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

O papel da via do indol-3-piruvato na produção de ácido indol-3-acético e promoção do crescimento vegetal pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9

Thiago Angelo da Cruz

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

Piracicaba
2021

Thiago Angelo da Cruz
Bacharel em Ciências Biológicas

O papel da via do indol-3-piruvato na produção de ácido indol-3-acético e promoção do
crescimento vegetal pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE VERDI**

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

Piracicaba
2021

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

Cruz, Thiago Angelo da

O papel da via do indol-3-piruvato na produção de ácido indol-3-acético e promoção do crescimento vegetal pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 / Thiago Angelo da Cruz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

73 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Bacillus* 2. IPyA 3. AIA 4. RT-qPCR 5. RPCP I. Título

À minha família pelo apoio, motivação, amor e companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Sou grato primeiramente a Deus, por todas as dádivas e aprendizados.

Sou grato aos meus pais, familiares e amigos pelo carinho e apoio incondicional em minha trajetória acadêmica.

A querida orientadora Maria Carolina Quecine, pelo acolhimento, apoio, orientação e amizade, que contribuíram significativamente em minha formação profissional e pessoal.

Ao Bruno, Pedro, Everthon, Lucas e Jeroën pela amizade, conselhos e especial auxílio na condução dos meus experimentos.

Ao Zezo, e todos os demais membros do laboratório do Laboratório de Genética de Micro-organismos pelo convívio, acolhimento e apoio durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos membros do Grupo de Estudos e Extensão em Biologia Molecular e Sintética (GBIOS) pelo convívio e contribuição a minha formação.

À coordenação do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

À todos os professores e funcionários do departamento de Genética e da ESALQ/USP, pelo auxílio a minha formação.

À CAPES pelo auxílio financeiro (processo: 88882.328598/2010-01).

Muito obrigado!

“Me sinto na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS	13
REVISÃO DE LITERATURA	17
1. Interações bactéria-planta.....	17
1.2. Aplicação das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal	17
1.3. Mecanismos bacterianos relacionados à promoção do crescimento vegetal	18
1.4. Ácido indol-3-acético em interações bactéria-planta	19
1.5. Biossíntese bacteriana de ácido indol-3-acético	20
1.6. Regulação do ácido indol-3-acético bacteriano	21
1.7. A linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 e seu potencial uso como biofertilizante	22
Referências	23
2. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA IPyA EM <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	30
RESUMO	29
ABSTRACT.....	29
2.1. INTRODUÇÃO.....	32
2.2. OBJETIVOS	33
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.3.1. Busca de genes relacionados a via IPyA no genoma de <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9.....	33
2.3.2. Ensaio de expressão gênica	33
2.3.2.1. Linhagem bacteriana e condições de cultivo	33
2.3.2.2. Desenho e validação dos primers	34
2.3.2.3. Extração de RNA.....	34
2.3.2.4. Síntese de cDNA.....	35
2.3.2.5. Reações de RT-qPCR	35
2.3.2.6. Influência da suplementação de L-trp na expressão dos genes da via IPyA na linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9.....	36
2.3.2.7. Avaliação temporal da expressão dos genes da via IPyA na linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 suplementada com L-triptofano	37

2.3.2.8. Influência da suplementação de ácido indol-3-acético na expressão dos genes da via IPyA na linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	37
2.4. RESULTADOS.....	37
2.4.1. Busca de genes relacionados a via IPyA no genoma de <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	37
2.4.2. Ensaio de expressão gênica	38
2.4.2.1. Influência da suplementação de L-trp na expressão dos genes da via IPyA na linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	38
2.4.2.2. Avaliação temporal da expressão dos genes da via IPyA na linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 suplementada com L-triptofano	40
2.4.2.3. Influência da suplementação de ácido indol-3-acético na expressão dos genes da via IPyA na linhagem <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9	43
2.5. DISCUSSÃO.....	46
2.6. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS	50
3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DO MUTANTE Δ IPDC DE <i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9.....	56
RESUMO	57
ABSTRACT.....	57
3.1. INTRODUÇÃO.....	58
3.2. OBJETIVOS.....	59
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.3.1. Caracterização molecular do mutante Δ ipdC	59
3.3.1.1. Extração de DNA	59
3.3.1.2. Amplificação do gene Δ ipdC.....	59
3.3.1.3. Sequenciamento dos amplicons	61
3.3.1.4. Montagem e alinhamento do gene Δ ipdC.....	61
3.3.2. Avaliação da produção de ácido indol-3-acético.....	61
3.3.3. Ensaio de promoção de crescimento em plântulas de milho.....	61
3.3.3.1. Preparo e inoculação	61
3.3.3.2. Ensaio de germinação e promoção de crescimento em plântulas de milho	62
3.3.3.3. Análise estatística.....	62

3.4. RESULTADOS.....	63
3.4.1. Caracterização molecular do mutante RZ2MS9 Δ ipdC	63
3.4.2. Produção de ácido indol-3-acético	63
3.4.3. Ensaio de germinação de promoção de crescimento em plântulas de milho.....	64
3.5. DISCUSSÃO	67
3.6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

O papel da via do indol-3-piruvato na biossíntese de ácido indol-3-acético e promoção do crescimento vegetal pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9

A biossíntese bacteriana de ácido indol-3-acético (AIA) exerce um papel fundamental na promoção do crescimento vegetal. Dentre as vias bacterianas de biossíntese de AIA, a via do indol-3-piruvato (IPyA) que tem como precursor o aminoácido L-triptofano (L-trp), regulada principalmente pelo gene *ipdC*, é a mais bem descrita em rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP's). Apesar da importância, estudos moleculares relacionados às vias metabólicas da síntese bacteriana do AIA e dos genes envolvidos nesse processo são incipientes. A RPCP *Bacillus* sp. RZ2MS9, previamente isolada da rizosfera do guaranazeiro, vem apresentando satisfatória atividade promotora de crescimento vegetal. Desta promoção de crescimento vegetal destaca-se o desenvolvimento de raízes das plantas inoculadas, sugerindo-se a relevância do AIA produzido pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 como mecanismo principal na interação bactéria-planta. Além disso, o sequenciamento de seu genoma apontou a presença de diversos genes relacionados à promoção e crescimento, com destaque para genes envolvidos na biossíntese de auxinas pela via IPyA. Assim, o presente estudo teve como objetivos: i) avaliar a influência da suplementação do aminoácido L-trp e do AIA na modulação da expressão dos genes da via IPyA: *aaaT*, *ipdC* e *aldH* em *Bacillus* sp. RZ2MS9, ii) avaliar os efeitos moleculares e fenotípicos do nocaute do gene *ipdC* na linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$, bem como seu efeito na interação com plantas de milho.

Palavras-chave: *Bacillus*, IPyA, AIA, RT-qPCR, RPCP

ABSTRACT

The role of the indole-3-pyruvate pathway in the indole-3-acetic acid production and plant growth promotion by *Bacillus* sp. RZ2MS9

The bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) plays a significant role in plant growth promotion. Among the bacterial pathways to IAA biosynthesis, the indole-3-pyruvate (IPyA), whose precursor is the amino acid tryptophan (Ltrp), regulated mainly by the *ipdC* gene, is the best described in plant growth promoting rhizobacteria (PGPR's). Despite its importance, metabolic pathways of bacterial synthesis of IAA and the genes involved in this process has not been studied well at a molecular level. The PGPR *Bacillus* sp. RZ2MS9, previously isolated from guaranazeiro rhizosphere, has been showing satisfactory plant growth promoting activity. The increment on root development by *Bacillus* sp. RZ2MS9 inoculation suggests the relevance of IAA during its plant interaction. Moreover, the sequencing of its genome indicated the presence of several genes related to growth promoting, with emphasis on genes involved in the biosynthesis of auxins through the IPyA pathway. Therefore, the present study has the following objectives: *i*) assess the influence of supplementation of the amino acid Ltrp and IAA on the expression of genes in the IPyA pathway: *aaaT*, *ipdC* and *aldH* in *Bacillus* sp. RZ2MS9; *ii*) evaluate the molecular and phenotypic effects of the knockout of the *ipdC* gene in the *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$ as well as its interaction with maize plants.

Keywords: *Bacillus*, IPyA, IAA, RT-qPCR, PGPR

INTRODUÇÃO GERAL

Com a redução expressiva de nossa biocapacidade, produzir alimentos, fibras e energia para a crescente população mundial exigirá sistemas de produção agrícola mais sustentáveis e eficientes. Para atingir tal objetivo, devemos explorar interações interespecíficas harmônicas que ocorrem na natureza, produto de milhares de anos de co-evolução entre os organismos envolvidos. O conhecimento aprofundado destas interações nos permite manipulá-las a favor de uma agricultura mais produtiva e ecologicamente equilibrada com menor dependência de insumos químicos.

A região do solo adjacente às raízes vegetais, conhecida como “rizosfera”, abriga uma abundante diversidade de micro-organismos. Neste ecossistema, plantas e bactérias estabelecem múltiplas e complexas interações, que vão desde patogênese até a promoção do crescimento vegetal. O grupo das rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP’s) se apresenta como uma solução sustentável e eficaz em práticas agrícolas. Estes micro-organismos podem ser utilizados como biofertilizantes, fitoestimulantes ou ainda podendo atuar como moderadores de estresses de origem biótica e abiótica (BACH et al., 2016).

Biofertilizantes podem ser definidos como produtos biológicos contendo micro-organismos vivos, que quando inoculados em sementes, superfícies de plantas ou solo, promovem o crescimento por meio da disponibilização de nutrientes assimiláveis e aumento de biomassa e superfície radicular (VESSEY, 2003). Estes produtos podem ser utilizados em consórcio com fertilizantes minerais, permitindo reduzir suas doses e obter altas produtividades (CANBOLAT et al., 2006).

As RPCP’s podem dispor de um ou vários mecanismos de ação promotora de crescimento vegetal, o que irá depender do *pool* gênico da linhagem em questão. Estes mecanismos atuam sinergisticamente, e podem ser classificados como diretos ou indiretos (GLICK, 1994). Os mecanismos diretos envolvem: produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas; fixação de nitrogênio; solubilização de fosfatos entre outros. Já os mecanismos indiretos, incluem: produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase; antibióticos; enzimas de degradação da parede celular; cianeto de hidrogênio; indução de resistência sistêmica; *quorum quenching* entre outros (OLANREWAJU et al., 2017).

O ácido indol-3-acético (AIA) é uma auxina que desempenha um papel crítico no crescimento e desenvolvimento das plantas, modulando diversos processos biológicos, como a promoção do alongamento e divisão celular, dominância apical, formação de raízes, diferenciação do tecido vascular, biossíntese de etileno, mediação de respostas trópicas (CALVO et al., 2014). Acredita-se que a regulação desses processos envolva mudanças induzidas pelo AIA na expressão gênica, sendo que vários genes *up* ou *down* regulados já foram identificados e caracterizados em plantas (GUILFOYLE & HAGEN, 2002).

A concentração do AIA nas plantas e seu transporte basípeto ou acrópeto, variam em função do fluxo e efluxo nos tecidos vegetais, de sua biossíntese, da formação de compostos conjugados e de sua degradação (DI et al., 2016). O AIA produzido por bactérias pode alterar o *pool* endógeno da planta, e consequentemente modular processos fisiológicos a seu favor. As consequências destas alterações hormonais variam da patogenicidade à promoção do crescimento, o que irá depender principalmente da natureza química da auxina, quantidade, e sensibilidade por parte da planta, que pode variar entre diferentes tecidos, órgãos, bem como em relação ao genótipo e fase do desenvolvimento vegetal (SPAEPEN et al., 2007; CHENG et al., 2013 ; DUCA et al., 2014). Além disto, alguns

intermediários metabólicos podem possuir efeitos análogos aos exercidos por auxinas, a exemplo do indol-3-piruvato (IPyA), indol-3-acetaldeído (IAAld) e indol-3-acetamida (IAM) (OLANREWANJU et al., 2017).

Uma das características mais proeminentes em plantas inoculadas com RPCP's é a modificação radicular. O AIA bacteriano frequentemente estimula a formação de pelos radiculares e aumenta o número e comprimento de raízes laterais e primárias quando em concentrações ideais (DUCA et al., 2014). O excesso de auxinas também pode ter efeito deletério nas plantas inoculadas, sendo de suma importância o equilíbrio deste fitormônio no ambiente rizosférico. Um sistema radicular bem desenvolvido é crucial para a absorção de água, nutrientes, tolerância a estresses e ancoragem das plantas ao solo (WANG et al., 2006). O aumento do enraizamento eleva a absorção de minerais pelas plantas e a exsudação radicular, que por sua vez estimula a colonização bacteriana, amplificando o efeito de inoculação (DOBBELAERE et al., 1999).

Dentre as RPCP's com potencial aplicação na agricultura, destacam-se linhagens de *Bacillus* spp., por terem sido reportadas promovendo o crescimento de culturas expressivas como milho (BATISTA et al., 2017; EGAMBERDIYEVA, 2007; GOND et al., 2015), arroz (ASHRAFUZZAMAN et al., 2009), soja (RAMESH et al., 2014; SHARMA et al., 2013), tomate (MENA-VIOLANTE et al., 2007; VALENZUELA-SOTO et al., 2010), trigo (BAIG et al., 2012; UPADHYAY et al., 2012) e canola (ZAID et al., 2006).

Linhagens de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. firmus* e *B. thuringiensis* têm sido utilizadas na formulação de biofertilizantes, biopesticidas e biofungicidas com significativo efeito na promoção do crescimento vegetal e controle de pragas e doenças de plantas (PEREZ-GARCIA et al., 2011; BORRIS et al., 2016). Além deste potencial, bactérias desse gênero são capazes de produzir endósporos, fator que facilita o seu manuseio e aplicação, bem como a possibilidade de sua mistura com outras linhagens bacterianas, fatores estes desejáveis em inoculantes microbianos (FREITAS & VILDOSO, 2004; FRANCIS et al., 2010; BETTIOL et al., 2012; VEJAN et al., 2016; MEENA et al., 2016). A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, utilizada no presente estudo, foi isolada a partir da rizosfera de plantas sadias de guranazeiro (*Paullinia cupana*) em solo amazônico. Esta linhagem vem demonstrando grande potencial promotor de crescimento em culturas agrícolas relevantes para a agricultura nacional como milho e soja, sendo os resultados observados atribuídos principalmente à produção de AIA (BATISTA, 2018).

A maior parte do conhecimento acerca dos genes, vias e regulação de biossíntese de AIA provém de estudos com bactérias Gram-negativas, principalmente com linhagens de *Azospirillum* spp., que possuem amplo uso comercial (ZIMMER et al., 1998; ROTHBALLER et al., 2005; MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2007, 2008; BAUDOIN et al., 2010; JIJÓN-MORENO et al., 2015). Já em bactérias Gram-positivas, como *Bacillus* spp., apesar da importância, o entendimento da sua interação com plantas e as bases genéticas e moleculares dos mecanismos promotores de crescimento vegetal são incipientes (LIU et al., 2016; PÉREZ-FLORES et al., 2017; REPAR et al., 2013).

Dada a importância de linhagens de *Bacillus* spp. como biofertilizantes, e a importância do AIA na promoção do crescimento vegetal, existe um grande interesse na manipulação genética da biossíntese deste fitormônio para maximizar seus resultados benéficos em inoculações com RPCP's, sendo crucial o entendimento dos mecanismos que regulam sua biossíntese e seu papel na interação bactéria-planta. Assim, a presente dissertação levantou as seguintes hipóteses: i) A via IPyA é a principal utilizada pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 para a produção de AIA, e fatores como o L-tryptophan e o AIA modulam a expressão dos genes desta via; ii) O nocaute do gene *ipaC* e consequente perturbação da via IPyA afetam a biossíntese de AIA e capacidade promotora de crescimento da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9.

REFERÊNCIAS

- ASHRAFUZZAMAN M, HOSSEN FA, ISMAIL MR, HOQUE MA, ISLAM MZ, SHAHIDULLAH SM, MEON, S. (2009). Efficiency of plant growthpromoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8 (Suppl 7): 1247- 1252.
- BACH, E., DOS SANTOS SEGER, G. D., DE CARVALHO FERNANDES, G., LISBOA, B. B., PASSAGLIA, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 99, 141-149.
- BAIG, K. S., ARSHAD, M., SHAHAROONA, B., KHALID, A., AHMED, I. (2012). Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of microbiology*, 62(3), 1109-1119.
- BATISTA, B. D. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). (2013). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BATISTA, B. D. (2017). Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- BATISTA, B. D. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological research*, v. 206, p. 33-42, 2018.
- BAUDOIN, E., LERNER, A., MIRZA, M. S., EL ZEMRANY, H., PRIGENT-COMBARET, C., JURKEVICH, E., ... & MOËNNE-LOCCOZ, Y. (2010). Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Research in Microbiology*, 161(3), 219-226.
- BETTIOL W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; JÚNIOR, T.J. DP.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p.155. (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 88).
- BORRISS, R. (2016). Phytostimulation and Biocontrol by the Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: An Update. In: *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer International Publishing, 2016. p.163-184.
- CALVO, P.; KLOPPER, J. W.; NELSON, L. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 383, 3– 41.
- CANBOLAT M, BILEN S, ÇAKMAKÇI R, ŞAHİN F, AYDIN A. (2006). Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42:350–357.
- CHENG X, RUYTER-SPIRA C, BOUWMEESTER H (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Front Plant Sci* 4:199
- DI, D. W.; ZHANG, C.; LUO, P.; AN, C. W.; GUO, G. Q. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA?. *Plant growth regulation*, v.78, n.3, p. 275-285, 2016.
- DOBBELAERE S, CROONENBORGH A, THYS A, VANDE BROEK A & VANDERLEYDEN J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155–164.
- DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.106, n.1, p.85-125.

- EGAMBERDIYEVA, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), 184-189.
- FRANCIS, I., HOLSTERS, M., VEREECKE, D. (2010). The gram-positive side of plant microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1-12.
- FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. Aguiar. (2004). Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, n.6, p.987-994.
- GLICK, B. R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117.
- GOND, S. K., BERGEN, M. S., TORRES, M. S., WHITE JR, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological research*, 172, 79-87.
- GUILFOYLE, T. J., HAGEN, G. "Auxin response factors." *Current opinion in plant biology* 10.5 (2007): 453-460.
- JIJÓN-MORENO, S., MARCOS-JIMÉNEZ, C., PEDRAZA, R. O., RAMÍREZ-MATA, A., DE SALAMONE, I. G., FERNÁNDEZ-SCAVINO, A., ... & BACA, B. E. (2015). The ipdC, hisC1 and hisC2 genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(6), 1501-1517.
- LIU, Y., CHEN, L., ZHANG, N., LI, Z., ZHANG, G., XU, Y & ZHANG, R. (2016). Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4), 324-330.
- MALHOTRA, M., & SRIVASTAVA, S. (2008). An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93 (4), 425-433.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *Eur J Soil Biol* 45:73–80.
- MEENA, V. S., MAURYA, B. R., MEENA, S. K., MEENA, R. K., KUMAR, A., VERMA, J. P., SINGH, N. P. (2016). Can *Bacillus* Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils?. In *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 367-395). Springer, Cham.
- MENA-VIOLANTE, H. G., OLALDE-PORTUGAL, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 103-106.
- OLANREWAJU, O. S., GLICK, B. R., & BABALOLA, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197.
- PÉREZ-FLORES, P., VALENCIA-CANTERO, E., ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J., PELAGIO-FLORES, R., LÓPEZ-BUCIO, J., GARCÍA-JUÁREZ, P., & MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. (2017). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, 254(6), 2201-2213.
- PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D., DE VICENTE, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193.
- RAMESH, A., SHARMA, S. K., SHARMA, M. P., YADAV, N., JOSHI, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhattai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, 73, 87-96.

- REPAR, J., ŠUĆUROVIĆ, S., ZAHRAĐKA, K., ZAHRAĐKA, D., & ĆURKOVIĆ-PERICA, M. (2013). Stress resistance of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* is modulated by auxins. *Canadian journal of microbiology*, 59(11), 766-770.
- ROTHBALLER, M., SCHMID, M., FEKETE, A., & HARTMANN, A. (2005). Comparative in situ analysis of ipdC–gfpmut3 promoter fusions of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1839-1846.
- SHARMA, S. K., RAMESH, A., JOHRI, B. N. (2013). Isolation and characterization of plant growth- promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *J Virol Microbiol*, 2013, 1-19.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, v.31, n.4, p.425-448.
- UPADHYAY, S. K., SINGH, J. S., SAXENA, A. K., SINGH, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- VALENZUELA-SOTO, J. H., ESTRADA-HERNÁNDEZ, M. G., IBARRA-LACLETTE, E., DÉLANO- FRIER, J. P. (2010). Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly Bemisia tabaci development. *Planta*, 231(2), 397.
- VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. *Molecules*, v.21, n.5, p.573.
- VESSEY, J, K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586. WANG, H; INUKAI, Y; YAMAUCHI, A. (2006). Root Development and Nutrient Uptake, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25:3, 279-301.
- WANG, H; INUKAI, Y; YAMAUCHI, A. (2006). Root Development and Nutrient Uptake, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25:3, 279-301.
- ZAIDI, S., USMANI, S., SINGH, B. R., MUSARRAT, J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.
- ZIMMER, W., WESCHE, M., & TIMMERMAN, L. (1998). Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Current microbiology*, 36(6), 327-331.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Interações bactéria-planta

Plantas crescendo em seu ambiente natural são abundantemente colonizadas por micro-organismos. Para esta comunidade, damos o nome de “fitomicrobioma” (SMITH et al., 2017). Micro-organismos são mais antigos na escala evolutiva do que vegetais. Portanto, desde o seu surgimento, plantas interagem com comunidades microbianas. Este longo período de coevolução foi responsável por lapidar interações ecológicas extremamente diversas e complexas (BERG et al., 2014; SMITH et al., 2015).

Bactérias endofíticas colonizam o interior de tecidos de plantas sem causar aparentemente nenhum dano. Portanto, elas se diferenciam das fitopatogênicas, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintas das epifíticas, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Esta classificação tem caráter puramente didático, visto que na natureza ocorre alterações de papéis, dependendo das condições ambientais. Portanto, pode-se dizer que há um gradiente separando essas possíveis relações, o que torna difícil determinar limites exatos para discriminar cada uma das três categorias mencionadas (AZEVEDO et al., 1998, HARDOIM et al. 2015).

A rizosfera constitui outro importante sítio de interação entre plantas e micro-organismos. Esta região é extremamente rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma grande variedade de exsudatos de plantas, como aminoácidos e carboidratos, fornecendo uma rica fonte de energia e nutrientes para a microbiota ali presente (GRAY & SMITH, 2005). São conhecidas como rizobactérias, bactérias capazes de colonizar e sobreviver neste nicho, em distintos estágios do desenvolvimento vegetal, sendo consideradas cruciais para a fertilidade e ciclagem de nutrientes no solo (GLICK, 2012). Estes organismos podem ser de vida livre, fitopatogênicos ou saprofíticos, e sua diversidade varia devido ao tipo de solo, disponibilidade de nutrientes e genótipo e fase do desenvolvimento vegetal (KUNC & MACURA, 1988).

1.2. Aplicação das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP's) constituem um grupo heterogêneo de micro-organismos capazes de influenciar o crescimento e o desenvolvimento vegetal por mecanismos de ação direta e/ou indireta em interação com as raízes das plantas, sendo empregadas na agricultura contemporânea como biofertilizantes, fitoestimulantes ou ainda podendo atuar como moderadoras de estresses de origem biótica e abiótica (VACHERON et al., 2013; BACH et al., 2016).

Biofertilizantes podem ser definidos como produtos biológicos contendo micro-organismos vivos, que quando inoculados em sementes, superfícies de plantas ou solo, promovem o crescimento por meio da disponibilização de nutrientes assimiláveis e aumento de biomassa e superfície radicular (VESSEY, 2003). Estes produtos podem ser utilizados em consórcio com fertilizantes minerais, permitindo reduzir suas doses e obter altas produtividades (CANBOLAT et al., 2006).

Para o desenvolvimento de biofertilizantes eficazes, vários fatores são considerados. Por exemplo, a espécie e cultivar da planta pode às vezes ser um fator determinante na obtenção de resultados benéficos obtidos mediante a inoculação (REMANS et al., 2008). Diferentes genótipos de plantas podem produzir diferentes tipos de exsudatos

radiculares, que influenciam nas condições do meio rizosférico, e servem como substratos para a formação de metabólitos biologicamente ativos pelos micro-organismos (KHALID et al., 2004). A reprodutibilidade dos efeitos da inoculação bacteriana precisa ainda ser testada em uma variedade de tipos de solo e condições ambientais. Outro fator crucial é a formulação comercial. Os micro-organismos utilizados devem ainda ser capazes de sobreviver na formulação selecionada, e produzir a atividade desejada no campo (BASHAN et al., 2014). Além disso, quando utilizados na agricultura convencional, os micro-organismos também devem ser compatíveis com fertilizantes químicos e defensivos agrícolas utilizados durante o cultivo (CALVO et al., 2014). Considerando que as RPCP's começaram a interagir com plantas com flores por volta de 80 a 100 milhões de anos atrás, sua aplicação na agricultura apenas reproduz interações que são bem-sucedidas e foram previamente selecionadas na natureza (GLICK, 2014).

Apesar do grande número de RPCP's descritas com potencial aplicação agrícola, poucas se materializaram em um registro de produto (TIMMUSK et al., 2017). Isso ocorre porque o desenvolvimento de produtos comerciais é um processo complexo, exigindo a ação coordenada de especialistas em várias áreas do conhecimento (DUCA, 2017). Uma vez desenvolvido o produto, o obstáculo à aprovação e ao registro deve ser superado. Regras nacionais ou regionais variáveis e inconsistentes podem ser aplicadas a esse processo, tornando-o caro e demorado (TIMMUSK et al., 2017).

De maneira análoga à seleção de animais e plantas superiores para características produtivas, também há um árduo trabalho no isolamento, triagem, ensaios em laboratório e testes em campo, na obtenção de linhagens bacterianas com comprovada eficiência agrônômica. O Brasil, por sua megabiodiversidade e protagonismo na agricultura mundial, ocupa posição de destaque no estudo e utilização de inoculantes. Segundo a associação nacional dos produtores e importadores de inoculantes (ANPII), no ano 2018, foram comercializadas 73.461.072 doses de inoculantes no Brasil. Deste montante, 87,04 % corresponde a produtos utilizados em lavouras de soja, 12,42 % destinados para gramíneas, e os 0,54 % restantes direcionados às culturas do feijão-comum, feijão-caupi e outras (ANPII, 2020). Estes dados refletem principalmente o amplo uso destes produtos em culturas leguminosas, e o potencial pouco explorado para as demais culturas.

A Transparency Market Research, publicou uma análise do mercado global de biofertilizantes, compreendendo o período de 2017-2022, no qual há uma expectativa de taxa de crescimento anual de 12,9 % (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2020). Atualmente, a participação dos produtos biológicos no mercado de fertilizantes ainda é pequena, detendo apenas 5 % do mercado, sendo em sua maioria produtos utilizando bactérias fixadoras de nitrogênio. No entanto, há uma tendência de crescimento deste setor, com perspectiva de atingir o faturamento de 1,66 bilhão US\$ em 2022 (TIMMUSK et al., 2017).

1.3. Mecanismos bacterianos relacionados à promoção do crescimento vegetal

As rizobactérias podem dispor de um ou vários mecanismos de ação promotora de crescimento vegetal, o que irá depender do *pool* gênico da linhagem em questão. Estes mecanismos atuam sinergisticamente, e podem ser classificados como como diretos ou indiretos (GLICK, 1994). Os mecanismos diretos envolvem: produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas; fixação de nitrogênio; solubilização de fosfatos e sequestro de ferro por sideróforos bacterianos. Já os mecanismos indiretos, incluem: produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase; antibióticos; enzimas de degradação da parede celular; cianeto de hidrogênio; indução de resistência sistêmica; *quorum quenching* e produção de sideróforos (OLANREWAJU et al., 2017). Os mecanismos citados acima têm sido alvo de trabalhos de revisão e livros como em Hayat et al. (2010); Duca et al (2014); Glick

(2015); Olanrewaju et al. (2017) e Prasad et al. (2019). Dentre eles, o que tem recebido atual atenção quanto aos efeitos benéficos advindos de inoculações com RPCP's é a produção de fitormônios.

Fitormônios são mensageiros químicos produzidos em concentrações reduzidas pela planta, com atuação nos locais de síntese e/ou à distância, e que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas. Quase todos os processos fisiológicos vegetais são regulados por duas ou mais classes de hormônios. Dentro dessas classes encontram-se as auxinas, citocininas e giberelinas, além do etileno e ácido abscísico (TAIZ & ZEIGER, 2017). Além de vegetais, micro-organismos também são capazes de sintetizar fitormônios (GLICK, 2015). A síntese destes compostos em alguns organismos ainda não possui uma função clara, mas depreende-se que estes compostos foram selecionados ao longo do processo evolutivo para atuar como mediadores químicos nas diferentes interações ecológicas estabelecidas entre micro-organismos e vegetais.

1.4. Ácido indol-3-acético em interações bactéria-planta

O ácido indol-3-acético (AIA) é uma auxina que desempenha um papel crítico no crescimento e desenvolvimento das plantas, modulando diversos processos biológicos, como a promoção do alongamento e divisão celular, dominância apical, formação de raízes, diferenciação do tecido vascular, biossíntese de etileno, mediação de respostas trópicas (CALVO et al., 2014). É bem documentado que a regulação desses processos envolve mudanças induzidas pelo AIA na expressão gênica, sendo que vários genes *up* ou *down* regulados já foram identificados e caracterizados em plantas (HAGEN & GUILFOYLE, 2002).

A concentração do AIA nas plantas e seu transporte, basípeto ou acrópeto, variam em função do fluxo e efluxo nos tecidos vegetais, de sua biossíntese, da formação de compostos conjugados e de sua degradação (DI et al., 2016). O AIA produzido por bactérias pode alterar o *pool* endógeno da planta, e consequentemente modular processos fisiológicos a seu favor. As consequências destas alterações hormonais variam da patogenicidade à promoção do crescimento, o que irá depender principalmente da natureza química da auxina, quantidade, e sensibilidade por parte da planta, que pode variar entre diferentes tecidos, órgãos, bem como em relação ao genótipo e fase do desenvolvimento vegetal (SPAEPEN et al., 2007; CHENG et al., 2013; DUCA et al., 2014). Além disto, alguns intermediários metabólicos podem possuir efeitos análogos aos exercidos por auxinas, a exemplo do indol-3-piruvato (IPyA), indol-3-acetaldeído (IAAld) e indol-3-acetamida (IAM) (OLANREWANJU et al., 2017).

Estima-se que cerca de 80% das bactérias rizosféricas possuam capacidade de síntese de AIA (SPAEPEN et al., 2007). Esta capacidade é observada tanto em bactérias patogênicas como *Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* e *Pseudomonas syringae*, quanto em RPCP's como *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Azospirillum* spp., *Rhizobium* spp., *Bacillus* spp. e *Enterobacter* spp. (AHMED & HASNAIN, 2014).

Uma das características mais proeminentes em plantas inoculadas com RPCP's é a modificação radicular. O AIA bacteriano frequentemente estimula a formação de pelos radiculares e, quando em concentrações ideais, aumenta o número e comprimento de raízes laterais e primárias (DUCA et al., 2014). Um sistema radicular bem desenvolvido é crucial para a absorção de água, nutrientes, tolerância a estresses e ancoragem das plantas ao solo (WANG et al., 2006). O aumento do enraizamento eleva a absorção de minerais pelas plantas e a exsudação radicular, que por sua vez estimula a colonização bacteriana, ampliando o efeito de inoculação (DOBBELAERE et al., 1999).

À medida que se avançam os estudos e novas bactérias produtoras de AIA são descritas, o papel desta molécula tem demonstrado ir muito além da promoção do crescimento (SPAEPEN et al., 2007). O AIA tem

demonstrado possuir papel ativo na tolerância bacteriana a estresses (BIANCO et al., 2006, 2009; IMPERLINI et al., 2009; KIM et al., 2011; DONATI et al., 2013; REPAR et al., 2013); patogenicidade (COMAI & KOSUGE, 1982; FU et al., 2011); sinalização (YANG et al., 2007; YUAN et al., 2008; MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009; VAN PUYVELDE et al., 2011); regulação da expressão gênica (MIA & SHAMSUDDIN, 2010; NIKLAS & KUTSCHERA, 2012); nodulação (BADENOCHJONES et al., 1983; MATHESIUS et al., 1998; THEUNIS et al., 2004) e defesa vegetal (MATHESIUS et al., 2003; NAVARRO et al., 2006; REMANS et al., 2008).

1.5. Biossíntese bacteriana de ácido indol-3-acético

O AIA bacteriano pode ser produto de vias dependentes e independentes do aminoácido L-triptofano (L-trp). Há poucos relatos das vias independentes do L-trp, e não há até o momento genes e enzimas identificados, o que leva alguns autores até mesmo a questionar a existência dessas vias (DUCA, 2017). Quanto à biossíntese L-trp-dependente, esta pode ocorrer por meio de 4 vias principais: Indol-3- acetonitrila (IAN), Triptamina (TAM); Indol- 3- acetamida (IAM) e Indol-3-piruvato (IPyA) (SPAEPEN et al., 2007; LIN et al., 2015) (Figura 1.1).

Figura 1.1 Representação esquemática das principais vias bacterianas de biossíntese de ácido indol-3-acético L-trp-dependente: IPyA, TAM, IAN e IAM. Modificado de Lin et al. (2018).

Sendo o L-trp o principal precursor do AIA e estando presente inclusive em exsudatos de plantas, sua disponibilidade e concentração no ambiente rizosférico pode influenciar diretamente no grau de resultados benéficos obtidos mediante a inoculação de RPCP's em plantas. Como exemplo, Liu et al. (2016) inocularam *B. amyloliquefaciens* SQR9 em plantas de pepino, sendo observado um aumento na secreção de L-trp pelas raízes de três a quatro vezes em relação ao controle não inoculado. O aumento do L-trp no meio aumentou a produção de AIA, e consequentemente a expressão de genes da biossíntese de auxinas, como o gene *yhcX*. A deleção deste gene eliminou o aumento da área da superfície radicular mediada por SQR9, o que provavelmente foi causado pela redução na

produção de AIA. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o L-trp modula a expressão gênica da biossíntese de auxinas são pouco conhecidos.

Dentre as vias de biossíntese de AIA, as que possuem maior relevância em bactérias associadas às plantas são as vias IAM e IPyA. Alguns autores têm correlacionado estas vias de biossíntese de AIA com o tipo de interação bactéria-planta. Apesar de terem sido relatados intermediários da via IAM em *Arabidopsis thaliana*, esta via aparenta ser específica de micro-organismos, sendo utilizada preferencialmente por fitopatógenos (PIOTROWSKI et al., 2001; POLLMANN et al., 2002, 2003, 2006). Como as plantas geralmente não possuem os intermediários metabólicos desta via, elas podem não ser capazes de manter o AIA em níveis fisiologicamente apropriados ou não tóxicos (PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003).

Por outro lado, a via IPyA que é amplamente utilizada por plantas, é predominantemente observada em micro-organismos não patogênicos como as RPCP's. Esta relação da via IAM ligada a patogenicidade e da IPyA ligada a bactérias endofíticas e rizosféricas, tem sido apoiada através da geração de mutantes de *P. agglomerans* pv. *gypsophila*, uma bactéria indutora de galhas, em que as diferentes vias biossintéticas de AIA foram interrompidas. A inativação da via IAM causou redução no tamanho das galhas, enquanto a da via IPyA demonstrou não influenciar a patogenicidade. O efeito inverso foi observado para a aptidão endofítica. A inativação da via IAM não afetou a capacidade de colonização, enquanto a inativação da via IPyA afetou (MANULIS et al., 1998).

O *Azospirillum brasilense* é uma RPCP Gram-negativa, fixadora de nitrogênio, amplamente utilizada em inoculantes para gramíneas. Dentre seus principais mecanismos de atuação, está o aumento o número de pelos radiculares e raízes laterais, decorrentes da produção de AIA na rizosfera. Nesta espécie, experimentos com mutantes superprodutores de AIA demonstraram um incremento significativo de biomassa radicular em trigo, em relação a linhagem selvagem com produção normal. Este experimento exemplifica o efeito benéfico do AIA produzido por *A. brasilense* associado a via IPyA (GLICK, 2015).

A via IPyA também foi sugerida em alguns fitopatógenos como o *A. tumefaciens*, *P. syringae* pv. *savastanoi* e *P. agglomerans* pv. *gypsophila* (KAPER & VELDSTRA, 1958; MANULIS et al., 1998; BRANDL & LINDOW, 1996, 1997). A presença da via IPyA em alguns desses fitopatógenos foi proposta com base na identificação dos intermediários correspondentes ou com base na capacidade das células bacterianas de metabolizar derivados indólicos oriundos desta via (KAPER & VELDSTRA, 1958; MANULIS et al., 1998). No entanto, é necessário identificar genes desta via e suas respectivas enzimas para confirmar experimentalmente seu envolvimento na biossíntese do AIA nestes organismos (PATTEN et al., 2012).

1.6. Regulação do ácido indol-3-acético bacteriano

Dado o fato de que o AIA é produzido tanto pelas plantas quanto por micro-organismos associados, é difícil compreender como essas duas fontes de AIA interagem e afetam umas às outras (GLICK, 2015). Há relatos de mecanismos de regulação da biossíntese bacteriana de AIA extremamente complexos, ocorrendo em vários níveis, e variando bastante entre diferentes espécies e linhagens (DUCA et al., 2014).

Ao nível genético, diferentes fatores influenciam a produção de AIA, como a localização (cromossomal ou plasmidial) e a quantidade de cópias gênicas. Genes de biossíntese localizados em plasmídeos, ou mesmo no cromossomo em múltiplas cópias, possuem mais sítios de transcrição, e, conseqüentemente, maior capacidade de produção de AIA. Dado que uma linhagem pode apresentar genes de múltiplas vias em seu genoma, Manulis et al.

(1998) observaram que determinadas vias tendem a ser utilizadas em microambientes específicos com o patógeno *P. agglomerans* pv. *gypsophilae*. Nesta linhagem, genes da via IAM foram *up*-regulados no interior dos tecidos vegetais, em oposição ao que ocorre quando a bactéria se encontra-se epifiticamente associada à planta.

Assim como os vegetais, bactérias são capazes de realizar um controle fino sobre a quantidade de AIA. O gene *aiaL* codifica AIA-lisina sintetase, que converte o AIA livre em uma forma conjugada e inativa AIA-lisina. Mutantes perda de função, construídos para este gene no patógeno *P. savastanoi*, acumularam cinco vezes mais AIA livre em meio cultura do que a cepa do tipo selvagem (WOODWARD & BATREL, 2005). A degradação é outro importante fator de regulação. Segundo alguns autores, a degradação ativa do AIA pode suprir a demanda por carbono e nitrogênio no meio rizosférico, além de poder ser uma vantagem competitiva em meios ricos em AIA, nos quais o excesso deste composto pode se tornar tóxico para as colônias bacterianas e para os tecidos vegetais (TROMAS & PERROT-RECHENMANN, 2010). Os degradadores de AIA também podem utilizar esse recurso para manipular a fisiologia das plantas, de modo a beneficiar sua sobrevivência ou colonização em tecidos vegetais (SCOTT et al., 2013).

Entender como os fatores físicos, químicos e biológicos do meio interferem na produção de AIA e promoção do crescimento vegetal é de suma importância para o desenvolvimento de produtos agrícolas, de modo a se maximizar os efeitos benéficos da inoculação por meio de recomendações técnicas de uso. Por este motivo, diversos autores têm testado variações de fatores ambientais, visando compreender o grau de influência de cada fator. Fatores como: L-trp; vitaminas; salinidade; oxigênio; pH; temperatura; fonte de carbono; fonte de nitrogênio; fase de crescimento e nanopartículas metálicas tem demonstrado afetar a produção de AIA bacteriano e interação planta-bactéria (DUCA et al., 2014; GLICK et al., 2015).

1.7. A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 e seu potencial uso como biofertilizante

O gênero *Bacillus*, pertencente à família Bacillaceae, caracteriza-se por sua grande heterogeneidade genética, que se apresenta desde a composição do DNA até as suas diversas condições de crescimento e nutrição (ASH et al., 1991). Inúmeros produtos comerciais contendo *Bacillus* spp. já são comercializados para aplicação em diversas culturas agrícolas, com o objetivo de promover o crescimento ou controlar doenças em plantas (BETTIOL et al., 2012; BORRIS, 2016).

Linhagens de *Bacillus* spp. têm sido reportadas promovendo o crescimento de culturas expressivas como milho (BATISTA et al., 2018; EGAMBERDIYEVA, 2007; GOND et al., 2015), arroz (ASHRAFUZZAMAN et al., 2009), soja (RAMESH et al., 2014; SHARMA et al., 2013), tomate (MENA-VIOLANTE et al., 2007; VALENZUELA-SOTO et al., 2010), trigo (BAIG et al., 2012; UPADHYAY et al., 2012) e canola (ZAID et al., 2006). Bactérias desse gênero também são capazes de produzir endósporos, aumentando a vida útil do produto comercial, bem como um fator que facilita o seu manuseio e aplicação e a possibilidade de sua mistura com outras linhagens bacterianas, fatores estes desejáveis em inoculantes microbianos (FREITAS & VILDOSO, 2004; FRANCIS et al., 2010; BETTIOL et al., 2012; VEJAN et al., 2016; MEENA et al., 2016).

Dentre as linhagens de *Bacillus* sp. com potencial de utilização em biofertilizantes, destaca-se a RZ2MS9. Esta linhagem foi isolada a partir raízes de plantas sadias de guaranazeiro (*Paullinia cupana*) (BATISTA, 2013; BATISTA et al. 2018). Seu potencial para promoção de crescimento foi avaliado *in vitro*, apresentando capacidade de síntese de AIA, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, solubilização de fosfato e promoção de crescimento vegetal (BATISTA, 2013; BATISTA et al. 2018).

Experimentos de inoculação conduzidos por Batista (2017) em plantas mutantes (diageotrópica) de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, demonstraram que na linhagem RZ2MS9 o AIA é o principal mecanismo efetor na promoção do crescimento. A primeira versão do genoma completo da referida linhagem, depositado no GenBank sob o número de acesso: CP049978.1, foi utilizada como referência neste trabalho. A partir deste genoma, foram identificados genes relacionados a promoção do crescimento, em especial alguns associados às vias de biossíntese de AIA IPyA e TAM (BONATELLI et al., 2020).

Mediante análise da anotação funcional feita a partir do genoma completo da linhagem, é sugerida a hipótese de que a via IPyA seja a principal responsável pela biossíntese de AIA. Isto se deve à identificação sequências relacionadas a enzimas atuantes em todos os passos desta via, sendo elas: transaminase, piruvato descarboxilase e aldeído desidrogenase. Também foram encontradas sequências relacionadas a enzimas da via TAM: Trp-decarboxilase, amino oxidase e aldeído desidrogenase, que são comuns a via IPyA. As sequências associadas a esta via não foram abordadas neste trabalho.

Batista (2017) observou que a suplementação de L-trp no meio de cultivo não afeta o crescimento de RZ2MS9, mas incrementa a produção de AIA, o que sugere o potencial regulatório deste fator. Figueiredo (2018), realizou o nocaute do gene *ipdC* em RZ2MS9 por meio da técnica de CRISPR-Cas9, e observou uma redução significativa na produção de compostos indólicos no mutante nas primeiras horas de avaliação, como um leve incremento posterior. Estes resultados sugerem que a via IPyA possui papel principal na biossíntese de AIA por RZ2MS9, e que talvez a via TAM possua papel secundário, o que será investigado em experimentos posteriores.

Referências

- AHMED, A.; HASNAIN, S. (2014). Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Polish Journal Microbiology*, v.63, n.3, p.261-266.
- ANPII (Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes). Estatísticas. Disponível em: (<http://www.anpii.org.br/estatisticas/>). Acesso em 10 de junho de 2020.
- ASH, C.; FARROW, JAE.; WALLBANKS, S.; COLLINS, MD. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters Applied Microbiology*, v.13, p.202-206.
- ASHRAFUZZAMAN M, HOSSEN FA, ISMAIL MR, HOQUE MA, ISLAM MZ, SHAHIDULLAH SM, MEON, S. (2009). Efficiency of plant growthpromoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8 (Suppl 7): 1247- 1252.
- AZEVEDO, J.L. 1998. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) *Ecologia Microbiana*. Ed. EMBRAPA, Jaguariúna-SP. p.117-137.
- BACH, E., DOS SANTOS SEGER, G. D., DE CARVALHO FERNANDES, G., LISBOA, B. B., PASSAGLIA, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 99, 141-149.
- BADENOCHJONES J, ROLFE BG & LETHAM DS (1983) Phytohormones, *Rhizobium* mutants, and nodulation in legumes. 3. Auxin metabolism in effective and ineffective pea root nodules. *Plant Physiol* 73: 347–352.

- BAIG, K. S., ARSHAD, M., SHAHAROONA, B., KHALID, A., AHMED, I. (2012). Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of microbiology*, 62(3), 1109-1119.
- BASHAN Y, DE-BASHAN LE, PRABHU SR, HERNANDEZ J-P. (2014). Advances in plant growth- promoting bacterial inoculant technology-formulations and practical perspectives (1998– 2013). *Plant Soil*.
- BATISTA, B. D. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). (2013). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BATISTA, B. D. (2017). Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- BATISTA, B. D. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological research*, v. 206, p. 33-42, 2018.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., and Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front. Microbiol.* 5:148.
- BETTIOL W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; JÚNIOR, T.J. DP.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p.155. (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 88).
- BIANCO C, IMPERLINI E, CALOGERO R, SENATORE B, AMORESANO A, CARPENTIERI A, PUCCI P, DEFEZ R. (2006). Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Arch Microbiol* 185:373–382.
- BIANCO C, IMPERLINI E, DEFEZ R. (2009). Legumes like more IAA. *Plant Signal Behav* 4:763–765.
- BRANDL MT & LINDOW SE. (1996). Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 62: 4121–4128.
- BRANDL MT & LINDOW SE. (1997). Environmental signals modulate the expression of an indole- 3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol Plant–Microbe Interact* 10: 499–505.
- BONATELLI ML, LI J , DUMARESQ A, QUECINE MC, SETTLES MATTHEW L (2020). Complete genome sequence of *Bacillus* sp. strain RZ2MS9, a multitrait plant growth promoter. *Microbiol Resour Announc* 9:e00623-20.
- BORRIS, R. (2016). Phytostimulation and Biocontrol by the Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: An Update. In: *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer International Publishing, 2016. p.163-184.
- CALVO, P.; KLOPPER, J. W.; NELSON, L. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 383, 3– 41.
- CANBOLAT M, BILEN S, ÇAKMAKÇI R, ŞAHİN F, AYDIN A. (2006). Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42:350–357.
- CHENG X, RUYTER-SPIRA C, BOUWMEESTER H (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Front Plant Sci* 4:199
- COMAI, L.; KOSUGE, T. (1982). Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* 149:40–46.
- DI, D. W.; ZHANG, C.; LUO, P.; AN, C. W.; GUO, G. Q. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA?. *Plant growth regulation*, v.78, n.3, p. 275-285, 2016.
- DONATI, A, J.; LEE, H.; LEVEAU, J, H.; CHANG, W. (2013). Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PloS one* 8:e76559.

- DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.106, n.1, p.85-125.
- DUCA, Daiana. Deciphering how biosynthesis of indoleacetic acid in Rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. 2017.
- EGAMBERDIYEVA, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), 184-189.
- FIGUEREDO, EVERTHON FERNANDES. Nocaute do gene ipdC no *Bacillus* sp. (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9 e influência na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano. Dissertação de mestrado. Piracicaba, 2018. 73 p.
- FRANCIS, I., HOLSTERS, M., VEREECKE, D. (2010). The gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1-12.
- FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. Aguilar. (2004). Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, n.6, p.987-994.
- FU, J.; LIU, H.; LI, Y.; YU, H.; LI, X.; XIAO, J.; et al. (2011). Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiol* 155:589-602.
- GLICK BR. beneficial plant-bacterial interactions. Cham: Springer International Publishing; 2015. Modulating phytohormone levels; pp. 65-96.
- GLICK, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.
- GLICK, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012.
- GLICK, B. R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117.
- Gray, E. J., and Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 395-412. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.08.030
- GOND, S. K., BERGEN, M. S., TORRES, M. S., WHITE JR, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological research*, 172, 79-87.
- GUILFOYLE, T. J., HAGEN, G. "Auxin response factors." *Current opinion in plant biology* 10.5 (2007): 453-460.
- HARDOIM, P. R., VAN OVERBEEK, L. S., BERG, G., PIRTILÄ, A. M., COMPANT, S., CAMPISANO, A., ... & SESSITSCH, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- HAYAT, Rifat et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.
- IMPERLINI E, BIANCO C, LONARDO E, CAMERINI S, CERMOLA M, MOSCHETTI G, DEFEZ R. (2009). Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:727-738.
- KANEHISA M, GOTO S. (2000). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes". *Nucleic Acids Res.* 28 (1): 27-30.
- KAPER, J, M & VELDSTRA, H. (1958). On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim Biophys Acta* 30: 401-420.
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; KAHIR, Z, A. (2004). Screening plant growthpromoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Appl Soil Ecol* 96:473-480.

- KIM, JI.; MURPHY, AS.; BAEK, D.; LEE, S.; YUN, D.; BRESSAN, RA.; NARASIMHAN.; ML. (2011). YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot 62:3981–3992.
- KUNC, FRANTIŠEK; MACURA, J. I. Mechanisms of adaptation and selection of microorganisms in the soil. Developments in agricultural and managed-forest ecology, 1988.
- LIN, Huei-Ru; SHU, Hung-Yu; LIN, Guang-Huey. Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. Microbiological research, v. 216, p. 30-39, 2018.
- LIU, Y., CHEN, L., ZHANG, N., LI, Z., ZHANG, G., XU, Y & ZHANG, R. (2016). Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. Molecular Plant-Microbe Interactions, 29(4), 324-330.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. Eur J Soil Biol 45:73–80.
- MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E.; BARASH, I. (1998). Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. gypsophilae. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.11, n.7, p.634-642.
- MATHESIU, U.; MULDER, S.; GAO, M.; TEPLITSKI, M.; CAETANO-ANOLLES G.; ROLFE BG.; BAUER, WD. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proc Natl Acad Sci USA 100: 1444–1449.
- MEENA, V. S., MAURYA, B. R., MEENA, S. K., MEENA, R. K., KUMAR, A., VERMA, J. P., SINGH, N. P. (2016). Can Bacillus Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils?. In Bacilli and Agrobiotechnology (pp. 367-395). Springer, Cham.
- MIA M.A.B. AND Z.H. SHAMSUDDIN. (2010). *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. Afr. J. Biotechnol. 9 (37): 6001–6009.
- MENA-VIOLANTE, H. G., OLALDE-PORTUGAL, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Scientia Horticulturae, 113(1), 103-106.
- NAVARRO L, DUNOYER P, JAY F, ARNOLD B, DHARMASIRI N, ESTELLE M, VOINNET O & JONES JDG. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science 312: 436–439.
- NIKLAS, K.J.; U, KUTSCHERA. (2012). Plant Development, auxin, and the subsystem incompleteness theorem. Front Plant Sci. 3.
- OLANREWaju, O. S., GLICK, B. R., & BABALOLA, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(11), 197.
- PATTEN, CL.; BLAKNEY, AJC.; COULSON, TJD. (2012). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. Crit Rev Microbiol 1–21.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F., NUSSAUME, L., ROBAGLIA, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. Plant, Cell & Environment, 26(2), 189-199.
- PIOTROWSKI M, SCHONFELDER S &WEILER EW. (2001). The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. J Biol Chem 276: 2616– 2621.
- POLLMANN S, MULLER A, PIOTROWSKI M & WEILER EW. (2002). Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. Planta 216: 155–161.

- POLLMANN S, NEU D &WEILER EW. (2003). Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62: 293–300.
- POLLMANN S, MULLER A &WEILER EW. (2006). Many roads lead to “auxin”: of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biology* 8: 326–333.
- PRASAD, Mahendra et al. Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCP) para Agricultura Sustentável: Perspectivas e Desafios. In: RPCP Melhoria na Agricultura Sustentável. Woodhead Publishing, 2019. p. 129-157.
- RAMESH, A., SHARMA, S. K., SHARMA, M. P., YADAV, N., JOSHI, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhattai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, 73, 87-96.
- REMANS S, BLAIR MW, MANRIQUE G.; et al. (2008). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 302:149–161.
- REPAR, J., ŠUĆUROVIĆ, S., ZAHRAĐKA, K., ZAHRAĐKA, D., & ĆURKOVIĆ-PERICA, M. (2013). Stress resistance of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* is modulated by auxins. *Canadian journal of microbiology*, 59(11), 766-770.
- SCOTT JC, GREENHUT I V., LEVEAU JHJ. 2013. Functional Characterization of the Bacterial iac Genes for Degradation of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid. *J Chem Ecol* 39:942–951.
- SHARMA, S. K., RAMESH, A., JOHRI, B. N. (2013). Isolation and characterization of plant growth- promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *J Virol Microbiol*, 2013, 1-19.
- SMITH, D. L., GRAVEL, V., AND YERGEAU, E. (2017). Editorial: signaling in the phytomicrobiome. *Front. Plant Sci.* 8:611.
- SMITH, D. L., PRASLICKOVA, D., AND ILANGUMARAN, G. (2015). Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Front. Plant Sci.* 6:722.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, v.31, n.4, p.425-448.
- TAIZ, L; ZEIGER, E; et al. (2017). Fisiologia e desenvolvimento vegetal - 6ª Edição. Artmed. 888 p.
- TIMMUSK S, BEHERS L, MUTHONI J, MURAYA A, ARONSSON A-C. 2017. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Front Plant Sci* 8.
- TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Global Biofertilizers Market: Overview. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/biofertilizers-market.html>. Acesso em: 10 de julho de 2020.
- TROMAS A, PERROT-RECHENMANN C. 2010. Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus - Biol* 333:297–306.
- UPADHYAY, S. K., SINGH, J. S., SAXENA, A. K., SINGH, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- VACHERON J, DESBROSSES G, BOUFFAUD M-L, TOURAINE B, MOËNNE-LOCCOZ Y, MULLER D, LEGENDRE L, WISNIEWSKI-DYÉ F, PRIGENT-COMBARET C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4:356.

- VALENZUELA-SOTO, J. H., ESTRADA-HERNÁNDEZ, M. G., IBARRA-LACLETTE, E., DÉLANO- FRIER, J. P. (2010). Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly Bemisia tabaci development. *Planta*, 231(2), 397.
- VAN PUYVELDE S, CLOOTS L, ENGELEN K, DAS F, MARCHAL K, VANDERLEYDEN, J; et al. (2011). Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals na extensive auxin response. *Microb Ecol* 61:723–728.
- VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. *Molecules*, v.21, n.5, p.573.
- VESSEY, J, K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586.
- WANG, H; INUKAI, Y; YAMAUCHI, A. (2006). Root Development and Nutrient Uptake, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25:3, 279-301.
- WOODWARD, A, W & BARTEL, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (London)* 95: 707–735.
- YANG S, ZHANG Q, GUO J, CHARKOWSKI AO, GLICK BR, IBEKWE AM et al. (2007). Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Appl Environ Microbiol* 73:1079–1088.
- YUAN Z, HAUDECOEUR E, FAURE D, KERR KF, NESTER EW. (2008). Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and γ -amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*–plant co-evolution. *Cell Microbiol* 10:2339–2354.
- ZAIDI, S., USMANI, S., SINGH, B. R., MUSARRAT, J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.

2. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA IPyA EM *Bacillus* sp. RZ2MS9

RESUMO

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP's) constituem um importante grupo de bactérias capazes de promover o crescimento de culturas agrícolas por meio de diversos mecanismos. A produção de Ácido Indol-3-Acético (AIA) tem sido reportada como o principal mecanismo neste processo em diversas linhagens. A maior parte do conhecimento sobre a regulação genética da biossíntese de AIA em bactérias é oriunda de trabalhos com linhagens Gram-negativas. A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, uma RPCP Gram-positiva isolada da rizosfera de plantas saudáveis de guaranázeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), vem demonstrando satisfatória capacidade de promoção de crescimento em culturas agrícolas expressivas como milho e soja. Esta capacidade mostrou ser intimamente associada à biossíntese de AIA. No genoma completo de RZ2MS9 foram encontradas sequências relacionadas a diversos mecanismos promotores de crescimento, em especial às associadas a produção de AIA, com ênfase para três genes associados a via do Indol-3-piruvato (IPyA), principal via utilizada por RPCP's. Moléculas como o L-triptofano (L-trp) e o AIA tem demonstrado afetar a expressão dos genes de biossíntese de auxinas em várias RPCP's. Neste contexto, a linhagem RZ2MS9 constitui um organismo modelo interessante para o estudo da regulação da biossíntese de auxinas pela via IPyA em bactérias Gram-positivas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do L-trp e do AIA na expressão dos genes da via IPyA: *aaaT*, *ipdC* e *aldH* em *Bacillus* sp. RZ2MS9. Observou-se que o aumento gradual da suplementação de L-trp ocasionou em aumento da produção de AIA, e que apenas o gene *ipdC* teve expressão diferencial em resposta à este fator, sendo reprimido na maior concentração testada (10 mM) em 21 horas após inoculação (h.a.i.). Em uma abordagem temporal, na concentração de 5 mM de L-trp, observou-se o mesmo padrão de acúmulo gradual de AIA no meio de cultivo, sendo o gene *aaaT* super expresso em 12 h.a.i. e 18 h.a.i.; o gene *ipdC* super expresso em 12 h.a.i. e o gene *aldH* sendo reprimido em 3 h.a.i.. Quanto à suplementação de AIA no meio de cultivo, observou-se uma atividade degradadora de AIA na linhagem RZ2MS9, sendo o gene *aaaT* reprimido na concentração de 60 mM de AIA, o gene *ipdC* super expresso em 120 mM e o gene *aldH* reprimido em 30 mM.

Palavras-chave: *Bacillus*; AIA; expressão gênica; IPyA

MODULATION OF GENE EXPRESSION ON IPyA PATHWAY IN *Bacillus* sp.

RZ2MS9

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR's) are an important group of bacteria capable of promoting the growth of agricultural crops by various mechanisms. The production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) has been reported as the main mechanism in this process in several strains. Most of the knowledge concerning the genetic regulation of IAA biosynthesis in bacteria comes from studies with Gram-negative strains. The *Bacillus* sp. RZ2MS9, Gram-positive PGPR isolated from rhizosphere of guarana healthy plants (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), has been showing a satisfactory ability for growth promoting of expressive agricultural crops such as maize and soybeans. This ability has been shown to be strongly associated with IAA biosynthesis. In the RZ2MS9 genome sequences were found several genes related with growth promoting mechanisms, especially those associated with the production of IAA, with emphasis on three genes associated with the Indol-3-pyruvate (IPyA) pathway, the main pathway used by PGPR's. Molecules such as L-tryptophan (L-trp) and IAA have been shown to affect the expression of auxin biosynthesis genes in several PGPR's. In this context, the strain RZ2MS9 is an interesting model organism for the study of regulation of auxin biosynthesis by the IPyA pathway in Gram-positive bacteria. The objective of the work was to evaluate the effect of L-trp and AIA on the expression of genes of the IPyA pathway: *aaaT*, *ipdC* and *aldH* by *Bacillus* sp. RZ2MS9. It was observed that the gradual increase in L-trp supplementation caused an increase in the production of IAA, and that only the *ipdC* gene had differential expression in response to this factor, being down regulated at the highest concentration tested (10 mM) in 21 hours after inoculation (h.a.i). In a time course assay, at the concentration of 5 mM of L-trp, the same pattern of gradual accumulation of IAA was observed in the culture medium, with the *aaaT* gene up regulated at 12 and 18 h.a.i. of growth; the *ipdC* gene up regulated at 12 h.a.i. of growth and the *aldH* gene being down regulated at 3 h.a.i. of growth. As for the supplementation of IAA in the culture medium, an degrading activity of IAA was observed in the RZ2MS9 strain, with the *aaaT* gene down regulated at 60 mM IAA concentration, the *ipdC* gene up regulated at 120 mM and the regulated *aldH* down gene in 30 mM.

Keywords: *Bacillus*; IAA; gene expression; IPyA

2.1. INTRODUÇÃO

Visando uma agricultura mais produtiva e sustentável, interações benéficas bactéria-planta vêm sendo investigadas para o desenvolvimento de biofertilizantes. Uma destas relações é a promoção do crescimento vegetal, que pode ser realizada por micro-organismos específicos, denominados rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP's). A utilização de biofertilizantes ao redor do mundo tem possibilitado anualmente a economia de milhões de dólares com a aplicação fertilizantes minerais, além de reduzir os impactos ambientais associados a este trato cultural (GLICK, 2012).

Os efeitos benéficos obtidos com a inoculação de RPCP's em culturas agrícolas tem sido atribuídos principalmente ao ácido indol-3-acético (AIA) bacteriano (OLANREWAJU et al., 2017). Este fitormônio é conhecido desde o final do século XIX, sendo mencionado pela primeira vez em por Charles e Francis Darwin (DARWIN & DARWIN, 1880). O AIA desempenha papel crítico no crescimento e desenvolvimento vegetal, modulando diversos processos biológicos, como a promoção do alongamento e divisão celular, dominância apical, formação de raízes, diferenciação do tecido vascular, biossíntese de etileno, mediação de respostas trópicas (TSAVKELOVA et al., 2006; SPAEPEN & VANDER-LEYDEN, 2011)

O AIA produzido por bactérias pode alterar o *pool* endógeno da planta, e consequentemente, modular processos fisiológicos em seu favor (GLICK, 2012). As consequências destas alterações hormonais variam da patogenicidade à promoção do crescimento, o que irá depender principalmente da natureza química da auxina, quantidade, e sensibilidade por parte da planta, que pode variar entre diferentes tecidos, órgãos, bem como em relação ao genótipo e fase do desenvolvimento vegetal (SPAEPEN et al., 2007; CHENG et al., 2013 ; DUCA et al., 2014).

Em bactérias foram descritas vias de biossíntese de AIA dependentes e independentes do aminoácido L-triptofano (L-trp). As vias L-trp-dependentes mais bem descritas são as vias da indol-3-acetamida (IAM) e do indol-3-piruvato (IPyA), sendo esta última predominante em RPCP's (DUCA et al., 2014). Plantas e bactérias podem sintetizar AIA através da via IPyA. Nesta via, inicialmente, o L-trp é desaminado a IPyA por uma aminotransferase. Posteriormente, uma enzima descarboxilase converte IPyA em indol-3-acetaldeído, que é por fim oxidado a AIA pelas enzimas aldeído desidrogenase, mutase ou (RAJAGOPAL 1971; POLLMANN et al., 2006).

A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, isolada da rizosfera de plantas saudáveis de guaranazeiro (*Paullinia cupana*), apresenta amplo potencial promotor de crescimento, demonstrando influenciar o crescimento vegetal principalmente pela produção de AIA (BATISTA, 2013; 2017; BATISTA et al., 2018). Na anotação funcional do seu genoma foram encontradas enzimas relacionadas as vias IPyA e TAM (BONATELLI et al., 2020). Devido a sua relevância para RPCP's, e por ter sido encontrada completa em no genoma de RZ2MS9, este estudo foi focado no estudo dos genes da via IPyA.

O L-trp é considerado o principal modulador da biossíntese AIA, visto que a maioria das vias tem esse aminoácido com precursor (APINE & JADHAV, 2011). A biossíntese de L-trp é energeticamente dispendiosa, necessitando de 75 ligações de fosfato de alta energia para produção de uma molécula, sendo o custo mais alto dentre os aminoácidos (AKASHI & GOJOBORI, 2002). Bactérias diferem quanto a quantidade ótima de L-trp para a máxima produção de AIA. Isso provavelmente se deve à capacidade inerente a cada bactéria de sintetizar L-trp endogenamente (PATTEN et al. 2012; DUCA et al., 2014). Uma maior eficiência na síntese endógena de L-trp pode ser considerada uma vantagem competitiva quando este composto é escasso na rizosfera (SERGEEVA et al. 2007).

Há estudos que sugerem que a expressão de genes da via IPyA seja modulada em parte pelo próprio AIA, caracterizando uma espécie de *feedback* (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011). Vande Broek et al. (1999)

realizaram uma análise de transcrição do gene *ipdC* em *A. brasilense*, e observaram que nesta bactéria a expressão gênica não é afetada pelo L-trp exógeno, mas por outro lado, é ativada pelo produto da via, o AIA. Até o momento, apenas genes de *A. brasilense* se mostraram indutíveis por auxinas exógenas. O AIA, portanto, pode possuir papel ativo na regulação da expressão dos genes envolvidos em sua biossíntese em outras RPCP's.

Tendo em vista o escasso conhecimento acerca da biossíntese e mecanismos regulatórios do AIA em bactérias Gram-positivas, a linhagem RZ2MS9 apresenta-se como um organismo modelo valioso para uma melhor compreensão deste complexo mecanismo promotor de crescimento. O entendimento de como fatores como o precursor L-trp e o produto final AIA modulam a expressão de genes da via IPyA em linhagens Gram-positivas, trará maior base para o uso e aplicações seguras destas linhagens em práticas agrícolas.

2.2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é avaliar a influência da suplementação do aminoácido L-triptofano e do ácido Indol-3-acético na modulação da expressão dos genes *aaaT*, *ipdC* e *aldH* relacionados à via IPyA em *Bacillus* sp. RZ2MS9.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Busca de genes relacionados a via IPyA no genoma de *Bacillus* sp. RZ2MS9

Com base na anotação funcional do genoma da linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 (BONATELLI et al. 2020) e literatura (SPAEPEN, 2007) foi realizada uma busca manual por genes envolvidos na biossíntese de AIA, sendo utilizados neste trabalho os genes atuantes na via IPyA. As sequências foram alinhadas por meio da ferramenta BLASTp do NCBI, e confirmadas por meio do banco de dados UniProt.

2.3.2. Ensaios de expressão gênica

2.3.2.1. Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, isolada da rizosfera de plantas saudáveis de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), é pertencente 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. Nos experimentos de rotina, a referida linhagem foi crescida em meio de cultura estéril Luria Bertani (LB) (triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹), pH = 7, sob agitação constante de 180 rpm e temperatura de 28 °C.

2.3.2.2. Desenho e validação dos primers

Os primers para os genes-alvo de *Bacillus* sp. RZ2MS9 foram desenhados por meio do software Primer3Plus 2.0. Os parâmetros utilizados foram: tamanho entre 18-22 pb, temperatura de anelamento entre 57-63°C, concentração de CG entre 20-40 e tamanho do amplicon entre 90- 200 pb.

Para cada gene, foram desenhados pares de primers (Tabela 2.1), sendo testados em reações preliminares de PCR com gradiente de temperatura (58, 60 e 62°C), visando verificar sua eficiência e temperatura ótima de anelamento.

Tabela 2.1. Primers desenhados para genes atuantes na via IPyA e gene endógeno utilizados neste estudo

Primer	Enzima	Número de acesso	Sequência 5'- 3'	Tamanho do Amplicon	Referência
<i>aaaT</i>	transaminase de aminoácido aromático	QIZ43870.1	GTTGCATTCCGAACGATTTT AAACGAAATCCAGTTTCACGA	137 pb	Presente estudo
<i>ipdC</i>	indol-3-piruvato descarboxilase	QIZ42416.1	TACTATTACAGGCGGCTTCACACAA TCCTGCATTACAACCTGGACCGTATT	111 pb	Presente estudo
<i>aldH</i>	aldeído desidrogenase	QIZ41407.1	TTCGAACTCGTTTCGGTTTA ATGAAGGCATTACAGCGTTT	161 pb	Presente estudo
<i>Udp</i> (endógeno)	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerase	QIZ44949.1	CATACCCAGAAGAGATGAAAT CTGTAAGTTCGTTGCTGAT	89 pb	Teixeira, 2017

2.3.2.3. Extração de RNA

Para garantir a integridade do RNA extraído, os materiais: cadinho, pistilo, espátulas e vidrarias foram fornecidas à 180°C durante 8 h. Os demais materiais termossensíveis foram limpos com água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) à 1%.

Para a extração, 500 µl de RNA protect Bacteria Reagent (Qiagen, USA) foram adicionados a tubos de 1500 µl contendo alíquotas de 250 µl de suspensões bacterianas (OD₆₀₀ nm = 2), e imediatamente vortexados por 5s, incubados a temperatura ambiente por 5 min, centrifugados a 5.000 xg por 15 min, e o pellet bacteriano armazenado a -80°C.

O RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) foi adaptado para o uso em bactérias Gram-positivas. Para lise das células bacterianas, foi empregado o consórcio de lise enzimática (tampão TE + lisozima 20 µg/ml por 30 min a 25°C) com lise mecânica por maceração em nitrogênio líquido utilizando cadinho e pistilo. A etapa de purificação foi realizada seguindo as recomendações do fabricante.

A concentração do RNA extraído foi mensurada por meio do espectrofotômetro NuDrop UVS-99 (Avans, Taiwan). A qualidade da extração foi avaliada mediante corrida em gel de agarose 1%. Todas as extrações seguiram o padrão de integridade com duas bandas nítidas e definidas, correspondentes aos rRNA's bacterianos, que quando íntegros indicam a boa qualidade do mRNA's (Figura 2.1). A concentração de RNA total de todos os materiais foi

corrigida para 250 ng/ μ l por meio de cálculos e diluições com água isenta de RNase. Os RNAs foram devidamente identificados e acondicionados em freezer -80°C.

Figura 2.1. Padrão de integridade das extrações de RNA bacteriano total

2.3.2.4. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante, incubando 11 μ L da amostra do RNA e 1 μ L dos hexâmeros a 65°C por 5 min, seguido da adição dos demais reagentes do kit e incubação a 25°C por 5 min, seguido de 60 min a 42°C e 5 min a 70°C. Foram realizados pré-testes para determinar a melhor concentração de trabalho de cDNA nas reações de qPCR, a que demonstrou melhor resultado foi a de 250 ng/ μ l.

2.3.2.5. Reações de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram preparadas em um volume final de 12,5 μ L contendo: 6,25 μ L de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG; 0,25 μ L de cada par de primer (10 pmol); 3,625 μ L de água ultrapura; 0,125 μ L de carboxy-X-rhodamine (CXR) e 2 μ L cDNA (250 ng/ μ l). As amostras foram amplificadas em aparelho iCycler IQ® Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), programado para as seguintes condições: 95°C por 5' (1X); 95°C por 30", 58°C por 45" (35X); e 95°C por 15", 60°C 60", 95°C 15" (1X) (estágio de dissociação).

Todas as reações processadas utilizando duas repetições técnicas. As eficiências das reações foram analisadas através do programa LinRegPCR (2017). Os valores da expressão relativa foram calculados pelo método de Pfaffl (2001) com o auxílio do software REST (Relative Expression Software Tool) (PFAFFL et al., 2002). A normalização dos genes de referência foi calculada com base na média aritmética dos valores de $E(\text{ref})\Delta\text{CT}$ e a expressão diferencial foi calculada pelo teste de aleatorização de realocação fixa em pares, com valor de bootstrap = 1000.

2.3.2.6. Influência da suplementação de L-trp na expressão dos genes da via IPyA na linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9

As bactérias foram inoculadas na densidade óptica (OD) inicial de 0,1 ($\lambda=600$) e crescidas em erlenmeyers de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultura LB 100%, suplementadas com diferentes concentrações de L-trp (0; 2,5; 5 e 10 mM). O ensaio foi realizado em triplicata biológica. As culturas foram incubadas até 21 horas após inoculação (h.a.i), quando as bactérias alcançam a fase estacionária e maior concentração de AIA (BATISTA, 2017). Os pré-inóculos foram plaqueados em meio LB-ágar em duplicata para confirmar a ausência de contaminação.

Alíquotas de 250 μ L de cada repetição biológica foram retiradas para extração de ácido ribonucleico (RNA). Para estimar a produção de AIA, 500 μ L de cultura, em duplicata, foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para cubetas, nas quais foi adicionado o reativo de Salkowski (BRIC et al., 1991 adaptado para o método quantitativo de HUSEN, 2003), na proporção 2:1. Após a reação por 30 min, 25°C, no escuro, as amostras foram lidas em espectrofotômetro, $\lambda=520$ nm (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech). A reação do sobrenadante da cultura com o reagente de Salkowski, detecta tanto AIA quanto alguns de seus intermediários, como IPyA e IAM (GLICKMANN & 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 absorbância em espectrofotômetro (BRIC et al., 1991). A produção de AIA foi estimada por meio da regressão linear obtida pela construção prévia de uma curva padrão (Figura 2.2). A densidade ótica de crescimento ($\lambda=600$) também foi analisada no momento da obtenção dos filtrados, mediante leitura de 1000 μ L de cultura.

Figura 2.2. Curva de calibração de AIA utilizando os pontos: 0; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 100 μ g de AIA, e suas respectivas absorbâncias. Cada valor de absorbância ($\lambda=520$) é representado pela média de duas replicatas técnicas.

2.3.2.7. Avaliação temporal da expressão dos genes da via IPyA na linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 suplementada com L-triptofano

As bactérias foram inoculadas sob as mesmas condições detalhadas no item 2.3.2.6, com e sem suplementação de L-trp (0 e 5 mM) em triplicata. Foram analisadas amostras coletadas nos tempos: 3, 6, 12, 18 e 21 h.a.i.

As amostras foram divididas em alíquotas para extração de RNA, avaliação de compostos indólicos e crescimento bacteriano, conforme detalhada no item 2.3.2.6.

2.3.2.8. Influência da suplementação de ácido indol-3-acético na expressão dos genes da via IPyA na linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9

As bactérias foram inoculadas sob as mesmas condições detalhadas no item 2.3.2.6, com a suplementação de AIA no meio de cultura, nas concentrações: 0; 30; 60; 120 mM. As bactérias foram crescidas a 180 rpm, 28 °C, por 21 h.a.i.

As amostras foram divididas em alíquotas para extração de RNA, avaliação de compostos indólicos e crescimento bacteriano, conforme detalhada no item 2.3.2.6.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Busca de genes relacionados a via IPyA no genoma de *Bacillus* sp. RZ2MS9

Mediante busca manual sobre a anotação funcional do genoma de *Bacillus* sp. RZ2MS9, com base na literatura (SPAEPEN et al., 2007) e enciclopédia Kyoto de genes e genomas (KEGG), foram encontradas sequências relacionadas a enzimas que catalisam os três passos da via IPyA (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Identificação de proteínas putativas envolvidas na biossíntese de AIA pela via IPyA em *Bacillus* sp. RZ2MS9

Genes e identificadores GenBank - NCBI	Enzimas e números de entrada no KEEG	Tamanho do gene
<i>aldH</i> (QIZ41407.1)	aldeído desidrogenase (NAD+) [EC: 1.2.1.3] K00841	1365 pb
<i>ipdC</i> (QIZ42416.1)	indol-3-piruvato descarboxilase [EC: 4.1.1.74] K04103	1683 pb
<i>aaaT</i> (QIZ43870.1)	transaminase de aminoácido aromático [EC: 2.6.1.57] K00128	1161 pb

2.4.2. Ensaios de expressão gênica

2.4.2.1. Influência da suplementação de L-trp na expressão dos genes da via IPyA pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9

A linhagem RZ2MS9 foi crescida sob a suplementação de diferentes concentrações de L-trp, e após 21 h.a.i. de crescimento o AIA foi quantificado. Observou-se que com o aumento do fornecimento de L-trp, ocorreu um aumento significativo do acúmulo de AIA no meio de cultura (LB), com pico de produção em 10 mM. Quanto ao crescimento bacteriano, a suplementação de L-trp no meio de cultivo demonstrou não influenciar significativamente o crescimento bacteriano (Figura 2.3).

Figura 2.3. Crescimento e produção de auxina por *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meio de cultura LB suplementado com diferentes concentrações de L-triptofano (0; 2,5; 5 e 10 mM) em 21 h.a.i. Os dados mostrados são representativos de 3 repetições biológicas. Pontos acompanhados por mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

O primeiro passo da via IPyA envolve a transaminação do aminoácido L-trp a IPyA, catalisado por transaminases. Uma enzima descrita como atuante neste passo é a transaminase de aminoácido aromático, codificada pelo gene *aaaT*. A expressão deste gene demonstrou não ser indutível nas condições experimentais utilizadas neste estudo, exemplificando um padrão de expressão constitutivo (Figura 2.4 A)

O passo chave da via IPyA envolve a conversão do Indol-3-piruvato a indol-3-acetaldeído, que pode ser catalisado pela enzima IPDC. Este gene demonstrou ser reprimido na concentração de 10 mM de L-trp (Figura 2.4 B). Este resultado sugere que o L-trp pode ter algum grau de influência sobre este gene.

O último passo da via IPyA envolve a oxidação do IAAld a AIA. Este passo pode ser catalisado por múltiplas enzimas, dentre as quais está a aldeído desidrogenase. O gene *aldH* não demonstrou diferença significativa de expressão nas condições experimentais do presente estudo, apresentando padrão constitutivo de expressão (Figura 2.4 C).

Figura 2.4. Expressão relativa dos genes *aaaT* (A), *ipdC* (B) e *aldH* (C) avaliada em *Bacillus* sp. RZ2MS9 por RT-qPCR, crescido em meio de cultura LB sob a suplementação de: 2,5; 5 e 10 mM de L-trp em 21 h de crescimento. Os resultados são representativos de 3 repetições biológicas. As diferenças estatísticas entre as culturas suplementadas e controle (0 Mm de L-trp) foram calculadas pelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*[®]. Os símbolos indicam: * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

2.4.2.2. Avaliação temporal da expressão dos genes da via IPyA na linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 suplementada com L-triptofano

Visando ter uma dimensão temporal da expressão gênica e produção de AIA, foi realizado um ensaio temporal utilizando dados de: 3, 6, 12, 18 e 21 h.a.i. de crescimento bacteriano na concentração de 5 mM de L-trp, que é a mais utilizadas para diversas RPCP's descritas.

Quanto à produção de AIA, nota-se um aumento gradual em seu acúmulo no meio de cultura com o passar do tempo, tanto na condição controle (não suplementada) quanto na tratada (5 mM de L-trp). Nas culturas suplementadas com L-trp, nota-se um acúmulo superior em relação ao controle (Figura 2.5).

Figura 2.5. Produção de AIA avaliada em: 3, 6, 12, 18 e 21 h.a.i. de crescimento de culturas de *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meio de cultura LB suplementado (5 mM de L-trp) e controle (0 mM de L-trp). Os resultados são representativos de 3 repetições biológicas

O crescimento bacteriano foi avaliado nos tempos utilizados neste estudo. Nota-se uma curva típica de crescimento bacteriano tanto no controle quanto no tratamento, não havendo diferença clara entre as curvas (Figura 2.6).

Figura 2.6. Crescimento bacteriano avaliado em: 3, 6, 12, 18 e 21 h.a.i de crescimento de culturas de *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meio de cultura LB suplementado (5 mM de L-trp) e controle (0 mM de L-trp). Os resultados são representativos de 3 repetições biológicas.

Em relação à expressão gênica de genes da via IPyA, observou-se diferença significativa da expressão do gene *aaaT* 12 e 18 h.a.i. de RZ2MS9, sendo em ambos os casos super expressos (Figura 2.7 - A). O gene *ipdC* foi reprimido em 12 h.a.i (Figura 2.7 - B). Já o gene *aldH*, que codifica a enzima aldeído desidrogenase, mostrou ser super expresso em 3 h.a.i. (Figura 2.7 -C).

Figura 2.7. Expressão relativa dos genes *aaaT* (A), *ipdC* (B) e *aldH* (C) avaliada em: 3, 6, 12, 18 e 21 h.a.i. pela linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, crescido em meio de cultura LB nas condições controle (0 mM de L-trp) e tratado (5 mM de L-trp). Os resultados são representativos de 3 repetições biológicas. As diferenças estatísticas entre as culturas suplementadas e controle, em cada tempo, foram calculadas pelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*[®]. Os símbolos indicam: * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

2.4.2.3. Influência da suplementação de ácido indol-3-acético na expressão dos genes da via IPyA na linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9

Foi avaliada influência da suplementação de diferentes concentrações de AIA na expressão relativa dos genes da via IPyA. Também foi avaliado o crescimento bacteriano e AIA remanescente no meio de cultivo após 21 h.a.i. As diferentes concentrações de AIA utilizadas (0, 30, 60 e 120 Mm) demonstraram não afetar significativamente o crescimento bacteriano, por meio da avaliação da densidade óptica (Figura 2.8).

Figura 2.8. Crescimento bacteriano avaliado em meio de cultura LB nas suplementações de: 0, 30, 60 e 120 mM de ácido indol-3-acético 21 h.a.i. Os resultados são representativos de 3 repetições biológicas. Barras contendo letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey 5%.

Quanto ao AIA acumulado no meio, observou-se uma relação inversamente proporcional, sendo que quanto maior a suplementação de AIA, maior foi a degradação deste composto pela bactéria. Nota-se redução estatisticamente significativa entre os tratamentos após 21 h.a.i. de crescimento (Figura 2.9).

Figura 2.9. Avaliação de AIA remanescente no meio de cultivo após 21 h.a.i. de crescimento de *Bacillus* sp. RZ2MS9 em meio de cultura LB suplementado com: 0, 30, 60 e 120 mM de AIA. Os dados são representativos de 3 repetições biológicas. Barras contendo mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Quanto à expressão gênica, em 21 h.a.i, nota-se que o gene *aaaT* é diferencialmente expresso apenas na concentração de 60 mM de AIA, sendo super expresso. O gene *ipdC* mostrou ser reprimido na concentração 120 mM de AIA. Para o gene *aldH*, que codifica a enzima aldeído desidrogenase, observou-se repressão na concentração 30 mM de AIA (Figura 2.10 A, B, C).

Figura 2.10. Expressão dos genes *aaaT* (A), *ipdC* (B) e *aldH* (C) em *Bacillus* sp. RZ2MS9 crescido em meio de cultura LB suplementado com diferentes concentrações de AIA (30, 60 e 120 mM), avaliada 21 h.a.i. Os resultados são representativos de 3 repetições biológicas. As diferenças estatísticas entre as culturas suplementadas e controle (0 mM de AIA) foram calculadas pelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*[®]. Os símbolos indicam: * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

2.5. DISCUSSÃO

Grande parte dos processos fisiológicos em plantas são regulados por auxinas, principalmente pelo AIA. Além dos vegetais, bactérias rizosféricas e fitopatogênicas também são capazes de sintetizar este fitormônio, e assim modular o crescimento e desenvolvimento vegetal. Esta capacidade tem sido explorada na criação de biofertilizantes, que são produtos-chave para uma agricultura mais produtiva e sustentável.

Estudos quanto ao papel e a regulação da biossíntese de AIA em linhagens Gram-positivas como *Bacillus* spp. são escassos. A maioria do conhecimento disponível até o momento provém de linhagens Gram-negativas fitopatogênicas como *Dickeya dadantii* e *P. agglomerans*, bem como de RPCP's como *A. brasilense* e *Enterobacter cloacae* (PATTEN et al., 2012). Linhagens de *Bacillus* spp. têm sido descritas como “microfábricas potentes de AIA”, constituindo um gênero com amplo potencial para estudo e aplicação no campo agrícola, ainda pouco conhecido e explorado (WAGI & AHMED, 2019).

Interessantemente, a redundância metabólica para as vias de biossíntese de AIA parece ser o padrão em RPCPs, possibilitando a ativação de vias alternativas caso uma via em particular seja inviabilizada (DUCA et al., 2014). Em *A. brasilense* por exemplo, as tentativas de se isolar mutantes completamente desprovidos de capacidade de síntese de AIA não obtiveram sucesso (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2008). A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, aparentemente também apresenta esta redundância metabólica, pois em seu genoma completo, foram encontradas sequências relacionadas a todos os passos das vias IPyA e TAM. sendo aqui investigados apenas os genes relacionados a via IPyA. Os genes associados a via TAM serão avaliados em experimentos posteriores.

O L-trp é considerado o principal fator modulador do AIA bacteriano, pelo fato de ser precursor da maioria das vias descritas. Para a linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, observou-se que a suplementação de L-trp no meio de cultivo não afeta o crescimento bacteriano, mas induz um aumento significativo na produção de compostos indólicos, chegando a aumentos de 244%, 477% e 1384% nas suplementações de 2,5; 5 e 10 mM de L-trp, respectivamente. Resultados análogos foram encontrados em outras linhagens bacterianas como *A. brasilense* SM, *Pantoea agglomerans* PVM, *Rizhobium* sp., *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus casei* e *Bacillus subtilis* (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009; APHINE & JADHAV, 2011; KUMAR & RAM, 2012; MOHITE, 2013). A quantidade de AIA secretada por *A. brasilense* aumentou até 10.000 % quando o L-trp foi adicionado ao meio (BACA et al., 1994). Patten & Glick (2002), em seus experimentos com linhagens de *P. putida*, também observaram correlação positiva entre L-trp e AIA. Da mesma forma, Akbari et al. (2007) relataram que a produção de AIA por diferentes isolados de *Azospirillum* spp. aumentou quando o meio de cultura foi suplementado com L-trp. Wagi & Ahmed (2019), utilizando duas linhagens de *Bacillus*, também identificaram incremento na produção de AIA em resposta ao L-trp, com produção máxima na concentração de 30 mg/mL, corroborando nossos resultados.

A via indol-3-piruvato é amplamente utilizada para a síntese de AIA em RPCP's (DUCA et al., 2014). Na primeira etapa dessa via, o L-trp é desaminado em IPyA, essa etapa é catalisada por uma transaminase (aminotransferase), que pode ser uma enzima transaminase de aminoácido aromático (AAAT). A importância dessas enzimas para a biossíntese de auxina foi demonstrada em várias linhagens bacterianas (RUCKDÄSCHEL et al., 1988, KITTEL et al., 1989, BACA et al., 1994, PEDRAZA et al., 2004, SERGEEVA et al. 2007; CASTRO-GUERRERO et al., 2011; KULKARNI et al., 2013). O presente estudo é pioneiro na avaliação da expressão do gene *aaaT* em *Bacillus* spp. Não foi observada alteração da expressão deste gene em 21 h.a.i. de crescimento nas diferentes suplementações de L-trp. Já nos tempos 12 e 18 h.a.i., sob a concentração de 5 mM de L-trp, a expressão desse gene foi 117% e 142%

superior ao controle, respectivamente. A expressão aumentada nestes tempos pode estar correlacionada com uma maior conversão de L-trp livre em compostos intermediários de AIA, como o IPyA.

A aminotransferase purificada de *E. cloacae*, exibiu uma baixa afinidade pelo L-trp ($K_m = 3,3 \text{ mM}$) (KOGA et al., 1994), e como os níveis endógenos de L-trp livre geralmente são muito mais baixos ($\sim 20 \mu\text{M}$), isso pode explicar a necessidade de um suprimento exógeno de L-L-trp para a síntese de AIA por essa via (PATTEN et al., 2012). Kulkarni et al. (2013) observaram que a AAAT de *Pantoea dispersa* GPK é altamente específica em relação ao L-trp, e uma correlação significativa foi observada entre a quantidade de L-trp suplementada no meio de cultivo e a atividade da AAAT. De acordo com Koga et al. (1994), devido à baixa especificidade da maioria das aminotransferases e sua ação reversível nas reações, essas enzimas apesar de claramente envolvidas na biossíntese da AIA, talvez não sejam pontos-chave de regulação. Pedraza et al. (2004) relataram que a linhagem A15 de *Pseudomonas stutzeri*, apesar de possuir três isoformas de AAAT's com alta atividade enzimática em relação às demais linhagens avaliadas, apresentou baixa produção de compostos indólicos totais e AIA em meio de cultura com ou sem adição de L-trp. Upadhyay et al. (2012) apresentam um resumo dos genes e proteínas bacterianos envolvidos na produção de AIA e seus mecanismos de regulação, e mostram que os AAAT's possuem expressão predominantemente constitutiva em RPCP's, o que corrobora nossos resultados. Em RZ2MS9 a importância desta proteína (AAAT) para a biossíntese de AIA necessita ainda ser validada por meio de ensaios enzimáticos e experimentos com mutantes perda de função.

A etapa principal da via IPyA é catalisada pela enzima indole-3-piruvato descarboxilase (IPDC), codificada pelo gene *ipdC*. Essa enzima foi relatada em várias cepas de RPCP's, e sua importância para a biossíntese de AIA é bem documentada (SPAEPEN et al., 2007). O gene *ipdC* no presente estudo mostrou ser 62% *down* regulado na concentração de 10 mM de L-trp, que corresponde ao pico de acúmulo de compostos indólicos no meio de cultivo. Esta redução na expressão pode estar associada a algum mecanismo de controle da produção de auxina por meio de *feedback*, reduzindo a expressão em altas concentrações de auxina.

Quanto à avaliação temporal, foi observado um incremento de 123% na expressão gênica de *ipdC*. 12 h.a.i. Observa-se também, que neste tempo a bactéria se aproxima da fase estacionária de crescimento. De modo semelhante, em *A. brasilense*, a produção AIA e expressão do gene *ipdC* aumentaram nas condições de limitação de carbono, fase estacionária de crescimento e pH ácido (ONA et al., 2003, 2005; VANDE BROEK et al., 2005). A produção de AIA é tipicamente associada a uma redução da taxa de crescimento ou a entrada na fase estacionária de crescimento, o que está de acordo com nossos resultados (DUCA et al., 2014)

Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Zimmer et al. (1998) e Patten & Glick (2002a), que relataram um aumento na expressão do gene *ipdC* em *A. brasilense* Sp7 e *P. putida* GR12-2, respectivamente, em resposta ao L-trp exógeno. Patten & Glick (2002b) também observaram que células cultivadas na presença de L-trp tinham cinco vezes mais atividade promotora de *ipdC* do que aquelas cultivadas na ausência de L-trp.

Ryu e Patten (2008) observaram que culturas de *E. cloacae* do tipo selvagem não produziram quantidades detectáveis de AIA na fase de crescimento logarítmica com suplementação de L-trp ou estacionária na ausência de L-trp. Já a expressão do gene *ipdC* em ambas as condições ainda era detectável. Brandl & Lindow (1998) observaram que em *P. agglomerans*, o gene *ipdC* não foi influenciado pelo L-trp. Ona et al. (2005), sugerem que a expressão do gene *ipdC* é concomitante à produção de AIA no meio de cultura e independente da presença de L-trp. Estes resultados exemplificam um comportamento de expressão constitutivo e não indutível pelo L-trp do gene *ipdC* em outras linhagens, contrastando com os resultados encontrados no presente estudo.

Os genes responsáveis pelas enzimas que catalisam o último passo da via IPyA em RPCP's, que consiste na oxidação do IAAld em AIA, permanecem pouco discutidos (DUCA et al., 2014). Uma das enzimas prováveis que atuam nesta etapa é a aldeído desidrogenase, que é codificada pelo gene *aldH*. Nosso estudo mostrou que a expressão do gene *aldH* na linhagem RZ2MS9 não foi significativamente alterada pelo L-trp exógeno no tempo de 21 h.a.i., sob diferentes concentrações. Já na avaliação temporal, sob a suplementação de 5 mM de L-trp, este gene foi 86% reprimida em 3 h.a.i. de crescimento. Esta repressão pode estar associada a fase de crescimento bacteriano, visto que o AIA é produzido em maior quantidade na fase estacionária. Ressalta-se que nossos resultados são pioneiros na avaliação da expressão deste gene em *Bacillus* spp.

Li et al. (2018), demonstraram que a produção de AIA em *Arthrobacter pascens* ZZ21 aumentou 350% quando 1 mM de L-trp foi adicionado ao meio de cultivo, indicando que nesta linhagem, assim como em RZ2MS9, a biossíntese de AIA é significativamente induzida por L-trp. Nesta linhagem, os genes *prf* e *aldH*, que codificam aldeído desidrogenases, tiveram sua expressão aumentada em 180% e 80%, respectivamente, o que contrasta com nossos resultados. Em *P. syringae*, mutantes deletérios para enzimas aldeído desidrogenases mostraram menor produção de AIA e redução na patogenicidade (MCLERKIN et al, 2018). Em RZ2MS9, portanto, este gene não aparenta ser um ponto-chave de regulação, e para confirmar a importância desta enzima para a produção de AIA nesta linhagem são necessários testes enzimáticos e com mutantes deletérios.

Para RZ2MS9, a suplementação de AIA no meio de cultivo demonstrou não afetar significativamente o crescimento bacteriano nas diferentes concentrações avaliadas. Por outro lado, observou-se na quantificação de compostos indólicos uma atividade degradadora de AIA na referida linhagem. Muitas bactérias têm a capacidade de degradar ativamente o AIA (MINO, 1970; CLAUS & KUTZNER, 1983; GIEG et al., 1996; JARABO-LORENZO et al., 1998; LEVEAU & LINDOW, 2005; LEVEAU & GERARDS, 2008; FAURE et al., 2009; SCOTT et al., 2013; ZUÑIGA et al., 2013).

Foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes da via IPyA em RZ2MS9 sob a suplementação de diferentes concentrações de AIA. O gene *aaaT* foi *down* regulado 63% na concentração de 60 mM. O gene *ipdC*, foi 133% *up* regulado em na concentração de 120 mM. Já o *aldH* sofreu redução de 77% sob 30 mM de AIA. Estes resultados mostram que o AIA exerce certo grau de regulação sobre os genes da via IPyA em RZ2MS9, e que sua concentração de efeito difere entre genes.

De modo análogo, Van puyvelde et al. (2011) também observaram influência da suplementação de 1 mM AIA na expressão gênica de *A. brasilense*. Neste estudo, uma análise transcriptômica mostrou 247 genes diferencialmente expressos em função da suplementação de AIA, sendo os genes *aldH* e *ipdC* *up* regulados.

Zhang et al. (2020) verificaram que o crescimento de *Ganoderma lucidum* foi inibido por 10 µM de AIA exógeno, concentração esta inferior a menor utilizada neste estudo (30 mM), o que contrasta com nossos resultados. Por outro lado, por meio de análise de RNAseq, foram observadas alterações nos transcritos de *G. lucidum* em culturas suplementadas com 1 mM de AIA. Dentre os genes envolvidos na biossíntese de AIA, duas *aldH* foram diferencialmente expressas, sendo uma *up* regulada e outra *down* regulada, corroborando com nossos resultados.

A natureza auxina-responsiva da IPDC em *A. brasilense* Sp245 foi demonstrada através da criação de uma linhagem mutante. Este estudo confirmou a regulação positiva do *ipdC* sob indução de AIA, assim como observado por nós em RZ2MS9, o que corrobora com nossos achados. No entanto, não foi observada regulação positiva com o precursor L-trp e IPyA, diferente dos nossos resultados. Este foi o primeiro relato que descreve a indução de qualquer gene bacteriano pelo AIA (VANDE BROEK et al., 1999).

Estenson et al., (2018) realizaram uma análise proteômica de *Pantoea* sp. YR343, e observaram que dentre as enzimas atuantes na biossíntese de AIA nesta linhagem, apenas a IPDC foi diferencialmente abundante quando as células bacterianas foram cultivadas na presença de 500 μ M AIA, concentração esta 60 vezes inferior a menor utilizada no nosso estudo.

Vande Broek et al. (2005) estudaram a região promotora do gene *ipdC* de *A. brasilense* Sp245, e revelaram a presença de um elemento responsivo à auxina bacteriana (AuxRE). Outro trabalho posterior revelou que estrutura e presença deste elemento regulatório varia entre diferentes linhagens de *A. brasilense*, e, portanto, cada linhagem possui um sistema regulatório intrínseco (MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2008). Portanto, RZ2MS9 denota um mecanismo regulatório complexo dos genes da via IPyA, com seus genes apresentando uma aparente independência regulatória (Figura 2.11).

Figura 2.11. A – Esquema ilustrando a via IPyA e os genes avaliados (L-trp = L-triptofano, aaaT = Transaminase de aminoácido aromático, IPyA = Indol-3-piruvato, ipdC = indol-3-piruvato descarboxilase, IAAld = indol-3-acetaldeído, aldH = aldeído desidrogenase). **B** - Heatmap dos dados de expressão gênica resumindo o comportamento de expressão dos genes avaliados nos 3 experimentos realizados: **B1** – Expressão gênica sob a suplementação de diferentes concentrações de L-trp; **B2** – Expressão dos genes em time course sob a suplementação de 5 mM de L-trp; **B3** – Expressão dos genes sob a suplementação de diferentes concentrações de AIA. A coloração reflete o nível de expressão dos genes avaliados.

O presente estudo traz luzes ao conhecimento sobre a regulação da via IPyA na linhagem Gram-positiva *Bacillus* sp. RZ2MS9. A elucidação do complexo sistema de regulação da biossíntese do AIA em RZ2MS9 trará base para o estudo e desenvolvimento de produtos agrícolas utilizando esta linhagem.

2.6. CONCLUSÕES

A suplementação de L-trp exógeno durante o cultivo de *Bacillus* sp. RZ2MS9 não afeta significativamente o crescimento bacteriano, mas acarreta um aumento gradual no acúmulo de compostos indólicos no meio de cultivo. O L-trp está relacionado à modulação da expressão dos genes *aaaT*, *ipdC* e *aldH*, sendo que cada gene foi distintamente afetado dependendo do tempo de crescimento e concentração de L-trp.

O AIA exógeno suplementado no meio de cultivo mostrou não influenciar significativamente o crescimento de *Bacillus* sp. RZ2MS9. Também foi observado indícios de uma atividade degradadora de AIA nesta linhagem. Os genes *aaaT*, *ipdC* e *aldH* foram afetados em diferentes níveis pelo AIA exógeno, e cada gene variou quanto a concentração de efeito.

REFERÊNCIAS

- APINE OA, JADHAV JP. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. J Appl Microbiol 110:1235–1244.
- AKASHI H, GOJOBORI T. (2002). Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci USA, 99, 3695–3700
- ABBAS-AKBARI G, MEHDI ARAB S, ALIKHANI H A, ALLAHDAI I, ARZANESH MH. 2007. Isolation and Selection of Indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of Superior Strains Effects on Wheat Roots. World J Agric Sci 3:523–529.
- BACA BE, SOTO-URZUA L, XOCHIHUA-CORONA YG, CUERVO-GARCIA A (1994). Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indoleacetic acid in *Azospirillum* strains. Soil Biol Biochem 26:57–63.
- BASSE CW, LOTTSCHEICH F, STEGLICH W, KAHMANN R. Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Eur J Biochem. 1996; 242:648–656.
- 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.
- BATISTA, B. D. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). (2013). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BATISTA, B. D. (2017). Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- BATISTA, B. D. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. Microbiological research, v. 206, p. 33-42, 2018.
- BRANDL MT & LINDOW SE. (1997). Environmental signals modulate the expression of an indole- 3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. Mol Plant–Microbe Interact 10: 499–505.
- CASTRO-GUERRERO J, ROMERO A, AGUILAR JJ, XIQUI ML, SANDOVAL JO, BACA BE. (2012). The *hisC1* gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in *Azospirillum brasilense* Sp7, expressed in wheat. Plant Soil 356:139–150
- CHENG X, RUYTER-SPIRA C, BOUWMEESTER H (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. Front Plant Sci 4:199.

- CLAUS G, KUTZNER HJ (1983) Degradation of indole by *Alcaligenes* sp. *Syst Appl Microbiol* 4:169–180.
- DARWIN C, DARWIN, F. (1880). *The Power of Movement in Plants*. John Murray, London.
- DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.106, n.1, p.85-125.
- ESTENSON K, HURST GB, STANDAERT RF, ET AL. Characterization of Indole-3-acetic Acid Biosynthesis and the Effects of This Phytohormone on the Proteome of the Plant-Associated Microbe *Pantoea* sp. YR343. *J Proteome Res.* 2018;17(4):1361-1374. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00708.
- FAURE D, VEREECKE D, LEVEAU JH. (2009). Molecular communication in the rhizosphere. *Plant Soil* 321:279–303
- FRANCIS, I., HOLSTERS, M., VEREECKE, D. (2010). The gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1-12.
- FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. Aguilar. (2004). Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, n.6, p.987-994.
- GIEG LM, OTTER A & FEDORAK PM. (1996). Carbazole degradation by *Pseudomonas* sp LD2: metabolic characteristics and the identification of some metabolites. *Environ Sci Technol* 30: 575–585
- GLICK, B. R. (2012). *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica 2012.
- 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.
- HUSEN, E. (2013). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 4.
- JARABO-LORENZO A, PEREZ-GALDONA R, VEGA-HERNANDEZ M, TRUJILLO J & LEON-BARRIOS, M. (1998). Indole-3-acetic acid catabolism by bacteria belonging to the *Bradyrhizobium* genus. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* (Elmerich C, Kondorosi A & Newton WE, eds), p. 484. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- KANEHISA M, GOTO S. (2000). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes". *Nucleic Acids Res.* 28 (1): 27–30.
- KITTELL, BL.; HELINSKI, DR.; DITTA, GS. (1989). Aromatic aminotransferase activity and indoleacetic acid production in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 171:5458–5466.
- KULKARNI, G. B.; NAYAK, A. S.; SAJJAN, S. S.; OBLESHA, A.; KAREGOUDAR, T. B. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathway and aromatic amino acid aminotransferase activities in *Pantoea dispersa* strain GPK. *Lett. Appl. Microbiol.* 2013, 56 (5), 340–347
- KOGA J, SYOONO K, ICHIKAWA T, ADACHI T. (1994). Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Biochim Biophys acta Protein Struct Mol Enzymol* 1209:241–247.
- KUMAR PR, RAM MR. (2012). Production of indole acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Vigna trilobata* (L.) Verdc. *P. Afr J Microbiol Res* 6:5536–5541.
- LATIFI A, FOGLINO M, TANAKA K, WILLIAMS P, LAZDUNSKI, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationaryphase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21:1137–1146.

- LEVEAU JHJ & LINDOW SE. (2005). Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl Environ Microbiol* 71: 2365–2371.
- LEVEAU JHJ, GERARDS S, DE BOER W & VAN VEEN JA (2004). Phylogeny-function analysis of (meta)genomic libraries: screening for expression of ribosomal RNA genes by largeinsert library fluorescent in situ hybridization (LIL-FISH). *Environ Microbiol* 6: 990–998
- LI, MENGSHA ET AL. Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 2, p. 443, 2018.
- MALHOTRA, M., & SRIVASTAVA, S. (2008). An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93 (4), 425-433.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *Eur J Soil Biol* 45:73–80.
- MCCLERKLIN, SHERI A. ET AL. Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS pathogens*, v. 14, n. 1, p. e1006811, 2018.
- MEENA, V. S., MAURYA, B. R., MEENA, S. K., MEENA, R. K., KUMAR, A., VERMA, J. P., SINGH, N. P. (2016). Can *Bacillus* Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils?. In *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 367-395). Springer, Cham.
- MINO, Y. (1970). Studies on the destruction of indole-3-acetic acid by a species of *Arthrobacter* IV. Decomposition products. *Plant Cell Physiol* 11: 129–138.
- 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.
- RAJAGOPAL, R. (1971). Metabolism of indole-3-acetaldehyde. III. Some characteristics of the aldehyde oxidase of *Avena coleoptiles*. *Physiol Plant* 24:272–281
- OLANREWAJU, O. S., GLICK, B. R., & BABALOLA, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197.
- ONA O, SMETS I, GYSEGOM P, BERNAERTS K, VAN IMPE J, PRINSEN E & VANDERLEYDEN J. (2003). The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Symbiosis* 35: 199–208.
- 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 Microbiol Lett* 246:125–132.
- PATTEN CL & GLICK BR. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42: 207–220.
- PATTEN CL & GLICK BR. (2002a). Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol* 48:635–642.
- PATTEN CL & GLICK BR. (2002b). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68: 3795–3801.
- PATTEN, CL.; BLAKNEY, AJC.; COULSON, TJD. (2012). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 1–21.
- PEDRAZA, R. O., RAMÍREZ-MATA, A., XIQUI, M. L., BACA, B. E. (2004). Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS microbiology letters*, 233(1), 15-21.
- PEROZICH, J.; NICHOLAS, H.; WANG, B.; LINDAHL, R.; HEMPEL, J. (1999). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* 8:137–146.

- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, London, v. 29, p. 2002-2007, 2001.
- PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W., & DEMPFLER, L. (2002). Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- POLLMANN S, MULLER A &WEILER EW. (2006). Many roads lead to “auxin”: of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biology* 8: 326–333.
- RUCKDÄSCHEL E, KITTELL BL, HELINSKI D, KLINGMUELLER, U. (1988). Aromatic amino acid aminotransferases of *Azospirillum lipoferum* and their possible involvement in IAA biosynthesis. In: *Azospirillum* IV. Springer, pp 49–53
- RYU, R. J., PATTEN, C. L. (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7200-7208.
- SALEH SS & GLICK BR (2001). Involvement of gacS and rpoS in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Can J Microbiol* 47:698–705.
- SCOTT JC, GREENHUT I V., LEVEAU JHJ. 2013. Functional Characterization of the Bacterial iac Genes for Degradation of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid. *J Chem Ecol* 39:942-951.
- SERGEEVA, E.; HIRKALA, D. M.; NELSON, L. Production of indole-3- acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. *Plant Soil* 2007, 297 (1–2), 1–13.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, v.31, n.4, p.425-448.
- SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;3:a001438.
- TROMAS A, PERROT-RECHENMANN C. 2010. Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus - Biol* 333:297–306.
- TSAVKELOVA, E. A; S. Y. KLIMOVA, T. A. CHERDYNTSEVA, AND A. NETRUSOV, “Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review,” *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 42, no. 2, pp. 117–126, 2006.
- UPADHYAY, S. K., SINGH, J. S., SAXENA, A. K., SINGH, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- VANDE BROEK, A.; GYSEGOM, P.; ONA, O.; HENDRICKX, N.; PRINSEN, E.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2005, 18 (4), 311–323
- VANDE BROEK, A.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins Upregulate Expression of the Indole-3-pyruvate Decarboxylase Gene in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 1999, 181 (4), 1338– 1342
- VAN PUYVELDE S, CLOOTS L, ENGELEN K, DAS F, MARCHAL K, VANDERLEYDEN, J; et al. (2011). Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microb Ecol* 61:723–728.

- VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. *Molecules*, v.21, n.5, p.573.
- WAGI, SHABANA; AHMED, AMBREEN. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, v. 7, p. e7258, 2019.
- YOSHIDA A, RZHETSKY A, HSU LC, CHANG C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 25:549–557.
- ZHANG, WEIWEI; LAN, JIN; CHEN, XIANGDONG. Transcription analysis of *Ganoderma lucidum* reveals candidate genes and pathways in response to excess exogenous indoleacetic acid (AIA). *Mycoscience*, 2020.
- ZIMMER, W., WESCHE, M., & TIMMERMANS, L. (1998). Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Current microbiology*, 36(6), 327-331.
- ZÚÑIGA A, POUPIN MJ, DONOSO R, LEDGER T, GUILIANI N, GUTIERREZ RA, GONZÁLEZ B (2013) Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:546–553

3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DO MUTANTE $\Delta ipdC$ DE *Bacillus sp.* RZ2MS9

RESUMO

O ácido indol acético (AIA) bacteriano exerce um importante papel na promoção do crescimento vegetal, uma vez que é capaz de influenciar inúmeros processos fisiológicos em plantas. Diferentes vias metabólicas podem ser utilizadas para a biossíntese do AIA em bactérias, sendo a via do indol-3-piruvato (IPyA) a mais comumente utilizada por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP's). Esta via conta com a atuação da enzima indol-3-piruvato descarboxilase, que é codificada pelo gene *ipdC*, com vital função na produção de AIA a partir do precursor L-triptofano (L-*trp*). Nesse contexto, estudos com mutantes deletérios para este gene nos permitem o entendimento da importância da via IPyA e do papel do AIA em uma determinada linhagem na interação planta-bactéria. A rizobactéria *Bacillus sp.* (RZ2MS9) vem apresentando satisfatória atividade na promoção de crescimento vegetal. O sequenciamento do seu genoma apontou a presença de uma vasta gama de genes relacionados à promoção do crescimento, com destaque para genes codificadores de auxinas, em especial os genes da via IPyA incluindo o gene chave *ipdC*. Assim, o presente estudo teve por objetivo de avaliar os efeitos fenotípicos de moleculares do nocaute do gene *ipdC* na linhagem *Bacillus sp.* RZ2MS9. O nocaute do gene *ipdC* resultou em uma deleção de 211 pb na linhagem mutante. Observou-se redução no acúmulo de AIA no meio de cultura de 60,98; 65,87; 63,09; 66,72 e 68,26% nos tempos 12, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação (h.a.i.), respectivamente, da linhagem *wt* em relação a linhagem nocaute $\Delta ipdC$. A promoção do crescimento de milho também foi afetada. Dos parâmetros avaliados, o comprimento total das raízes (cm), área projetada das raízes (cm²), raízes laterais (0,5 < c < 1 mm), matéria seca da parte aérea e índice de velocidade de germinação foram estatisticamente superiores na linhagem *wt*. Neste trabalho, o nocaute por deleção do gene *ipdC* na linhagem *Bacillus sp.* RZ2MS9 afetou a produção de AIA e promoção do crescimento de milho, o que indica que esta linhagem utiliza a via IPyA como principal meio de biossíntese de AIA, e que a produção deste fitormônio é um dos principais mecanismos relacionado à promoção do crescimento pela referida linhagem.

Palavras-chave: AIA; *ipdC*; nocaute; RPCP; *Bacillus*

MOLECULAR AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE *ΔipdC* MUTANT OF *Bacillus* sp.

RZ2MS9

ABSTRACT

Bacterial indole acetic acid (IAA) plays an important role in plant growth promoting, since it is capable of influencing numerous physiological processes in plants. Different metabolic pathways can be used for the biosynthesis of IAA in bacteria, with the indole-3-pyruvate (IPyA) pathway being the major used by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR's). This pathway relies on the action of the enzyme indole-3-pyruvate decarboxylase, which is encoded by the *ipdC* gene, with vital function in the production of IAA from the precursor L-tryptophan (L-trp). In this context, studies with mutants for this gene allow us to understand the effects of the IPyA pathway and the role of IAA on the plant-bacterial interaction. The rhizobacterium *Bacillus* sp. RZ2MS9 has been showing satisfactory activity in promoting plant growth. The sequencing of its genome pointed to the presence of a wide range of genes related to the promotion of plant growth, with emphasis on genes encoding auxins, especially the genes of the IPyA pathway including the key gene *ipdC*. Thus, the present study aimed to evaluate the phenotypic molecular effects of the knockout of the *ipdC* gene in the *Bacillus* sp. RZ2MS9. The knockout of the *ipdC* gene resulted in a 211 bp deletion in the mutant strain. A reduction in the accumulation of IAA in the culture medium of 60.98 was observed; 65.87; 63, 09; 66.72 and 68.26% at times 12, 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation (h.a.i.) , respectively, of the wt line compared to the *ΔipdC* knockout strain. The promotion of maize growth was also affected. Of the evaluated parameters, the total length of the roots (cm²), projected root area (cm²), lateral roots (0.5 <c <1 mm), dry matter of the aerial part and germination speed index were statistically higher in the strain wt. In this work, the knockout by deletion of the *ipdC* gene in the *Bacillus* sp. RZ2MS9 affected the production of IAA and the promotion of maize growth, which indicates that this strain uses the IPyA pathway as the main means of biosynthesis of IAA, and that the production of this phytohormone is one of the main effector mechanisms in plant growth promoting by RZ2MS9.

Keywords: IAA; *ipdC*; knockout; PGPR; *Bacillus*

3.1. INTRODUÇÃO

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP's) tem sido amplamente explorado na agricultura moderna sob a forma de produtos como biofertilizantes, bioestimulantes e moderadores de estresses bióticos e abióticos (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009). O principal mecanismo utilizado para explicar os efeitos benéficos observados pelo inoculações de culturas agrícolas com RPCP's, é a produção do ácido indol-3-acético (AIA) (OLANREWAJU et al., 2017). O AIA desempenha papel crítico no crescimento e desenvolvimento vegetal, modulando diversos processos biológicos, como a promoção do alongamento e divisão celular, dominância apical, formação de raízes, diferenciação do tecido vascular, biossíntese de etileno e mediação de respostas trópicas (TSAVKELOVA et al., 2006; SPAEPEN & VANDER-LEYDEN, 2011). O AIA bacteriano interage com os níveis endógenos das plantas, e, portanto, influencia o crescimento e desenvolvimento vegetal de modo benéfico ou maléfico para o hospedeiro (SPAEPEN et al., 2007).

As principais vias de biossíntese de AIA descritas na literatura têm como precursor o aminoácido L-triptofano (L-trp). Além da síntese endógena, que é extremamente custosa, bactérias podem obter L-trp, principalmente, por meio dos exsudatos radiculares (BEAUREGARD, 2016). As vias L-trp-dependentes mais bem caracterizadas em RPCP's são as vias: Indol-3-acetonitrila (IAN), Triptamina (TAM); Indol-3-acetamida (IAM) e Indol-3-piruvato (IPyA) (SPAEPEN et al., 2007)

A via IPyA tem sido associada à micro-organismos benéficos, como as RPCP's. Nesta via, o L-trp é primeiro desaminado a IPyA por uma aminotransferase. Depois, a enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC), codificada pelo gene *ipdC*, catalisa a conversão do IPyA a indol-3-acetaldeído (IAAld). Por fim, o IAAld é oxidado a AIA por enzimas aldeído oxidases/desidrogenases (PATTEN & GLICK, 1996).

Os estudos acerca da regulação genética da biossíntese de AIA em RPCP's Gram-positivas, como *Bacillus* spp., são incipientes. A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, isolada da rizosfera do guaranazeiro (*Paullinia cupana*), demonstrou promover o crescimento de plantas por meio de mecanismo dependente de auxina (BATISTA, 2017). Nesta bactéria, foram anotados genes relacionados a biossíntese de AIA L-trp-dependente, dentre eles o gene-chave *ipdC* (BATISTA, 2017).

Com o advento das técnicas de sequenciamento de nova geração, milhares de sequências genômicas têm sido disponibilizadas em bancos de dados públicos. No entanto, a função da maioria dos genes não pode ser determinada somente com a análise primária da sequência. Neste contexto, abordagens como a “genética reversa” tem ganhado ênfase nas ciências agrárias, por permitir estudos de função gênica em organismos economicamente importantes. Nestas abordagens, perturbações genéticas (mutações) são introduzidas em um gene particular de interesse, e seu impacto é investigado através de análise funcional. Para tal finalidade, técnicas de silenciamento e nocaute gênico tem mostrado eficácia. A técnica de nocaute gênico em RPCP's tem sido utilizada para estudos de funções de genes candidatos a promoção de crescimento. Ao se perturbar um gene importante para uma dada via biossintética é esperado que alterações quantitativas e qualitativas em seu produto ocorram (DUCA et al., 2014).

O gene *ipdC*, um gene chave para a biossíntese de AIA pela via IPyA tem sido clonado e/ou nocauteado para criar mutantes deficientes em AIA em várias bactérias (KOGA et al., 1991; COSTACURTA et al., 1994; ZIMMER et al., 1994; BRANDL & LINDOW, 1997; CARRENO-LOPEZ et al., 2000; YAGI et al., 2001; PATTEN & GLICK, 2002b; MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2008; RYU & PATTEN, 2008; FEDOROV et al., 2010). O nocaute deste gene tem demonstrado afetar diretamente a habilidade de colonização radicular, promoção de crescimento e capacidade e interação bactéria/plantas (PRINSEN et al., 1997; ARORA et al., 2001; CASSÁN et al., 2014, JASIM et al., 2014).

Visando identificar a contribuição do gene *ipdC* e da via IPyA para a síntese de AIA em RZ2MS9, e a importância deste mecanismo para a promoção do crescimento vegetal, Figueiredo (2018) efetuou o nocaute do gene *ipdC* por meio da técnica de CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Esta técnica, baseada na imunidade adaptativa de bactérias, permite realizar alterações precisas e específicas no genoma (DOUDNA & CHARPENTIER, 2015). Este trabalho resultou na geração da linhagem mutante *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$, que demonstrou em uma análise prévia ter sua capacidade de síntese de AIA perturbada. Assim, o presente estudo visou caracterizar a linhagem mutante *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$ a nível molecular e fenotípico, por meio da avaliação da biossíntese de AIA *in vitro* e promoção do crescimento do milho.

3.2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é avaliar a nível molecular e fenotípico a linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Caracterização molecular do mutante $\Delta ipdC$

3.3.1.1. Extração de DNA

A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$, obtida por meio do nocaute do gene *ipdC* via CRISPR-Cas9 (FIGUEIREDO, 2018), foi reativada de coleção criopreservada em freezer -80°C, e repicada em placas contendo meio LB-ágar.

Para extração de DNA, a linhagem foi crescida em frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio Luria-Bertani (LB), overnight, na OD inicial de 0.1 ($\lambda=600$). Após o crescimento, uma alíquota (4 mL da cultura) foi centrifugada a 10.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* utilizado para extração do DNA genômico com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®) seguindo as orientações do fabricante.

O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NuDrop UVS-99 (Avans, Taiwan). A qualidade da extração foi avaliada mediante corrida em gel de agarose 1%.

3.3.1.2. Amplificação do gene $\Delta ipdC$

O DNA genômico extraído foi utilizado como molde para a reação de PCR. As reações de PCR consistiram dos seguintes reagentes: 0,2 μ M de cada primer; 0,2 mM de cada dNTP's; 1x do tampão da enzima Taq Buffer; 3,5 mM de MgCl₂; 0,06 U. μ L⁻¹ da enzima Taq DNA polimerase (Thermo scientific®), 10 ng do DNA molde e H₂O deionizada estéril em um volume final de 25 μ L. Os ciclos de termociclagem corresponderam à 95°C por 5 min; 35

ciclos de 95°C por 30 segundos; 62°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos, e ciclo final de extensão 72°C por 7 min.

Foram desenhados 3 pares de primers (Tabela 3.1) por meio da ferramenta Oligo perfect™ Designer, visando o sequenciamento completo da sequência-alvo obtido por meio da geração de sequência consensus (Figura 3.1).

ATCAACATTGGATTATTTACCAGAGGATGAAGTTCAAGATTACATCGATTCAAATCAAACAATAGAATATGCGCATACTTTAGAAGACCAATC
CAAGGCCAAATTGATGCTGGTTTGTATATAACAGGTTTTATGAGGATGATTTGGTGGAACAAGGATATTAGATAAGCATATTAACATTTA
TTGCGACAAAAGCTATAAAATTAAGATGGATTAAATAAGAATTTTGTCTGACCGAATCTTTTCCCGAGTTTAGCTAACAATTCAGGTTGATCGC
TTTGGCTCATTATAACTTCAATAAGATAAGTTGATTCCTTATTAATAATTATTTGCTAAGGTTTCTGCTAATTCGCTTCATTTTCTACTTT
AAATGTTAGACTTTTTTCTTCTGATCCAAATATCATTGATAGTTTATGTAATCCACATCTGTATGTCATTATAAAGTTGGTTTTGTCCGTGA
ATGGCAGTTCAACAGTGTATCCGTTGTTATTTGATTAAAAATATAATCGGTTTTAAATTTGACGTAGTATAGTTGATAACTCTTGGGCAGTTA
CTTGGAAGAACCATACCAATAATTAATAATGTTGCGCCGTGATAAATGGCGAGCTGTGTACCAAGTAGAGCGGGCAGTGATATCCGATAGA
TCCCATACAGGTTGCTTACATATGCAGTGTATTAGGTAGAGGGATAGCAGCACTACCAAGAAAGGTGTTCTTGTCTCTACAATTAAGACG
TCGTTTTCTGTAAGAAATGGTACATTTGCTGCCAAAAACGTTTTTGTGTGACCATTTGTGCTTTTGGATTGAACCTCTCAGTAAAAGGTGATG
ATTCATAAATAAATGGCTTAACGTCAAGGTATCTTTATTACGATGCTCAATTGAATCACTTAAATGTTGTAACATCCTGCATTACAACCTGG
ACCGTATTTTTTCATCTATAATTTTCAAGTGTAGGGATGGATTTCCTAAGTGTCTTTTTGTAAACCTTGTGTGAAGCCCGCTGTAATAGTA
TCAGTTAACTTCACACCAATACTAATAATACAATCAGATTCATCAATTCCTTTTCGCAAGTACGGAGAAGTTACATCACCAGTATAAACCCTA
TAAATTGAGGGTGTTTTTCTGGGAATATTCCTTTTCCCATACTGAACGTGCGGATGGGAAACCCAGTTTTTCTACGAATTGATGTAATTTTC
TTAGCGTGAAATCGATCTACTTCAAAATCAGCTAAAAATACAGGTTTTTTGGCACTATTTATTTTGAATGGCATGTAGAAGCATTTTATTT
AATGCTTCTTTATTACTTAAATAAGTTTATTTATAATAGGTTCTGTGCGGTTTATTAATTTGTTTATATATACATCAATCGGCAAAATTAATAT
GAACAGGGCGTTTTTCATTCCAACATGCACGTAAAAACGGTCAATTTCTCAGCAGCATGCTCAGGTGTTACATTTGTTTGTCTATAGTGAT
TTCTCGATACATATTGGAAGAGTGATCGAATTTCCATCTCCTAACGTATGATGGACGATTGCTCCATTTTCCATTATTTTGTGGTGGCGTA
CCTGTAATTTTATACTGGCAGGTGTTCCGCATATGAGCCAGCAATACCGTTAATAGCGCTTAATTTCTCAACACCGAAAGTAGTAATAAGAG
CGGCGATTCCTTTTATGCGAGCGTACCCATCTGCTGCATATGCAGCATTTAATTCATTACAATTGCCAATCCACTTTAAATTTTATGTGCTAC
CACATCATCTAAAAAGGCAAGATTAATAATCACCAGGAACCCCAAATATATGTTCAATTCCTAATTCGTGTAGTCTATCCAATAAATATGTACTT
ACAGTATATTGTTTTTCAAATGAATCATATGACACAACATAAAGAAGAAGATGAATGAGGCATTAGCATTATTTTATTTTGCATATAAAAC
ATTTACTGAAAGCCAGATGAAATTTATAAAGAATATGGCATTCAACGAGTACATCATCGAATTTTATTTTATCGCACGTTTTCCAGGGATA
AGTGTAATGAGTTATTACTATTAGAAATAAGTAAGCAAGCGCTCCACGAGCCGCTACGTCAACTTGTGGAAGGGCTTAATTGAGAGTA
ATGAAGCTATSCATGATCGACGTGTGAAAGAGTTGTCTTTAACAGAAAAAGGTACAGATTTAGAGAAAAAAGTGAAGTATGTACAAAGACAACA
AATGGGTGCTATTTTTTCAAATTTGGTGAATCATGTGAGGACAATTGGCACCAGTTATGAATGAAATGGCA

Figura 3.1. Esquema ilustrando a sequência do gene *ipdC* (cinza); as sequências adjacentes (sem realce); e as regiões de anelamento dos *primers* (vermelho).

Os amplicons foram quantificados no espectrofotômetro NuDrop UVS-99 (Avans, Taiwan), e tiveram sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados por meio do kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela 3.1. Lista de primers utilizados neste estudo.

Primer	Sequência 5'-3'	Referência
<i>ipdC 1</i>	GCCAAATTGATGCTGGTTTT	Presente estudo
	GTTTCACACGTCGATCATGC	
<i>ipdC 2</i>	ACCGAATCTTTTCCCGAGTT	Presente estudo
	TTTGGGGTTCCTGGTGATTA	
<i>ipdC 3</i>	TGACCATTTGTGCTTTTGGAA-	Presente estudo
	TGGAAATCCATCCCTACACTG	

3.3.1.3. Sequenciamento dos amplicons

Cada reação de sequenciamento foi composta por alíquotas de 40 ng dos amplicons purificados foram misturadas com 5 μ M dos primers separadamente, totalizando 6 reações. As amostras foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL/USP).

3.3.1.4. Montagem e alinhamento do gene *$\Delta ipdC$*

A montagem da sequência do gene *$\Delta ipdC$* foi realizada por meio da ferramenta DNA baser (<https://www.dnabaser.com/>), utilizando a sequência original do gene *ipdC* de *Bacillus* sp. RZ2MS9 (ID: QIZ42416.1) depositada no NCBI (National Center for Biotechnology Information) sob número GenBank CP049978.1.

As sequências dos genes *ipdC* e *$\Delta ipdC$* foram alinhados pelo método Pairwise Sequence Alignment (PSA), utilizando a ferramenta Matcher do CustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

3.3.2. Avaliação da produção de ácido indol-3-acético

As linhagens de *Bacillus* sp. RZ2MS9 *wt* e *$\Delta ipdC$* foram crescidas em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio LB 10% + 40 % de exsudato de milho estéril suplementado com 5 mM de L-trp, em triplicata, na OD inicial = 0.1 ($\lambda=600$). Alíquotas foram coletadas nos tempos: 12, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação (h.a.i.) para avaliar a produção de AIA.

Para estimar a produção de AIA em cada amostra, 500 μ L de cultura foram centrifugados a 10.000 xg por 10 min, com duplicatas técnicas. O sobrenadante foi transferido para cubetas, nas quais foi adicionado o reativo de Salkowski (BRIC et al., 1991 adaptado para o método quantitativo de HUSEN, 2003), na proporção 2:1. Após a reação por 30 min, 25°C, no escuro, as amostras foram lidas em espectrofotômetro, $\lambda=520$ nm (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech). A reação do sobrenadante da cultura com o reagente de Salkowski, detecta tanto AIA quanto alguns de seus intermediários, como IPyA e IAM (GLICKMANN & 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 absorbância em espectrofotômetro (BRIC et al., 1991). A estimativa da produção de AIA em cada amostra foi obtida a partir de uma regressão linear de uma curva de calibração previamente construída utilizando-se AIA comercial.

3.3.3. Ensaio de promoção de crescimento em plântulas de milho

3.3.3.1. Preparo e inoculação

Para a bacterização das sementes, as linhagens de *Bacillus* sp. RZ2MS9 *wt* e *$\Delta ipdC$* foram inoculadas em frascos do tipo erlenmeyer contendo 30 mL de meio Luria-Betani na OD inicial 0.1 ($\lambda=600$). Os frascos foram

mantidos sob agitação constante em 180 rpm por 6 h, a 28°C, até atingir a fase log que corresponde a 1×10^8 UFC.mL⁻¹.

Foram utilizadas sementes de híbridos de milho 30A37PW® (Morgan Sementes e Biotecnologia), umedecidas com água destilada. A bacterização foi realizada em sacos plásticos utilizando-se 1 mL da suspensão celular bacteriana para cada 100 sementes de milho, sendo as sementes agitadas por movimentos circulares até que se obtivesse uma cobertura homogênea, simulando o que ocorre em betoneiras em práticas de campo.

3.3.3.2. Ensaio de germinação e promoção de crescimento em plântulas de milho

Os tratamentos foram compostos de sementes inoculadas com as linhagens de *Bacillus* sp. RZ2MS9 *wt*, Δ *lipdC* e um controle composto por meio de cultura. Para cada tratamento, a unidade experimental foi composta de 25 sementes dispostas em papel Germitest® no esquema 5 x 5, com 8 repetições. As sementes foram acondicionadas em câmara de germinação sob temperatura (28°C) e umidade relativa (90%) constantes.

A germinação foi avaliada a cada 6 h durante 4 dias para cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), sendo este calculado pela fórmula $IVG = \sum (n_i/t_i)$, em que: n_i = número de sementes que germinaram no tempo 'i'; t_i = tempo após instalação do experimento, seguindo a escala temporal de 6 h. No sétimo dia foi verificada a germinação das sementes (G), contabilizando o número de plantas normais, as quais apresentavam as estruturas essenciais de como: sistema radicular (raiz primária e raízes seminais), parte aérea (epicótilo completo e desenvolvido). As sementes que não apresentavam tais estruturas ou mesmas disformes, eram consideradas como plantas anormais ou sementes inviáveis.

Foram amostradas 16 plântulas de cada tratamento 7 dias pós inoculação (d.p.i), e as raízes foram submetidas a análises no scanner Epson® Expression 11000XL. As imagens foram analisadas para os parâmetros: comprimento total (cm); área projetada (cm²); área superficial (cm²); diâmetro médio (mm); comprimento/volume (cm/mm³); volume (cm³); raízes laterais $0 < c < 0,5$ (mm); comprimento total (cm); raízes laterais $0,5 < c < 1$ (mm); raízes laterais $1 < c < 1,5$ (mm) e raízes laterais $1,5 < c < 2$ (mm) utilizando o software WinRIZHO™ *Arabidopsis* (Regent Instruments Inc., Quebec, Canadá). Também foi aferido o peso seco de raízes e parte aérea de 8 plântulas amostradas de cada tratamento. As amostras foram secas em estufa com temperatura (70°C) e ventilação constantes durante 3 dias, e o peso foi aferido em balança analítica.

3.3.3.3. Análise estatística

Todos os dados obtidos foram tratados para outliers e submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorv-Smirnov, para a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Posteriormente foram submetidos à análise de variância (ANOVA), identificando diferenças significativas ao nível de 95% de probabilidade. Assim, foram aplicados os testes de comparação de médias de Tukey e Skott-Knott ao nível de erro de 5%. As análises foram realizadas utilizando o software R (R CORE TEAM, 2014).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Caracterização molecular do mutante RZ2MS9 $\Delta ipdC$

A aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 foi eficiente para a geração da linhagem mutante *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$ (FIGUEIREDO, 2018). O gene nocaute do gene *ipdC* resultou em uma deleção de 211 pb nesta linhagem, situado na região entre 581 e 792 pb (Figura 3.2).

RZ2MS9 $\Delta ipdC$	TAAGAAATGGTACATTTGCTGCCAAAAACGTTTTTGTGTGACCATTGTGCTTTTGGATT	541
RZ2MS9 WT	TAAGAAATGGTACATTTGCTGCCAAAAACGTTTTTGTGTGACCATTGTGCTTTTGGATT	541

RZ2MS9 $\Delta ipdC$	GAACCTCTTCAGTAAAAGGTGATGATTCTAAAATAAATGGC-----	601
RZ2MS9 WT	GAACCTCTTCAGTAAAAGGTGATGATTCTAAAATAAATGGCTTAACGTCAAGGGTATCTTT	601

RZ2MS9 $\Delta ipdC$	-----	641
RZ2MS9 WT	ATTACGATGCTCAATTGAATCACTTAAATGTTGTAAAACATCCTGCATTACAACCTGGACC	661
RZ2MS9 $\Delta ipdC$	-----	640
RZ2MS9 WT	GTATTTTTCATCTATAATTTTCACAGTGTAGGGATGGATTTCATAACTTGTTCCTTTTGT	721
RZ2MS9 $\Delta ipdC$	-----	639
RZ2MS9 WT	AAAACCTTGTGTGAAGCCGCTGTAATAGTATCAGTTAACTTCACACCAATACTAATAAT	781
RZ2MS9 $\Delta ipdC$	-----CATCAATTCTTTTTCGCAAGTACGGAGAACTTACATCACCAGTATAAAC	638
RZ2MS9 WT	ACAATCAGATTTCATCAATTCTTTTTCGCAAGTACGGAGAACTTACATCACCAGTATAAAC	841

RZ2MS9 $\Delta ipdC$	CCCTATAAAATTGAGGGTGTTTTCTGGGAATATTCCTTTTCCCATACTGAACGTCGCGAT	687
RZ2MS9 WT	CCCTATAAAATTGAGGGTGTTTTCTGGGAATATTCCTTTTCCCATACTGAACGTCGCGAT	901

Figura 3.2. Alinhamento entre o gene *ipdC* *wt* e $\Delta ipdC$ de RZ2MS9. O $\Delta ipdC$ tem 211 pb a menos em sua região central em relação ao gene *wt*. Asteriscos indicam os nucleotídeos idênticos em ambas as sequências.

3.4.2. Produção de ácido indol-3-acético

Na biossíntese de AIA foi observado um padrão de acúmulo gradual na quantidade de compostos indólicos no meio de cultura em ambas as linhagens, com níveis estatisticamente superiores na linhagem *wt*. Observa-se redução no acúmulo de compostos indólicos no meio de cultura de 60,98; 65,87; 63,09; 66,72 e 68,26% nos tempos 12, 24, 48, 72 e 96 h.a.i., respectivamente, da linhagem RZ2MS9 *wt* em relação a linhagem RZ2MS9 $\Delta ipdC$ (Figura 3.3).

Também foi observado que em todos os tempos avaliados a produção da linhagem selvagem é estatisticamente superior à da linhagem mutante.

Interessantemente, o acúmulo de indólicos no meio cultivado com a linhagem $\Delta ipdC$ aumenta ao longo do tempo de crescimento, o que pode ser explicado pela provável ativação de outras vias biossintéticas pela bactéria, o que precisa ser avaliado por meio de outros experimentos.

Figura 3.3. Produção de ácido indol-3-acético pelas linhagens *Bacillus* sp. RZ2MS9 *wt* e $\Delta ipdC$, avaliada nos tempos 12, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação (h.a.i.). Barras contendo letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados são representativos de triplicatas.

3.4.3. Ensaio de germinação de promoção de crescimento em plântulas de milho

O nocaute do gene *ipdC* na linhagem RZ2MS9 mostrou afetar sua habilidade de promoção de crescimento em plântulas de milho. Dos parâmetros radiculares avaliados, o comprimento total das raízes (cm), área projetada das raízes (cm²), raízes laterais (0,5 < c < 1 mm) e matéria seca da parte aérea das plantas foram estatisticamente superiores na linhagem *wt*. Para estes parâmetros, os tratamentos controle e $\Delta ipdC$ mostraram médias estatisticamente iguais e inferiores às médias do tratamento com *wt* (Figura 3.4).

Para os parâmetros área superficial (cm²); diâmetro médio (mm); razão comprimento/volume (cm/mm³); volume radicular (cm³); raízes laterais (0 < c < 0,5 mm); raízes laterais (1 < c < 1,5 mm); raízes laterais (1,5 < c < 2 mm) e matéria seca das raízes não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ao nível de significância 5%.

Figura 3.4. Promoção do crescimento de plântulas de milho inoculado com as linhagens de *Bacillus* sp. RZ2MS9 *wt* e $\Delta ipdC$. Comprimento total das raízes (A); Área projetada das raízes (B); Raízes laterais – comprimento = C ($0,5 < C < 1$ mm) (C) e Matéria seca da parte aérea das plantas (D). Caixas acompanhadas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Foi calculado o índice de velocidade de germinação das sementes de milho tratadas inoculadas com as linhagens *wt*, $\Delta ipdC$ e controle (meio LB). O tratamento com a linhagem *wt* foi o que apresentou maior velocidade de germinação (Figura 3.5).

Figura 3.5. Índice de velocidade de germinação (IVG), avaliado em sementes de milho inoculadas com as linhagens de *Bacillus* sp. RZ2MS9 *wt* e $\Delta ipdC$, e controle com meio de cultivo LB. Caixas acompanhadas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O nocaute do gene *ipdC*, demonstrou afetar a produção de auxinas pela linhagem RZ2MS9, e, consequentemente, sua capacidade de modificar a arquitetura do sistema radicular de plântulas de milho (Figura 3.6). Pelas imagens, observa-se que o tratamento com a linhagem *wt* apresenta raízes de comprimento, área projetada e número de raízes laterais superiores aos do tratamento com $\Delta ipdC$ e controle. Este tipo de arquitetura favorece uma maior exploração de água e nutrientes presentes no solo, que se traduzem em maior vigor e produtividade.

Figura 3.6. Efeito da inoculação de *Bacillus* sp. RZ2MS9 wt (A), *Bacillus* sp. RZ2MS9 $\Delta ipdC$ (B) e controle (C) na arquitetura radicular de plântulas de milho.

3.5. DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos observados em inoculações de culturas agrícolas com RPCP's tem sido atribuídos principalmente ao AIA bacteriano. Portanto, existe um grande interesse no entendimento e manipulação deste mecanismo em RPCP's, de modo a se maximizar seus efeitos (BAUDOIN et al., 2010).

A maior parte dos trabalhos relacionados a biossíntese e regulação do AIA provém de bactérias Gram-negativas, principalmente de linhagens de *Azospirillum* spp., que são amplamente utilizadas como biofertilizantes. Linhagens Gram-positivas, como as de *Bacillus* spp., apresentam amplo potencial de uso agrícola, sendo reportadas promovendo o crescimento de culturas expressivas como milho (BATISTA et al., 2018; EGAMBERDIYEVA, 2007; GOND et al., 2015), arroz (ASHRAFUZZAMAN et al., 2009), soja (RAMESH et al., 2014; SHARMA et al., 2013), tomate (MENA-VIOLANTE et al., 2007; VALENZUELA-SOTO et al., 2010), trigo (BAIG et al., 2012; UPADHYAY et al., 2012) e canola (ZAID et al., 2006). Linhagens de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. firmus* e *B. thuringiensis* têm sido utilizadas na formulação de biofertilizantes, biopesticidas e biofungicidas com significativo efeito na promoção do crescimento vegetal e controle de pragas e doenças de plantas (PÉREZ-GARCIA et al., 2011; BORRIS et al., 2016).

O bioma amazônico apresenta uma ampla diversidade de RPCP's ainda pouco conhecida e explorada. A linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9, isolada em solo amazônico na rizosfera do guaranazeiro possui potencial promotor de crescimento comprovado em importantes culturas como milho e soja. O efeito fitoestimulatório desta linhagem está atrelado principalmente à biossíntese de AIA L-trp-dependente, contando com a presença do gene-chave *ipdC* (BATISTA et al., 2018).

Figueiredo (2018), utilizando a técnica de CRISPR-Cas9 conseguiu obter de modo eficiente a linhagem $\Delta ipdC$ de *Bacillus* sp. RZ2MS9. No presente estudo, observou-se que a linhagem $\Delta ipdC$ apresenta uma deleção de 211 pb na região codante do gene *ipdC*, acarretando em uma proteína defectiva, com menos aminoácidos, e que teve sua função biológica alterada. O mutante apresentou acúmulo estatisticamente inferior de compostos indólicos em relação à linhagem selvagem, comparativamente, em todos os tempos avaliados. Foram observadas quantidades 156%; 193%; 170%; 200% e 215% superiores de compostos indólicos da linhagem wt em relação a $\Delta ipdC$, nos tempos 12; 24; 48; 72 e 96 h.a.i., respectivamente. Apesar da produção estatisticamente inferior do mutante, observou-se um crescente acúmulo de AIA ao longo do tempo, o que pode ser explicado pela provável ativação tardia de vias alternativas no mutante.

A capacidade de promoção do crescimento também foi afetada em RZ2MS9 $\Delta ipdC$. O comprimento total das raízes de milho, área projetada das raízes, raízes laterais ($0,5 < c < 1$ mm) e matéria seca da parte aérea foram significativamente superiores no tratamento com a linhagem *wt*. Outros autores também observaram efeitos semelhantes na arquitetura radicular inoculando outras RPCP's como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus spp.* em *A. thaliana* (ZHANG et al., 2007; ORTIZ-CASTRO et al., 2014; LOPEZ-BUCIO et al., 2007; SHI et al., 2010); *Azospirillum brasilense* em *Triticum aestivum* (DOBBELAERE et al., 1999) e *Azospirillum irakense* e *Herbaspirillum seropedicae* em *Oryza sativa* (SEKAR et al., 2000, BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012). A arquitetura do sistema radicular que integra a topologia da raiz, distribuição espacial das raízes primárias e laterais e número e comprimento de vários tipos de raízes, é crucial para a ancoragem da cultura, absorção proficiente de água e minerais e interações microbióticas eficientes. Plantas com uma arquitetura radicular eficiente podem explorar melhor a água e nutrientes disponíveis no solo, e, desta forma, tolerar estresses bióticos e abióticos e atingir maiores produtividades (JUNG & MCCOUCH, 2013).

Também foi verificado que a velocidade de germinação de sementes de milho é significativamente inferior na linhagem $\Delta ipdC$. O AIA bacteriano neste caso, pode exercer um efeito modulador das giberelinas, principais fitormônios envolvidos na germinação, o que necessita de maiores estudos.

A via IPyA, que conta com a atuação do gene-chave *ipdC*, é bem documentada e prevalente em RPCP's. Em vista de sua importância, este gene tem sido alvo de modificações genéticas em diversas linhagens de RPCP's. Estas alterações, assim como o observado em *Bacillus sp.* RZ2MS9, tem demonstrado influenciar diretamente a produção de AIA e capacidade de promoção de crescimento pelas linhagens. Baudoin et al. (2010), por meio da introdução de cópias plasmidiais do gene *ipdC* sob o controle do promotor constitutivo PnptII e do promotor de resposta ao exsudato radicular PsbpA aumentaram a produção de AIA em *A. brasilense* Sp245. As linhagens modificadas mantiveram alta densidade celular 1 mês após a semeadura. Também se observou que os plasmídeos recombinantes se mantiveram em todas as células, e que não houve efeito negativo sobre a aptidão rizosférica das bactérias. Plantas de trigo inoculadas com as linhagens superprodutoras de AIA apresentaram incremento significativo de biomassa. Este trabalho demonstra que linhagens modificadas para produzir maiores quantidades de auxinas são ecologicamente funcionais como fitoestimulantes, e que o gene *ipdC* é um ponto-chave de modificações genéticas, como também observado em RZ2MS9.

Resultados similares aos nossos também foram obtidos por Malhotra & Srivastava (2008), que realizaram o nocaute do gene *ipdC* na linhagem *A. brasilense* SM utilizando o sistema TargeTron™ (Sigma-Aldrich, St. Louis - Missouri). O mutante apresentou uma redução de 43% e 54% no acúmulo dos intermediários IAAlD e indol-3-etanol (TOL), respectivamente. A produção de AIA foi 51% menor no mutante e a capacidade de promoção de crescimento avaliada em sorgo foi significativamente afetada. De modo semelhante, foi demonstrado que o AIA bacteriano desempenha um papel importante na promoção de crescimento radicular em canola. A inativação do gene *ipdC* por meio de inserção aleatória em *Pseudomonas putida* GR12-2 levou a uma drástica redução na produção de AIA e capacidade promotora de crescimento desta linhagem, corroborando com nossos resultados (PATTEEN & GLICK, 2002). Em contraste, Dobbelaere et al. (1999) observaram que a inoculação da linhagem *A. brasilense* Sp245, produtora de AIA, inibia o crescimento de raízes de trigo. Esta inibição foi revertida quando os autores inocularam linhagens nocaute para o gene *ipdC*.

Ouyang et al. (2017) observaram que em *Serratia sp.* ZM o nocaute do gene *ipdC* causou uma redução de 70% na biossíntese de AIA na linhagem mutante, corroborando com nossos achados. Neste estudo foi evidenciado que sob condições de estresse e baixos teores de nitrogênio, a capacidade de sobrevivência dessa linhagem diminui

significativamente, evidenciando que o gene *ipdC*, em função da biossíntese do AIA, exerce um papel vital na resistência ao estresse nessa linhagem. Van Puyvelde et al. (2011) realizaram uma análise transcriptômica de linhagens selvagens e mutantes para o gene *ipdC* em *A. brasilense*, com e sem adição de AIA exógeno. Neste trabalho foi observada expressão diferencial de 16 genes estritamente relacionada ao nocaute do gene *ipdC*. Estas alterações provavelmente se devem a alterações no metabolismo bacteriano e aos efeitos a jusante causados pela perturbação da via IPyA de biossíntese de AIA (DOSSELAERE & VANDERLEYDEN, 2001). Este trabalho mostra que interferir na biossíntese/homeostase do AIA em RPCP's por meio da inativação do gene *ipdC* resulta em alterações transcricionais muito mais amplas, o que também pode ocorrer em RZM29, necessitando de mais estudos nesse sentido para fins de comprovação.

Similarmente, Puente et al. (2018) realizaram experimentos de inoculação foliar de linhagens selvagens e mutantes *ipdC* de *A. brasilense* Az39 em soja. Neste estudo a inoculação com a linhagem selvagem resultou em um aumento no crescimento radicular, enquanto o tratamento com o mutante *ipdC* não causou esse efeito. Remans et al. (2008) também avaliaram os efeitos de linhagens selvagens e mutantes para o gene *ipdC* em *A. brasilense* Sp245, utilizando duas cultivares de feijão. O mutante *ipdC* mostrou redução de 90% na produção de auxinas em relação a linhagem selvagem. Também foi observado que esta perturbação genética extinguiu o efeito fitoestimulatório de *A. brasilense* Sp245 no aumento do peso seco e número de nódulos radiculares para as duas cultivares de feijão.

De acordo com nosso conhecimento, o presente estudo é pioneiro em documentar os efeitos do nocaute do gene *ipdC* em uma linhagem de *Bacillus*, e um dos poucos ao documentar este mesmo feito em RPCP's Gram-positivas. Portanto, os resultados aqui obtidos contribuem para um melhor entendimento do papel do gene *ipdC*, da via IPyA e da importância do AIA na *Bacillus* sp. RZ2MS9 para a promoção do crescimento vegetal, propiciando maior base teórico/prática para a aplicação desta linhagem em práticas agrícolas.

3.6. CONCLUSÃO

O nocaute do gene *ipdC* em *Bacillus* sp. RZ2MS9 acarretou uma deleção de 211 pb, que afetou significativamente a produção de auxina pela linhagem. Também foi afetada a habilidade de promoção do crescimento em plântulas de milho.

REFERÊNCIAS

- ARORA, N. K.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. (2001). Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Scientific*, v.81, n.6, p.673-677.
- ASHRAFUZZAMAN M, HOSSEN FA, ISMAIL MR, HOQUE MA, ISLAM MZ, SHAHIDULLAH SM, MEON, S. (2009). Efficiency of plant growthpromoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8 (Supl 7): 1247- 1252.
- BAIG, K. S., ARSHAD, M., SHAHAROONA, B., KHALID, A., AHMED, I. (2012). Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of microbiology*, 62(3), 1109-1119.

- BATISTA, B. D. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). (2013). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BATISTA, B. D. (2017). Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- BATISTA, B. D. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological research*, v. 206, p. 33-42, 2018.
- BAUDOIN, E., LERNER, A., MIRZA, M. S., EL ZEMRANY, H., PRIGENT-COMBARET, C., JURKEVICH, E., ... & MOËNNE-LOCCOZ, Y. (2010). Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Research in Microbiology*, 161(3), 219-226.
- BEAUREGARD, P. B. (2015). Not just sweet talkers: How roots stimulate their colonization by beneficial bacteria. In *Advances in Botanical Research* (Vol.75, pp. Patten CL & Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42: 207–220. 1-20). Academic Press.
- BORRIS, R. (2016). Phytostimulation and Biocontrol by the Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: An Update. In: *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer International Publishing, 2016. p.163-184.
- BRANDL MT & LINDOW SE. (1997). Environmental signals modulate the expression of an indole- 3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol Plant–Microbe Interact* 10: 499–505.
- 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.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L; PACHECO, F; ALJANABI, S; et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil*, 356 (2012), pp. 113-125.
- CARRENO-LOPEZ, R.; CAMPOS-REALES, N.; ELMERICH, C.; BACA, B. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular and General Genetics*, v.264, n.4, p.521-530.
- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.33, n.2, p.440-459.
- COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet* 243:463.
- DOBBELAERE S, CROONENBORGH A, THYS A, VANDE BROEK A & VANDERLEYDEN J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155–164.
- DOSSELAERE F, VANDERLEYDEN J (2001). Um nó metabólico em ação: enzimas que utilizam o corismato em microorganismos. *Crit Rev Microbiol* 27: 75–131
- DOUDNA, J. A., CHARPENTIER, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.106, n.1, p.85-125.
- EGAMBERDIYEVA, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), 184-189.

- FEDOROV, D. N.; DORONINA, N. V.; TROTSSENKO, Y. A. (2010). Cloning and characterization of indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochemistry (Moscow)* 75:1435–1443.
- FIGUEREDO, EVERTHON FERNANDES. Nocaute do gene *ipdC* no *Bacillus* sp. (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9 e influência na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano. Dissertação de mestrado. Piracicaba, 2018. 73 p.
- 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.
- GOND, S. K., BERGEN, M. S., TORRES, M. S., WHITE JR, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological research*, 172, 79-87.
- Husen E (2013). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 4.
- JASIM, B., JIMTHA JOHN, C., SHIMIL, V., JYOTHIS, M., RADHAKRISHNAN, E. K. (2014). Studies on the factors modulating indole-3-acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum* and molecular analysis of *ipdC* gene. *Journal of applied microbiology*, 117(3), 786-799.
- JUNG, JKH; MCCOUCH, S. Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Front. Plant Sci.*, 4 (2013), p. 186.
- KOGA J, SYOONO K, ICHIKAWA T, ADACHI T. (1994). Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Biochim Biophys acta Protein Struct Mol Enzymol* 1209:241–247.
- LOPEZ-BUCIO, J; CAMPOS-CUEVAS, JC; HERNÁNDEZ-CALDERÓN, E; et al. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI*, 20 (2007), pp. 207-217.
- LUGTENBERG, B., KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria *Annu. Rev. Microbiol.*, 63 (2009), pp. 541-556.
- MALHOTRA, M., & SRIVASTAVA, S. (2008). An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93 (4), 425-433
- MENA-VIOLANTE, H. G., OLALDE-PORTUGAL, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 103-106.
- OLANREWaju, O. S., GLICK, B. R., & BABALOLA, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197.
- ORTIZ-CASTRO, R; PELAGIO-FLORES, R; MÉNDEZ-BRAVO, A; et al. Pyocyanin, a virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *MPMI*, 27 (2014), pp. 364-378.
- OUYANG, L., PEI, H., & XU, Z. (2017). Low nitrogen stress stimulating the indole-3-acetic acid biosynthesis of *Serratia* sp. ZM is vital for the survival of the bacterium and its plant growth-promoting characteristic. *Archives of microbiology*, 199(3), 425-432.
- PATTEN CL & GLICK BR (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68: 3795–3801.

- PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D., DE VICENTE, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193.
- PRINSEN E, VAN DONGEN W, ESMANS EL, VAN ONCKELEN HÁ. (1997). HPLC linked electrospray tandem mass spectrometry: a rapid and reliable method to analyse indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *J Mass Spectrom* 32:12–22.
- PUENTE, ML, GUALPA, JL, LOPEZ, GA *ET AL*. Os benefícios da inoculação foliar com *Azospirillum brasilense* na soja são explicados por um modelo de sinalização de auxina. *Simbiose* 76, 41-49 (2018).
- RAMESH, A., SHARMA, S. K., SHARMA, M. P., YADAV, N., JOSHI, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhattai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, 73, 87-96.
- R CORE TEAM R. A language and environment for statistical computing. (2014). (Version 3.0. 2). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- REMANS S, BLAIR MW, MANRIQUE G.; et al. (2008). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 302:149–161.
- RYU, R. J., PATTEN, C. L. (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7200-7208.
- SEKAR, C; PRASAD, N; SUNDARAM, M. Enhancement of polygalacturonase activity during auxin induced para nodulation and endorhizosphere colonization of *Azospirillum* in rice roots. *Indian J. Exp. Biol.*, 38 (2000), pp. 80-83.
- SHARMA, S. K., RAMESH, A., JOHRI, B. N. (2013). Isolation and characterization of plant growth- promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *J Virol Microbiol*, 2013, 1-19.
- SHI, CL; PARK, HB; LEE, JS; et al. Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90–166 is through both auxin-dependent and-independent signaling pathways. *Mol. Cells*, 29 (2010), pp. 251-258.
- SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;3:a001438.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, v.31, n.4, p.425-448.
- TSAVKELOVA, E. A; S. Y. KLIMOVA, T. A. CHERDYNTSEVA, AND A. NETRUSOV, “Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review,” *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 42, no. 2, pp. 117–126, 2006.
- UPADHYAY, S. K., SINGH, J. S., SAXENA, A. K., SINGH, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- VALENZUELA-SOTO, J. H., ESTRADA-HERNÁNDEZ, M. G., IBARRA-LACLETTE, E., DÉLANO- FRIER, J. P. (2010). Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. *Planta*, 231(2), 397.
- VAN PUYVELDE S, CLOOTS I, ENGELLEN K, DAS F, MARCHAL K, VANDERLEYDEN, J; et al. (2011). Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals na extensive auxin response. *Microb Ecol* 61:723–728.

- YAGI K, CHUJO T, NOJIRI H, OMORI T, NISHIYAMA M, YAMANE H. (2001). Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the gene expression of indole-3-pyruvic acid decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* FS. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:1265–1269.
- ZAIDI, S., USMANI, S., SINGH, B. R., MUSARRAT, J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.
- ZHANG, H; KIM, MS; KRISHNAMACHARI, V; et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226 (2007), pp. 839-851.
- ZIMMER, W., WESCHE, M., & TIMMERMANS, L. (1998). Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Current microbiology*, 36(6), 327-331.