) small subunit</i>	K00363	COG2146
Denitrificação	OGY04034.1 (283)	<i>nirC</i>	<i>Nitrite transporter NirC</i>	K02598	COG2116
Denitrificação	OGY01621.1 (356)	<i>nos</i>	<i>Nitric oxide synthase, oxygenase domain</i>	K00491	COG4362
Fosfato ³	OGY06705.1 (314)	<i>ldh</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	K00016	COG0039
Fosfato ³	OGY03481.1 (314)	<i>ldh</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	K00016	COG0039
Fosfato ³	OGY02946.1 (316)	<i>ldh</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i>	K00016	COG0039
Fosfato ³	OGY06437.1 (430)	<i>ldh</i>	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>		COG0538

(Continuação)

Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Fosfato ³	OGY06362.1 (208)	<i>sdbC</i>	<i>Succinate dehydrogenase</i>	K00241	COG2009
Fosfato ³	OGY06360.1 (253)	<i>sdbB</i>	<i>Succinate dehydrogenase</i>	K00240	COG0479
Fosfato ³	OGY06361.1 (597)	<i>sdbA</i>	<i>Succinate dehydrogenase</i>	K00239	COG1053
Fosfato ³	OGY06555.1 (261)	<i>gdb</i>	<i>Glucose 1-dehydrogenase</i>	K00034	COG1028
Fosfato ³	OGY03892.1 (332)	<i>pit</i>	<i>Inorganic phosphate transporter, PiT family</i>	K03306	COG0306
Fosfato ³	OGY06136.1 (288)	<i>pstA</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, permease component</i>	K02038	COG0581
Fosfato ³	OGY06137.1 (316)	<i>pstC</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, permease component</i>	K02037	COG0573
Fosfato ³	OGY01672.1 (306)	<i>pstA</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, permease component</i>	K02038	COG0581
Fosfato ³	OGY01840.1 (296)	<i>pstC</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, permease component</i>	K02037	COG0573
Fosfato ³	OGY06138.1 (305)	<i>pstS</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, periplasmic component</i>	K02040	COG0226
Fosfato ³	OGY01673.1 (300)	<i>pstS</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, periplasmic component</i>	K02040	COG0226
Fosfato ³	OGY06135.1 (271)	<i>pstB</i>	<i>ABC-type phosphate transport system, ATPase component</i>	K02036	COG1117
Fosfato ³	OGY05543.1 (267)	<i>phnE</i>	<i>ABC-type phosphate/phosphonate transport system, permease component</i>	K02042	COG3639
Fosfato ³	OGY05544.1 (264)	<i>phnE</i>	<i>ABC-type phosphate/phosphonate transport system, permease component</i>	K02042	COG3639
Fosfato ³	OGY05545.1 (257)	<i>phnC</i>	<i>ABC-type phosphate/phosphonate transport system, ATPase component</i>	K02041	COG3638
Fosfato ³	OGY05546.1 (312)	<i>phnD</i>	<i>ABC-type phosphate/phosphonate transport system, periplasmic component</i>	K02044	COG3221
Fosfato ³	OGY06210.1 (461)	<i>alk</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	K01077	COG1785
Fosfato ³	OGY02594.1 (557)	<i>alk</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>	K01077	COG1785
Fosfato ³	OGY06134.1 (218)	<i>pbr</i>	<i>Phosphate uptake regulator</i>	K02039	COG0704
Fosfato ³	OGY06169.1 (319)	<i>phoH</i>	<i>Phosphate starvation-inducible protein PhoH and related proteins</i>	K06217	COG1702
Sideróforo ⁴	OGY05960.1 (151)	<i>fur</i>	<i>Ferric uptake regulator</i>	K03711	COG0735
Sideróforo ⁴	OGY03430.1 (612)	<i>sid</i>	<i>Siderophore synthetase componente</i>		COG4264
Sideróforo ⁴	OGY03431.1 (602)	<i>sid</i>	<i>Siderophore synthetase componente</i>		COG4264
Sideróforo ⁴	OGY05615.1 (273)	<i>feoA</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophores transport system, ATPase component</i>	K02013	COG1120
Sideróforo ⁴	OGY05617.1 (335)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY06388.1 (327)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY06389.1 (293)	<i>feoS</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-hydroxamate transport system, periplasmic component</i>	K02016	COG0614
Sideróforo ⁴	OGY01563.1 (351)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY01766.1 (273)	<i>feoA</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophores transport system, ATPase component</i>	K02013	COG1120
Sideróforo ⁴	OGY05319.1 (344)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY05318.1 (338)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY05616.1 (340)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY06229.1 (342)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY02093.1 (335)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY02094.1 (346)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY01767.1 (352)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY01768.1 (334)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY01562.1 (338)	<i>feoP</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system, permease component</i>	K02015	COG0609
Sideróforo ⁴	OGY06228.1 (272)	<i>feoA</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophores transport system, ATPase component</i>	K02013	COG1120
Sideróforo ⁴	OGY06387.1 (256)	<i>feoA</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophores transport system, ATPase component</i>	K02013	COG1120
Sideróforo ⁴	OGY01561.1 (270)	<i>feoA</i>	<i>ABC-type Fe³⁺-siderophores transport system, ATPase component</i>	K02013	COG1120
Sideróforo ⁴	OGY03668.1 (556)	<i>afuB</i>	<i>ABC-type Fe³⁺ transport system, permease component</i>	K02011	COG1178
Sideróforo ⁴	OGY03669.1 (341)	<i>afuA</i>	<i>ABC-type Fe³⁺ transport system, periplasmic component</i>	K02012	COG1840

(Conclusão)					
Mecanismo	NCBI (tamanho)	Nome	Produto	KO	COG
Sideróforo ⁴	OGY03670.1 (330)	<i>afuC</i>	<i>ABC-type Fe3+ transport systems, ATPase component</i>	K02010	COG3842
Sideróforo ⁴	OGY04018.1 (585)	<i>afuB</i>	<i>ABC-type Fe3+ transport system, permease component</i>	K02011	COG1178
Sideróforo ⁴	OGY04019.1 (333)	<i>afuC</i>	<i>ABC-type Fe3+ transport systems, ATPase component</i>	K02010	COG3842
Sideróforo ⁴	OGY04020.1 (358)	<i>afuA</i>	<i>ABC-type Fe3+ transport system, periplasmic component</i>	K02012	COG1840
Sideróforo ⁴	OGY02722.1 (344)	<i>afuA</i>	<i>ABC-type Fe3+ transport system, periplasmic component</i>	K02012	COG1840
Sideróforo ⁴	OGY06643.1 (75)	<i>feoA</i>	<i>Fe2+ transport system protein FeoA</i>	K04758	COG1918
Sideróforo ⁴	OGY01674.1 (85)	<i>feoA</i>	<i>Fe2+ transport system protein FeoA</i>	K04758	COG1918
Sideróforo ⁴	OGY01676.1 (466)	<i>feoB</i>	<i>Fe2+ transport system protein FeoB</i>	K04759	COG0370
Sideróforo ⁴	OGY06642.1 (662)	<i>feoB</i>	<i>Fe2+ transport system protein FeoB</i>	K04759	COG0370
Sideróforo ⁴	OGY02857.1 (338)	<i>ferS</i>	<i>ABC-type enterobelin transport system, periplasmic component</i>	K02016	COG4607
Sideróforo ⁴	OGY02858.1 (338)	<i>ferP</i>	<i>ABC-type enterobelin transport system, permease component</i>	K02015	COG4606
Sideróforo ⁴	OGY02859.1 (354)	<i>ferP</i>	<i>ABC-type enterobelin transport system, permease component</i>	K02015	COG4605
Sideróforo ⁴	OGY02860.1 (250)	<i>ferA</i>	<i>ABC-type enterobelin transport system, ATPase component</i>	K02013	COG4604
Sideróforo ⁴	OGY05380.1 (146)		<i>Outer membrane receptor for ferrienterobelin and colicins</i>		COG4771
AIA ⁵	OGY04107.1 (204)	<i>trpF</i>	<i>Phosphoribosylanthranilate isomerase</i>	K01817	COG0135
AIA ⁵	OGY04108.1 (253)	<i>trpC</i>	<i>Indole-3-glycerol phosphate synthase</i>	K01609	COG0134
AIA ⁵	OGY04109.1 (341)	<i>trpD</i>	<i>Anthranilate phosphoribosyltransferase</i>	K00766	COG0547
AIA ⁵	OGY04110.1 (195)	<i>trpG</i>	<i>Anthranilate synthase component II</i>	K01658	COG0512
AIA ⁵	OGY04111.1 (472)	<i>trpE</i>	<i>Anthranilate synthase component I</i>	K01657	COG0147
AIA ⁵	OGY04105.1 (258)	<i>trpA</i>	<i>Tryptophan synthase alpha chain</i>	K01695	COG0159
AIA ⁵	OGY04106.1 (397)	<i>trpB</i>	<i>Tryptophan synthase beta chain</i>	K01696	COG0133
AIA ⁵	OGY01885.1 (561)	<i>ipdC</i>	<i>Indolepyruvate decarboxylase</i>	K04103	COG3961
AIA ⁵	OGY03397.1 (487)	<i>mao</i>	<i>Monoamine oxidase</i>	K00274	COG1231
AIA ⁵	OGY03480.1 (478)	<i>mao</i>	<i>Monoamine oxidase</i>	K00274	COG1231
AIA ⁵	OGY03040.1 (396)	<i>patA</i>	<i>Aminotransferase</i>	K10907	COG0436
AIA ⁵	OGY05879.1 (387)	<i>patA</i>	<i>Aminotransferase</i>	K00841	COG0436
AIA ⁵	OGY05905.1 (392)	<i>mtnE</i>	<i>Aminotransferase</i>	K08969	COG0436
AIA ⁵	OGY02002.1 (304)	<i>Ami</i>	<i>Amidase</i>	K01426	COG2421
AIA ⁵	OGY03497.1 (304)		<i>Amidase</i>	K01426	COG2421

¹COVs: Compostos Orgânicos Voláteis

²FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio

³Fosfato: Solubilização de fosfato

⁴Sideróforo: Produção de sideróforos

⁵AIA: Produção de ácido indol acético

ANEXO B. Linhagens do grupo *Bacillus cereus* utilizadas nos estudos filogenéticos e comparativos com seus respectivos números de acesso no NCBI

(Continua)

Nome da linhagem	Acesso NCBI
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	NC_004722.1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	NC_003909.8
<i>Bacillus cereus</i> E33L	NC_006274.1
<i>Bacillus cereus</i> Q1	NC_011969.1
<i>Bacillus cereus</i> B4264	NC_011725.1
<i>Bacillus cereus</i> AH187	NC_011658.1
<i>Bacillus cereus</i> G9842	NC_011772.1
<i>Bacillus cereus</i> AH820	NC_011773.1
<i>Bacillus cereus</i> 03BB102	NC_012472.1
<i>Bacillus cereus</i> biovar <i>anthracis</i> CI	NC_014335.1
<i>Bacillus cereus</i> F837/76	NC_016779.1
<i>Bacillus cereus</i> NC7401	NC_016771.1
<i>Bacillus cereus</i> FRI-35	NC_018491.1
<i>Bacillus cereus</i> A1	NZ_CP015727.1
<i>Bacillus cereus</i> 03BB87	NZ_CP009941.1
<i>Bacillus cereus</i> D17	NZ_CP009300.1
<i>Bacillus cereus</i> 03BB102	NZ_CP009318.1
<i>Bacillus cereus</i> FM1	NZ_CP009369.1
<i>Bacillus cereus</i> 3a	NZ_CP009596.1
<i>Bacillus cereus</i> G9241	NZ_CP009590.1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 4342	NZ_CP009628.1
<i>Bacillus cereus</i> 03BB108	NZ_CP009641.1
<i>Bacillus cereus</i> E33L (2)	NZ_CP009968.1
<i>Bacillus cereus</i> S2-8	NZ_CP009605.1
<i>Bacillus cereus</i> FORC_005	NZ_CP009686.1
<i>Bacillus cereus</i> NJ-W	NZ_CP012483.1
<i>Bacillus cereus</i> FORC_013	NZ_CP011145.1
<i>Bacillus cereus</i> CMCC P0021	NZ_CP011151.1
<i>Bacillus cereus</i> GMCC0460.4 (CMCCP0011)	NZ_CP011153.1
<i>Bacillus cereus</i> HN001	NZ_CP011155.1
<i>Bacillus cereus</i> FORC_024	NZ_CP012691.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> 97-27	NC_005957.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Al Hakam	NC_008600.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171	NC_014171.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>finitimus</i> YBT-020	NC_017200.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>chinensis</i> CT-43	NC_017208.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771	NC_018500.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	NC_018508.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> MC28	NC_018693.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	NC_018877.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> HD73	NC_020238.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> IS5056	NC_020376.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> YBT-1520	NZ_CP004858.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> HD-1	NZ_CP004870.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> YBT-1520	NZ_CP007607.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>galleriae</i> HD-29	NZ_CP010089.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1011	NZ_CP009335.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD571	NZ_CP009600.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD682	NZ_CP009720.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> 97-27	NZ_CP010088.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1002	NZ_CP009351.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>morrisoni</i>	NZ_CP010577.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> YC-10	NZ_CP011349.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HS18-1	NZ_CP012099.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>indiana</i>	NZ_CP010106.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> YWC2-8	NZ_CP013055.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> CTC	NZ_CP013274.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>tolworthi</i>	NZ_AP014864.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt185	NZ_CP014282.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD12	NZ_CP014847.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bc601	NZ_CP015150.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>alesti</i>	NZ_CP015176.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> MYBT18246	NZ_CP015350.1
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	NC_003997.3

(Conclusão)	
Nome da linhagem	Acesso NCBI
<i>Bacillus anthracis</i> Sterne	NC_005945.1
<i>Bacillus anthracis</i> 'Ames Ancestor'	NC_007530.2
<i>Bacillus anthracis</i> CDC 684	NC_012581.1
<i>Bacillus anthracis</i> A0248	NC_012659.1
<i>Bacillus anthracis</i> H9401	NC_017729.1
<i>Bacillus anthracis</i> A16R	NZ_CP001974.1
<i>Bacillus anthracis</i> A16	NZ_CP001970.2
<i>Bacillus anthracis</i> SVA11	NZ_CP006742.1
<i>Bacillus anthracis</i> HYU01	NZ_CP008846.1
<i>Bacillus anthracis</i> 2000031021	NZ_CP007618.1
<i>Bacillus anthracis</i> Vollum	NZ_CP007666.1
<i>Bacillus anthracis</i> Ames A0462	NZ_CP010792.1
<i>Bacillus anthracis</i> PAK-1	NZ_CP009325.1
<i>Bacillus anthracis</i> Vollum 1B	NZ_CP009328.1
<i>Bacillus anthracis</i> K3	NZ_CP009331.1
<i>Bacillus anthracis</i> Ohio ACB	NZ_CP009341.1
<i>Bacillus anthracis</i> SK-102	NZ_CP009464.1
<i>Bacillus anthracis</i> Pasteur	NZ_CP009476.1
<i>Bacillus anthracis</i> Sterne (2)	NZ_CP009541.1
<i>Bacillus anthracis</i> BA1015	NZ_CP009544.1
<i>Bacillus anthracis</i> BA1035	NZ_CP009700.1
<i>Bacillus anthracis</i> RA3	NZ_CP009697.1
<i>Bacillus anthracis</i> V770-NP-1R	NZ_CP009598.1
<i>Bacillus anthracis</i> 2002013094	NZ_CP009902.1
<i>Bacillus anthracis</i> Ames_BA1004	NZ_CP009981.1
<i>Bacillus anthracis</i> Canadian_bison	NZ_CP010322.1
<i>Bacillus anthracis</i> Turkey32	NZ_CP009315.1
<i>Bacillus anthracis</i> A1144	NZ_CP010852.1
<i>Bacillus anthracis</i> Stendal	NZ_CP014179.1
<i>Bacillus anthracis</i> Tangail-1	NZ_CP015779.1
<i>Bacillus anthracis</i> Parent2	NZ_CP012729.1
<i>Bacillus anthracis</i> Parent1	NZ_CP012730.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR01	NZ_CP012720.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR02	NZ_CP012721.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR05	NZ_CP012722.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR06	NZ_CP012723.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR07	NZ_CP012724.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR08	NZ_CP012725.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR09-1	NZ_CP012726.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR09-4	NZ_CP012727.1
<i>Bacillus anthracis</i> PR10-4	NZ_CP012728.1
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 6051-HGW	NC_020507.1
<i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	NZ_MJBF00000000.1