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

Nocaute do gene *ipdC* no *Bacillus sp.* (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9 e influência sobre a biossíntese do AIA dependente do L-triptofano

Everthon Fernandes Figueredo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Everthon Fernandes Figueredo
Bacharel em Zootecnia

**Nocaute do gene *ipdC* no *Bacillus sp.* (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9 e
influência sobre a biossíntese do AIA dependente do L-triptofano**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

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

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 / Everthon Fernandes Figueredo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPG 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

74 p.

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

1. Auxinas 2. IPyA. 3. RPCP 4. Nocaute gênico. I. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por todo amor, apoio e incentivo na minha formação.

A Patrício Soares, por todo amor, paciência e auxílio no design gráfico e tratamento das imagens.

À Profa. Maria Carolina Quecine Verdi, por todo incentivo, exemplo, amizade e profissionalismo na orientação deste trabalho.

Ao Prof. João Lúcio Azevedo, pela inspiração e pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Fernando Piotto, pelo apoio e disponibilidade sempre que solicitado.

A todos que fazem parte ou que já passaram pelo Laboratório de Genética de Micro-organismos: Isa, Carolzinha, Bruno, Mari, Jack, Bruna, Daniel, Inês, Jéssica, Renatinha, Helena, Tiago, Renata e Gustavo, pela companhia agradável, conselhos e momentos divertidos.

Ao Técnico José Antônio, pela prontidão em sempre ajudar.

A Pedro Andrade, pelo auxílio com as análises estatísticas e conselhos científicos.

À Joelma Marcon, pela companhia, amizade e apoio na realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Esalq/USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas concedidas.

Aos funcionários e colaboradores do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, pelo suporte na realização deste trabalho.

A todos que, de maneira indireta, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 2017/11026-1).

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. RPCPs E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	13
2.2. GÊNERO <i>Bacillus spp.</i>	15
2.3. BIOSÍNTESE BACTERIANA DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA).....	16
2.3.1. <i>Influência na modulação do crescimento e desenvolvimento das plantas</i>	18
2.4. FERRAMENTAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA FUNÇÃO DE GENES EM BACTÉRIAS.....	19
2.4.1. <i>Técnica de CRISPR-Cas9</i>	21
2.4.1.1. Recombinação e reparo de quebras na dupla fita do DNA.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. LINHAGENS BACTERIANAS, PLASMÍDEOS, DNA GENÔMICO E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	27
3.2. TRANSFORMAÇÃO DO <i>Bacillus sp.</i> COM O PLASMÍDEO pCas.....	29
3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSFORMANTES COM O pCas E CURVA DE CRESCIMENTO.....	29
3.4. OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS N ₂₀ PARA O sgRNA.....	30
3.5. CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pTARGET _{ipdC}	31
3.6. CONSTRUÇÃO E MONTAGEM DO CASSETE DE DNA DOADOR.....	34
3.7. NOCAUTE DO GENE <i>ipdC</i> COM A TÉCNICA DE CRISPR-Cas9.....	35
3.8. AVALIAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO AIA DEPENDENTE DO L-TRIPTOFANO.....	36
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1. EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO DO <i>Bacillus sp.</i> COM O PLASMÍDEO pCas.....	39
4.2. DETECÇÃO DOS TRANSFORMANTES COM O pCas E CURVA DE CRESCIMENTO.....	39
4.3. SEQUÊNCIAS N ₂₀ PARA O sgRNA DOS PLASMÍDEOS pTARGET _{ipdC}	42
4.4. CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pTARGET _{ipdC} E DO CASSETE DOADOR.....	44
4.5. NOCAUTE DO GENE <i>ipdC</i> COM A TÉCNICA DE CRISPR-Cas9 E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTES.....	45
4.6. AVALIAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO AIA NAS LINHAGENS RZ2MS9-WT e $\Delta ipdC$	49
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Nocaute do gene *ipdC* no *Bacillus sp.* (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9 e influência sobre a biossíntese do AIA dependente do L-triptofano

Dentre os mecanismos relacionados à interação bactéria-planta, a biossíntese bacteriana de ácido indol acético (AIA) exerce um papel fundamental na promoção do crescimento vegetal, uma vez que é capaz de influenciar inúmeros processos fisiológicos nas plantas. Diferentes vias metabólicas são utilizadas pelas bactérias para a biossíntese do AIA, sendo a via do ácido indol-3-pirúvico (IPyA) a mais comumente descrita. Nesta via encontra-se o gene indol-3-piruvato descarboxilase (*ipdC*) com vital função na produção de AIA utilizando como precursor o aminoácido L-triptofano. Nesse contexto, estudos moleculares acerca das vias metabólicas e dos genes envolvidos nesse processo são preponderantes para o entendimento da inter-relação das vias regulatórias com a síntese do fitormônio. 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. Assim, o estudo teve por objetivo comprovar a função do gene *ipdC* na biossíntese do AIA pela via dependente do L-triptofano através do nocaute sítio dirigido do gene *ipdC* na Rizobactéria Promotora do Crescimento em Plantas (RPCP) *Bacillus sp.* (RZ2MS9). Para tanto, foi realizado o nocaute sítio dirigido por meio da técnica de CRISPR-Cas9. O nocaute do gene *ipdC* foi eficiente, gerando mutantes disruptivos para o referido gene. A biossíntese do AIA pela linhagem $\Delta ipdC$ apresentou reduções nas concentrações do fitormônio, de acordo com o tempo de crescimento, sendo 87,96% em 24 horas, 88,25% em 48 horas e 58,27% em 72 horas do crescimento em comparação à linhagem selvagem (WT). Além disso, a biossíntese do AIA na ausência do aminoácido L-triptofano também foi avaliada, não sendo constatada síntese do fitormônio em nenhum dos tempos crescimento, tanto na linhagem selvagem, quanto na linhagem $\Delta ipdC$. O presente estudo foi pioneiro no nocaute do gene *ipdC* em uma linhagem de *Bacillus* utilizando a técnica de CRISPR-Cas9. Os resultados obtidos contribuem para um melhor entendimento da influência do gene *ipdC* e da via IPyA na biossíntese do AIA pela linhagem RZ2MS9 e futuramente será comprovado seu papel na promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: Auxinas; IPyA; RPCP; Nocaute gênico

ABSTRACT

Knockout of the *ipdC* gene in *Bacillus sp.* (RZ2MS9) with a CRISPR-Cas9 and influence on the IAA biosynthesis L-tryptophan dependent

Among the mechanisms related to the bacterium-plant interaction, the bacterial biosynthesis of indole acetic acid (AIA) plays a fundamental role in the promotion of plant growth, since it is capable of influencing innumerable physiological processes in plants. Different metabolic pathways are used by bacteria for the biosynthesis of IAA, with the indole-3-pyruvic acid (IPyA) pathway being the most commonly described. In this pathway, the indole-3-pyruvate decarboxylase (*ipdC*) gene has a vital role in the production of IAA using the amino acid L-tryptophan as a precursor. In this context, molecular studies about the metabolic pathways and the genes involved in this process are preponderant for the understanding of the interrelationship of the regulatory pathways with the phytohormonium synthesis. 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 growth promotion, especially genes encoding auxins. Thus, the objective of the present study was to verify the function of the *ipdC* gene in the IAA biosynthesis L-tryptophan dependent through the knockout of the *ipdC* in the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus sp.* (RZ2MS9). Therefore, the knockout was realized using the CRISPR-Cas9. The knockout of the *ipdC* gene was efficient, generating disruptive mutants for the said gene. IAA biosynthesis by the $\Delta ipdC$ strain showed reductions in phytohormonium concentrations, according to the growth time, being 87.96% in 24 hours, 88.25% in 48 hours and 58.27% in 72 hours of growth compared to the Wild Type (WT). In addition, the biosynthesis of IAA in the absence of the amino acid L-tryptophan was also evaluated, with no phytohormonium synthesis being observed at any growth time, both in the wild type and $\Delta ipdC$ strain. The present study pioneered the knockout of the *ipdC* gene in a *Bacillus* strain using the CRISPR-Cas9. The results obtained contribute to a better understanding of the influence of the *ipdC* gene and the IPyA pathway in the IAA biosynthesis through the RZ2MS9 strain, and its role in plant growth promoting will be demonstrated in the future.

Keywords: Auxin; IPyA; PGPR; Gene knockout

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Visão geral dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal pelas rizobactérias em associação com as plantas.....14
- Figura 2. Vias metabólicas utilizadas pelas bactérias para a biossíntese do ácido indol acético dependente do L-triptofano IAN, IAM, TSO, TAM e IPyA. (Adaptado de SPAEPEN et al., 2007).....17
- Figura 3. Representação esquemática das vias biossintéticas do L-triptofano e do ácido indol acético (AIA). Os genes detectados no genoma da linhagem RZ2MS9 aparecem sublinhados e as linhas pontilhadas nas vias indicam etapas pouco caracterizadas ou etapas intermediárias omitidas (Retirado de BATISTA, 2017).....18
- Figura 4. Etapas de formação do mecanismo de imunidade adaptativa do sistema CRISPR-Cas9 do tipo II em *S. pyogenes*. I. Organização do locus CRISPR; II. Etapa de adaptação da sequência exógena aos espaçadores da sequência que codifica o crRNA; III. Expressão e maturação do crRNA; IV. Interferência do sistema no DNA exógeno ocasionando a clivagem nas regiões alvo (Retirado e adaptado de AMITAI E SOREK, 2014).....22
- Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação do sistema CRISPR-Cas9 do tipo II. (Adaptado de CHEN et al., 2017).....23
- Figura 6. Visão geral dos principais mecanismos de recombinação e reparo do DNA bactérias. Recombinação homóloga (HR) (A). Recombinação não-homóloga (NHEJ) (B). (Adaptado de BROOKHOUSER et al., 2017).....25
- Figura 7. Mapa dos plasmídeos utilizados no nocaute do gene *ipdC* do *Bacillus sp.* (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9. Plasmídeo pCas: Cas9- gene da Cas9 de *S. pyogenes* (MGAS5005); araC- promotor *P_{arab}*; gam, bet e exonuclease - gene *λ-Red*; lacI- promotor *P_{trc}*, Cas9Bire - sgRNA com alvo no promotor pMB1 do plasmídeo pTargetF; repA101- replicon sensível a temperatura; *Kan^R*- gene de resistência a canamicina (A). Plasmídeo pTargetF: Replicon pMB1; Promotor pj23119; Cas9Bire- sequência do sgRNA; *aadA*- gene de resistência a espectinomicina (B). (Retirado de www.adeggene.org).....28
- Figura 8. Construção e clonagem dos plasmídeos da série Target_{*ipdC*}. Plasmídeo pTargetF utilizado como vetor para construção da série Target_{*ipdC*} (A). Digestão do pTargetF nos sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e inserção dos insertos formados a partir do anelamento de sequências de oligonucleotídeos contendo o promotor pj23119, as sequências N₂₀ (inseridas separadamente em dois oligos distintos) e *Scaffold* formado pelo trcrRNA:crRNA fusionados. Na fita 5'--3' foi inserida a sequência complementar do sítio de *Bam*HI e na fita 3'--5' a sequência complementar ao sítio de *Eco*RI, ambas com terminais coesivos (B). Plasmídeo Target_{*ipdC*} clonado com inserto contendo um sgRNA com uma sequência N₂₀ alvo no gene *ipdC* do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 (C).....33
- Figura 9. Eficiência de transformação do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 com o plasmídeo pCas nas concentrações de 30 ng e 100 ng. As médias do número de transformantes diferem entre as concentrações de plasmídeo pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....39
- Figura 10. Perfil eletroforético da PCR de detecção dos transformantes com plasmídeo pCas contendo o gene da endonuclease Cas9. Da esquerda para a direita: Marcador molecular 1kb ladder (*Sinapse*[®]); 1. DNA genômico da linhagem RZ2MS9; 2. Plasmídeo pCas; 3. Plasmídeo extraído da linhagem RZ2MS9; 4. Produto PCR sem DNA.....40

Figura 11. Curva de crescimento das linhagens RZ2MS9 WT e RZ2MS9 transformada com plasmídeo pCas9 em meio de cultura LB (Lúria Bertani) seletivo, acrescido do antibiótico sulfato de canamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e não seletivo.....41

Figura 12. Correlação do crescimento das linhagens RZ2MS9-pCas e RZ2MS9-WT. Correlação do crescimento entre as linhagens em meio de cultura LB não seletivo (A). Correlação do crescimento da linhagem RZ2MS9-pCas em meio de cultura LB seletivo, acrescido de sulfato de canamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) com a linhagem RZ2MS9-WT crescida em meio de cultura LB não seletivo (B). As linhagens apresentam uma forte correlação positiva no crescimento em ambos os meios.....42

Figura 13. Diagrama de venn, apresentando o número de sgRNAs gerados nas plataformas RGEN Tools Cas-Offinder ver. 2.4 (A), CHOP CHOP (B) e CRISPOR ver. 4.2 (C), os números dentro dos círculos correspondem ao total de sequências N_{20} geradas pela plataforma e as intersecções entre os círculos são referentes ao número de sequências em comum entre as plataformas.....43

Figura 14. Confirmação da clonagem do inserto contendo o sgRNA nos plasmídeos da série Target_{ipdC}. As sequências dos clones foram alinhadas com a sequência N_{20} dos oligonucleotídeos que compõem o sgRNA. As linhas coloridas correspondem à detecção da base no sequenciamento e os traços verticais correspondem ao alinhamento entre as sequências. (A) N_{20} . 1 Target_{ipdC-1}; (B) N_{20} . 2 Target_{ipdC-2}.....44

Figura 15. Gel de agarose (1,2%) com os amplicons obtidos no primeiro e segundo round da overlap PCR (A). Amplicon da região *upstream* do gene *ipdC* (1). Amplicon da região *Downstream* (2). Cassete doador do respectivo gene, obtido a partir da recombinação e amplificação dos produtos do primeiro round da reação *overlap* (3). Alinhamento da sequência do cassette com a do gene realizada no programa BLAST. As linhas horizontais indicam o número de bases similares, entre o gene *ipdC* do *Bacillus* sp. (RZ2MS9) (linha superior) e as sequências do cassette de DNA doador (linha inferior). O gráfico de visualização foi gerado no software on-line *Kablammo* (B).....45

Figura 16. Eficiência do nocaute do gene *ipdC* no genoma do *Bacillus* sp. linhagem RZ2MS9 com a técnica de CRISPR-Cas9. O número de transformantes por μg de DNA⁻¹ foi calculado considerando as concentrações do plasmídeo pTarget_{ipdC-1} e do cassette doador aplicadas na transformação, sendo estas 300 ng e 600 ng, respectivamente. Os tratamentos diferem pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).....46

Figura 17. Perfil eletroforético dos amplicons gerados na PCR de detecção dos mutantes nocaute para o gene *ipdC* no *Bacillus* sp. linhagem RZ2MS9, em gel de agarose (1.2%) corado com SYBR® green (Sigma-Aldrich). 1, 2, 3 e 4 correspondem às bandas dos respectivos mutantes $\Delta ipdC$. 1, 2, 3 e 4; WT corresponde ao amplicom da linhagem RZ2MS9 selvagem (A). Alinhamento entre as sequências do gene *ipdC* na linhagem WT, do DNA doador e do amplicon da linhagem RZ2MS9 $\Delta ipdC$ -1. Preto indica bases idênticas entre as 3 sequências; Cinza indica bases idênticas entre a linhagem WT e o DNA doador; Azul indica as bases idênticas entre o DNA doador e a linhagem $\Delta ipdC$ -1; Verde indica as bases idênticas entre a linhagem WT e a $\Delta ipdC$ -1, as sequências incolor não apresentam identidade (B).....47

Figura 18. Biossíntese do ácido indol acético (AIA) via L-triptofano dependente pelas linhagens selvagem (WT) e nocaute para o gene *ipdC* ($\Delta ipdC$) em 24, 48 e 72 horas de crescimento. A biossíntese do fitormônio difere entre as linhagens de acordo com o tempo de crescimento. Colunas com letras iguais não diferem pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de <i>primers</i> utilizadas na construção dos cassetes de DNA doador para o nocaute do gene <i>ipdC</i> no <i>Bacillus sp.</i> linhagem RZ2MS9.....	34
Tabela 2. Sequências N ₂₀ com alvo no gene <i>ipdC</i> da linhagem RZ2MS9, geradas pelas plataformas de bioinformática RGEN Tools Cas-Offinder ver. 2.4, CRISPOR ver. 4.2 e CHOP CHOP.....	43
Tabela 3. Tempo requerido para obtenção de mutantes nocautes para o gene <i>ipdC</i> no <i>Bacillus sp.</i> linhagem RZ2MS9 com a técnica de CRISPR-Cas9 no sistema de plasmídeos duplos.....	48

1. INTRODUÇÃO

As rizobactérias promotoras do crescimento em plantas (RPCPs) constituem um grupo de microrganismos, capazes de influenciar o crescimento e desenvolvimento vegetal por mecanismos de ação direta e/ou indireta durante a 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).

A interação entre plantas de diversas culturas agrícolas e RPCPs tem sido descrita como essencial para sua sanidade e crescimento, de forma que essas interações têm culminado em rendimentos culturais elevados, além de minimizar impactos ambientais em função da diminuição do uso de agroquímicos (JIJÓN-MORENO et al., 2015). Entre os mecanismos relacionados com essa interação, a biossíntese bacteriana de auxinas - entre elas o ácido indol acético (AIA) - exerce um papel fundamental na modulação do crescimento vegetal, afetando processos, como a divisão e o alongamento celular, tropismo, dominância apical, senescência, florescimento e respostas ao estresse (LAMBRECHT et al., 2000; DOBBELAERE et al., 2001; TAGHAVI et al., 2009; FACELLA et al., 2012).

O AIA sintetizado pelas bactérias pode ser proveniente de cinco vias metabólicas: Indole-3-acetamida (IAM), Indole-3-acetonitrila (IAN), Triptofano oxidase de cadeia lateral (TSO), Triptamina (TAM) e a via Indole-3-piruvato (IPyA) (SPAEPEN et al., 2007; LIN et al., 2015). Esta última, a mais caracterizada e melhor descrita em RPCPs, envolve a ação direta do gene *ipdC* pela codificação da enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC) (CARRENO-LOPEZ et al., 2000; PATTEN & GLICK, 2002). Além disso, a biossíntese de AIA por essas vias é diretamente estimulada pela presença do L-triptofano, de forma que seu catabolismo pelas bactérias origina os compostos precursores do AIA, sendo os exsudatos radiculares a principal fonte desse aminoácido para as rizobactérias, além da síntese endógena (COHEN et al., 2003; MERZAEVA & SHIROKIKH, 2010; BEAUREGARD, 2016).

Diferentes gêneros de bactérias e rizobactérias promotoras do crescimento plantas foram descritos como promotores do crescimento e do desenvolvimento radicular em função da biossíntese do AIA (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; SAHARAN & NEHRA, 2011; VEJAN et al., 2016; ASSARI et al., 2017). Recentemente, a rizobactéria *Bacillus* sp. (RZ2MS9), previamente isolada do guaranazeiro, uma planta tipicamente brasileira, foi caracterizada quanto aos possíveis mecanismos de promoção de crescimento vegetal, como a fixação biológica de nitrogênio, biossíntese do ácido indol acético (AIA), produção de sideróforo e solubilização de fosfato. Tendo apresentado significativo efeito no aumento do crescimento do milho e da soja em relação ao tratamento controle, mostrando não possuir especificidade de hospedeiro, sendo esta uma característica desejável para a formulação de inoculantes microbianos (BATISTA, 2013; BATISTA, 2017).

Outrossim, a referida linhagem fora reportada como portadora do gene *ipdC*, tendo seu genoma parcialmente sequenciado e a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *ipdC* na

linhagem RZ2MS9, depositada no *GenBank* sob o número OGY01885.1 Sugerindo-se que a presença desse gene na respectiva linhagem pode estar intimamente relacionado à capacidade de interação da bactéria com as plantas e a seu efeito modulador do crescimento vegetal, em função da sua influência sobre a síntese do AIA dependente do L-triptofano. (BATISTA et al., 2016).

Estudos em nível molecular acerca da síntese bacteriana de AIA dependente do L-triptofano têm sido realizados com a finalidade de compreender seu efeito na interação bactéria-planta, dando indícios sobre a possível influência da sua biossíntese na patogenicidade e fitoestimulação. Esses estudos têm evidenciado que o AIA pode ser uma molécula de sinalização, tanto nas espécies de bactérias produtoras, quanto nas que não sintetizam o fitormônio, levantando a novos questionamentos sobre o papel do AIA em bactérias e na sua interação com as plantas (MANULIS et al., 1998; PEDRAZA et al., 2004; SPAEPEN et al., 2007; KOCHAR et al., 2013).

Desta forma, o estudo e a subsequente avaliação dos mecanismos de interação planta-bactéria atrelados à biossíntese bacteriana do AIA são imprescindíveis para o entendimento da promoção do crescimento vegetal por RPCPs, bem como para a elucidação da influência de genes como o *ipdC* nesse processo, possibilitando o mapeamento da inter-relação entre as vias regulatórias da síntese do fitormônio e a interação com as plantas. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da função do gene *ipdC* na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano pela rizobactéria *Bacillus sp.* (RZ2MS9), por meio do nocaute sítio dirigido com a técnica CRISPR-Cas9.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. RPCPs e promoção do crescimento vegetal

O solo abriga uma microbiota bastante complexa, com muitos gêneros bacterianos envolvidos na dinâmica do seu ecossistema, sendo vitais para a geração de nutrientes e imprescindíveis para a sustentabilidade da produção agrícola, com inúmeras bactérias benéficas às plantas e capazes de influenciar o crescimento e desenvolvimento vegetal (WHIPPS, 2001; AHEMAD E KIBRET, 2014; NADEEM et al., 2015; PARRAY et al., 2016; ASARI et al., 2017).

As bactérias que colonizam o entorno das raízes das plantas são mais versáteis na transformação, mobilização e solubilização dos nutrientes do solo quando comparadas àquelas que estão fora do alcance das raízes (HAYAT et al., 2010; BACH et al., 2016). Esses microrganismos têm melhor capacidade de adaptação ao meio ambiente e sua interação com as plantas tem levado a um maior rendimento das culturas, sendo conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (GOVINDASAMY et al., 2010; VACHERON et al., 2013; GARCÍA-FRAILE et al., 2015).

O termo *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) ou Rizobacterias Promotoras do Crescimento em Plantas (RPCP) foi cunhado por Kloepper e Schroth (1978), sendo descrito como os microrganismos, bactérias, que colonizam a rizosfera das plantas e que são capazes de melhorar seu crescimento e produtividade, geralmente referidos como biofertilizantes ou inoculantes microbianos (KLOEPPER et al., 1980; KLOEPPER et al., 1994; GLICK, 1995; VESSEY et al., 2003; BARTHI et al., 2017).

No processo de interação bactéria-planta, a colonização radicular é descrita como um passo crítico para a expressão efetiva da promoção do crescimento vegetal (REINHOLD-HUREK E HUREK, 2011; VERBON et al., 2016), sendo esta interação fortemente influenciada pelos padrões exsudativos das plantas e seu efeito quimiotático sobre as bactérias (LASKOWSKI et al., 2006; COMPANT et al., 2010; WANG et al., 2016). Deste modo, as rizobactérias são capazes de modificar rápida e adequadamente a superfície das células vegetais, alterando a morfologia radicular e o padrão estrutural das raízes, sendo crucial para a expressão do potencial bacteriano de promover o crescimento das plantas (PATTEN E GLICK, 2002; MA et al., 2016)

Uma enorme variedade de rizobactérias, incluindo *Aeromonas veronii*, *Agrobacterium spp.*, *Alcaligenes piechaudii*, *Bradyrhizobium spp.*, *Burkholderia spp.*, *Comamonas acidovorans*, *Enterobacter spp.*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus spp.* e *Pseudomonas spp.* (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; SAHARAN E NEHRA, 2011; VEJAN et al., 2016; ASSARI et al., 2017) são comumente encontradas na rizosfera de inúmeras espécies de plantas, estimulando o crescimento vegetal através de mecanismos diretos ou indiretos (Figura 1) (GLICK, 2012; BHATTACHARYYA et al. 2017; NOVO et al., 2018). A diferença entre esses mecanismos nem sempre é evidente, os indiretos, de modo geral, são aqueles cujos fenômenos químicos e biológicos acontecem fora da planta, enquanto os

mecanismos diretos são aqueles em que esses fenômenos ocorrem dentro da planta e afetam diretamente o seu metabolismo (VESSEY, 2003; COMPANT et al., 2010; SUÁREZ-MORENO et al., 2012; BEAUREGARD, et al., 2016).

Figura 1. Visão geral dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal pelas rizobactérias em associação com as plantas.

Os mecanismos diretos incluem: aqueles que afetam o equilíbrio dos reguladores do crescimento das plantas, devido aos próprios microrganismos liberarem reguladores em sua interação e aqueles que induzem o metabolismo da planta, levando a uma melhoria na sua capacidade adaptativa (PODILE et al., 2007; GARCIA-FRAILE et al., 2015). Entre os mecanismos de ação direta na promoção do crescimento vegetal pelas rizobactérias estão: a fixação de nitrogênio, a biossíntese de ácido indol acético (AIA), a produção de ACC deaminase, a solubilização de fosfato e potássio, a produção de sideróforos, a disponibilização de diferentes tipos de vitaminas (como as do complexo B) e a disponibilização de fatores nutricionais para a planta (GOVINDASAMY et al., 2008; MENDES et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; BATTACHARYYA et al., 2017).

Os mecanismos indiretos de promoção do crescimento vegetal pelas rizobactérias correspondem à participação nos processos do metabolismo defensivo das plantas por meio do *feedback* de sinalização e resposta (CHEN et al., 2013, KUMAR et al., 2012). Dentre esses, dois são mais comumente descritos, sendo eles: a indução de resistência sistêmica a patógenos de plantas (IRS) e a proteção contra condições

deletérias do ambiente, tais como salinidade ou poluição com metais pesados, correspondendo a estresses bióticos e abióticos, respectivamente (MA et al., 2016; GLICK, 2014). Além desses, também podem ser associados à promoção do crescimento de maneira indireta, a produção de antibióticos e antifúngicos, a síntese de enzimas líticas e o biocontrole de patógenos (GLICK, 2014; RAJKUMAR et al., 2010; CHEN et al., 2013, KUMAR et al., 2012; SUÁREZ-MORENO et al., 2012; PATEL E MINOCHEHERHOMJI, 2018; GOSWAMI et al., 2016).

Embora esses mecanismos (diretos e indiretos) de promoção do crescimento de plantas mediados pelas rizobactérias sejam conhecidos, os estudos acerca da interação bactéria-planta e dos mecanismos moleculares envolvidos nessas habilidades ainda não foram completamente elucidados (KHAN et al., 2009, YADAV et al., 2015; AHMED E KIBRET et al., 2014).

2.2. Gênero *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus*, pertencente à família *Bacillaceae*, caracteriza-se por sua grande heterogeneidade genética, que se apresenta desde a composição do DNA até suas diversas condições de crescimento e nutrição (ASH et al., 1991). As bactérias desse gênero, um dos mais abundantes no solo na rizosfera das plantas, são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos com amplos espectros de atividades incluindo antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crescimento em plantas, efetores, enzimas líticas e inibidores de enzimas (SANSINENEA E ORTIZ, 2011; CHAABOUNI et al., 2012).

A promoção do crescimento vegetal por intermédio de bactérias do gênero *Bacillus* spp. tem sido constantemente reportada em diferentes culturas de interesse agrícola, como milho (BATISTA et al., 2017, EGAMBERDIYEVA, 2007; GOND et al., 2015), 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 (ZAIDI et al., 2006), por meio de mecanismos diretos e indiretos, incluindo a biossíntese de fitormônios como ácido indol acético, citocininas, giberelinas e jasmônato, a solubilização de fosfato, a síntese de fitases, a disponibilização de nutrientes, a produção de compostos orgânicos voláteis, a produção de ACC deaminase, a indução de resistência sistêmica e biocontrole via síntese de metabólicos com ação antifúngica e inseticida como policetídeos e lipopeptídeos (KUMAR et al., 2012; SANTOYO et al., 2012, KAUSHAL E WANI, 2016; SIVASAKTHI et al., 2014; SHAO et al., 2015).

Algumas linhagens de *Bacillus* como *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 de possuir essas habilidades benéficas às plantas, 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 formulações agrícolas (FREITAS e VILDOSO, 2004; FRANCIS et al., 2010; BETTIOL et al., 2012; VEJAN et al., 2016; MEENA et al., 2016).

2.3. Biossíntese bacteriana do ácido indol acético (AIA)

A associação das rizobactérias com as plantas pode afetar sobremaneira a morfogênese da raiz e modular seu crescimento (PERSELLO-CARTIEAUX et al. 2003). Estudos têm sugerido que a rápida resposta à promoção do crescimento das plantas por RPCPs envolve a modulação dos níveis hormonais da planta pela síntese ou degradação dos mesmos (SPAEPEN et al., 2007; ASARI et al., 2017).

Os fitormônios são caracterizados como compostos químicos que promovem e influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, sendo frequentemente divididos em cinco classes principais: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno, embora outros compostos com atividade hormonal já tenham sido identificados, como as estrigolactonas e os brassinosteróides (SANTNER E ESTELLE, 2009).

A biossíntese bacteriana de ácido indol acético (AIA) é tida como um dos principais mecanismos empregados na modulação do crescimento e desenvolvimento radicular das plantas, sendo esse fitormônio a auxina mais abundante nos vegetais, envolvida na regulação de inúmeros processos metabólicos durante o seu desenvolvimento celular (BROECK et al., 1999; DEFEZ et al., 2016). Deste modo, o AIA bacteriano contribui com a proliferação das raízes, resultando no aumento da superfície radicular, permitindo que a planta absorva mais nutrientes e água do solo (LAMBRECHT et al., 2000; BUGARELI et al., 2013).

Com o crescimento e prolongamento da superfície radicular, as plantas tendem a aumentar a liberação de exsudados contendo o aminoácido triptofano, precursor do AIA em diferentes vias biossintéticas, estimulando a síntese do fitormônio pelas rizobactérias (SPAEPEN et al. 2007). Embora seja um processo dinâmico, a biossíntese do AIA pelas bactérias pode ser afetada por fatores da planta tais como compostos específicos, necessários tanto para a síntese do fitormônio quanto para o crescimento bacteriano, bem como por fatores ambientais, como limitação de fontes de carbono, baixo pH e matriz potencial do solo (BUGARELI et al., 2013).

O AIA bacteriano pode ser originado de cinco vias metabólicas, sendo elas: Indole-3-acetamida (IAM), Indole-3-acetonitrila (IAN), Triptofano oxidase de cadeia lateral (TSO), Triptamina (TAM) e a via Indole-3-piruvato (IPyA) (SPAEPEN et al., 2007; LIN et al., 2015) (Figura 2). Esta última, a mais caracterizada e melhor descrita em RPCPs, envolve a ação direta do gene *ipdC* pela codificação de uma enzima chave para a biossíntese do AIA na via IPyA, a indol-3- piruvato descarboxilase (IPDC) (DODD et al., 2010, CARRENO-LOPEZ et al., 2000; PATTEN & GLICK, 2002).

Nesta via, a conversão do L-triptofano a indole-3-piruvato (IPyA) é realizada por uma aminotransferase (transaminação). Em seguida, o IPyA é descaboxilado e convertido em indol-3-acetaldeído (IAAld) e catalisado pela enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC). O IAAld formado

é então oxidado à AIA. Ressalta-se que a síntese do AIA nesta via, bem como a expressão do gene *ipdC*, ocorrem durante a fase estacionária do crescimento bacteriano, sendo induzida pela presença do aminoácido L-triptofano e potencializada pela sua suplementação exógena. Assim, os níveis do AIA sintetizado pelas bactérias têm uma correlação direta com tempo e a fase do crescimento bacteriano (COSTACURTA et al., 1994; BROEK et al., 1999; JASIM et al., 2014).

Figura 2. Vias metabólicas utilizadas pelas bactérias para a biossíntese do ácido indol acético dependente do L-triptofano IAN, IAM, TSO, TAM e IPyA. (Adaptado de SPAEPEN et al., 2007).

A influência da biossíntese bacteriana do AIA via L-triptofano dependente na promoção do crescimento vegetal por meio da inoculação de rizobactérias utilizadas como biofertilizantes tem sido constantemente reportada por vários autores (GARCÍA-FRAILE et al., 2015; KEYEO et al., 2011; IQBAL E HASNAIN, 2013, JASIM et al., 2014). A bactéria promotora do crescimento em plantas *Azospirillum brasilense* é capaz de promover o desenvolvimento radicular e aumentar o número de raízes adventícias em interação com diferentes espécies de plantas, sendo esse efeito atribuído principalmente à biossíntese do AIA sintetizado pela bactéria (CARRENO-LOPEZ et al., 2000; MARTINEZ-MORALES et al., 2003; MEHRY et al., 2008).

A rizobactéria promotora do crescimento em plantas *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 tem apresentado significativo efeito na promoção do crescimento em milho e em soja, sendo este efeito, atribuído, principalmente, à capacidade dessa linhagem em sintetizar o ácido indol acético por vias dependentes do aminoácido L-triptofano (BATISTA, 2013; TSCHOECK, 2016; BATISTA, 2017). O sequenciamento parcial do genoma dessa linhagem, revelou a presença de uma gama de genes

Figura 3. Representação esquemática das vias biossintéticas do L-triptofano e do ácido indol acético (AIA). Os genes detectados no genoma da linhagem RZ2MS9 aparecem sublinhados e as linhas pontilhadas nas vias indicam etapas pouco caracterizadas ou etapas intermediárias omitidas (Retirado de BATISTA, 2017).

Aspectos genéticos da biossíntese do AIA avaliados em bactérias promotoras do crescimento em plantas demonstraram que o nocaute de genes ligados ao catabolismo do L-triptofano, entre eles o gene *ipdC*, nas vias biosintéticas do fitormônio, acarretam uma drástica diminuição na síntese do AIA, podendo, também, afetar a habilidade das bactérias de colonizar as raízes das plantas, demonstrando haver uma forte correlação entre os genes ligados à biossíntese do AIA com o potencial de promoção do crescimento vegetal e a capacidade de interação bactéria-plantas (ARORA et al., 2001; CASSÁN et al., 2014, JASIM et al., 2014).

O ácido indol acético desempenha um papel importante na regulação do desenvolvimento e crescimento das plantas, influenciando processos como divisão e alongamento celular, tropismo, dominância apical, senescência, florescimento, resposta ao estresse, crescimento e desenvolvimento normal dos vegetais. As plantas mantêm a homeostase das auxinas através da regulação do seu transporte

e biossíntese, bem como por meio da modificação de moléculas de auxina em formas ativas ou inativas (KORASICK et al. 2013; SHI et al. 2014; YANG et al. 2014; DI et al., 2016).

A concentração do AIA nas plantas e seu transporte, basípeto ou acrópeto, variam em função do fluxo e efluxo nos tecidos vegetais, da síntese meristemática a partir do aminoácido triptofano, bem como da formação de compostos conjugados de AIA (SIMON E PETRASEK 2011; SHI et al., 2014; DI et al., 2016). Esse fitormônio é assimilado por receptores transmembrana das células vegetais, como as proteínas ABP1 (*Auxin-Binding Protein 1*), penetrando nas células via transporte ativo carregado por moléculas AUX1, ou passivo, via difusão de moléculas em compostos conjugados lipofílicos (KORASICK et al., 2013; AHMED & HASNAIN, 2014; PAQUE E WEIJERS, 2016)

A resposta da planta ao AIA exógeno pode variar de benéfico a deletério, em função da concentração do fitormônio percebida nos tecidos vegetais, da forma química livre ou conjugada do AIA e da sensibilidade celular nesses tecidos. Em uma resposta benéfica, como caso de um aumento do conteúdo hormonal na rizosfera devido à atividade microbiana de rizobactérias produtoras de ácido indol acético, os níveis do fitormônio na planta são suplementados, desta forma, as condições hormonais tornam-se temporariamente ótimas e ocasionam modificações parciais no metabolismo celular da planta com consequente aumento do crescimento (CASSÁN et al., 2013; JHA E SARAF et al., 2015).

Em algumas espécies de plantas, baixas concentrações de auxinas apresentaram um melhor efeito na taxa de alongamento das raízes (SILVA E DAVIES, 2007). Desse modo, sugere-se que as bactérias sintetizam o AIA, em uma faixa ideal de concentração necessária para estimular o alongamento radicular (VACHERON et al. 2013; KUDOYROVA et al., 2015). O envolvimento de auxinas como AIA na promoção do crescimento vegetal e modulação do desenvolvimento radicular por bactérias promotoras do crescimento em plantas vem sendo confirmado em experimentos que utilizam plantas mutantes para os mecanismos de transporte de auxina, de forma que o AIA sintetizado pelas bactérias não ocasiona seu crescimento (KUDOYROVA et al., 2015).

Embora a função e importância bioquímica do AIA nas plantas seja evidente, a caracterização fisiológica de seu real efeito e influência na interação bactéria-planta e na capacidade das bactérias de modular o crescimento vegetal por meio da biossíntese do AIA dependente do L-triptofano ainda não foram completamente elucidados. (LAMBRECHT et al., 2000; PATTEN E GLICK, 2002; DUCA et al., 2014; SHAO et al., 2015).

2.4. Ferramentas moleculares para o estudo da função de genes em bactérias

As funções essenciais dos genes garantem a ocorrência normal dos processos celulares centrais, portanto, o questionamento das relações entre essas funções e os mecanismos coordenados por elas é fundamental para compreensão do papel e da influência dos genes nos processos biológicos das células bacterianas e sua interação com outros organismos (CHRISTEN et al., 2011; PETERS et al., 2016).

No âmbito das ferramentas disponíveis para esses estudos, a estratégia mais comumente utilizada é a alteração da expressão gênica (nockout, silenciamento), com consecutivas observações das consequências que as mesmas provocam no funcionamento das células (PEREIRA et al., 2016).

O entendimento da função dos genes depende da possibilidade de alterar sequências de DNA dentro da célula de maneira controlada. Em organismos procarióticos tecnologias acessíveis, fáceis de usar e eficientes são almejadas para a engenharia genética e estudos de funções de genes por meio de modificações no DNA (BAE E SCHNEEWIND, 2006; SUNG et al., 2001; JIANG et al., 2013). A tecnologia de DNA recombinante revolucionou o estudo do genoma, impulsionando inúmeros estudos com base em sua aplicação em vários campos, entre estes a agricultura. Desde então, pesquisadores têm contemplado a possibilidade de fazer mudanças sítio específicas nos genomas (DOUDNA E CHARPENTIER, 2014).

As primeiras abordagens para o processo referido como edição de genoma contavam com o princípio de reconhecimento sítio específico de sequências do DNA, bem como do estudo de vias naturais de recombinação e reparo no genoma de bactérias e leveduras, tendo revelado que as células têm maquinaria endógena para reparar quebras na dupla fita do DNA (Double Strand Break - DSB) que de outra forma seriam letais para esses organismos. Desta forma, os métodos para introduzir mutações precisas em regiões do DNA foram reconhecidas como uma estratégia importante para engenharia genética (DOUDNA E CHARPENTIER, 2014; KUMAR et al., 2016).

As tecnologias para o estudo da função de genes por meio da engenharia de genomas incluem aquelas baseadas em nucleases “dedo de zinco” (ZFNs) ou nucleases efetoras fusionadas a ativadores de transcrição (TALEN), enzimas programáveis que utilizam a ligação proteína-DNA, ao invés da hibridização RNA-DNA, para edição de regiões específicas nos genomas. No entanto, embora essas técnicas ainda sejam empregadas em alguns experimentos, essas tecnologias exigem novo *design* e validação de proteínas para cada caso, restringindo sua ampla adoção. Além disso, a engenharia de especificidade de sequência para essas proteínas permanece um processo longo e oneroso (BEERLE et al., 1998; LAMBOWITZ et al., 2011; ZHANG et al., 2011; BIKARD et al., 2013; GAJ et al., 2013; BARRANGOU E DOUDNA, 2016;).

Em contraste a essas técnicas, o CRISPR- Cas9 constitui um sistema para edição de genomas visando o estudo das funções de genes e geração de produtos biotecnológicos, claramente mais simples de ser projetado, com alta especificidade e eficiência, sendo bem adequado para a edição de genes em uma enorme variedade de tipos de células e organismos com praticidade e baixo custo comparado às demais técnicas propostas (RAN et al., 2013).

2.4.1. Técnica de CRISPR-Cas9

A técnica de CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) surgiu como uma tecnologia poderosa e universal para a edição de genomas, fornecendo um método molecular preciso com mecanismo simples, sendo seu uso difundido em sistemas experimentais e aplicados. Essa tecnologia é baseada em tesouras moleculares programáveis para realizar incisões precisas no DNA. (CHARPENTIER, 2015).

Várias versões desse sistema têm sido desenvolvidas, ampliando a sua gama de aplicações para manipular genes e sua expressão em uma grande variedade de células e organismos. Deste modo, a técnica de CRISPR-Cas9 foi rapidamente adotada pelos pesquisadores, e hoje, é reconhecida como uma tecnologia transformadora em vários campos de pesquisa com o potencial para manipulação do genoma em animais, plantas e microrganismos (DOUDNA E CHARPENTIER, 2014; BARRANGOU E DOUDNA, 2016).

O sistema CRISPR-Cas9 do tipo II tem origem no sistema de imunidade adaptativa de *Streptococcus pyogenes* contra vírus e plasmídeos (DELTCHEVA et al., 2011; JINEK et al., 2012; JIANG et al., 2013). Essa imunidade que constitui o sistema CRISPR ocorre naturalmente em três fases distintas nas bactérias: (i) inserção de um fragmento curto do DNA exógeno invasor da célula como uma sequência espaçadora dentro da matriz CRISPR; (ii) transcrição do precursor do *crRNA* (pré-*crRNA*) que passa por maturação pela ação do *trans activating* RNA (*tracrRNA*) para gerar *crRNAs* individuais, sendo cada um composto por uma porção de elementos de repetição e por uma porção do DNA exógeno adquirido como descrito na etapa sobescrita; (iii) clivagem do DNA exógeno, dirigida pelo *crRNA* acoplado a endonuclease Cas9, nos sítios complementares as sequências dos espaçadores contidos no *crRNA* (Figura 4) (LILLESTOL et al., 2009; AMITAL E SOREK, 2016; CHOI E LEE, 2016; BARRANGOU E DOUDNA, 2016).

Figura 4. Etapas da formação do mecanismo de imunidade adaptativa do sistema CRISPR-Cas9 do tipo II em *S. pyogenes*. I. Organização do locus CRISPR; II. Etapa de adaptação da sequência exógena aos espaçadores da sequência que codifica o crRNA; III. Expressão e maturação do crRNA; IV. Interferência do sistema no DNA exógeno ocasionando a clivagem nas regiões alvo (Retirado e adaptado de AMITAI E SOREK, 2014).

O mecanismo de funcionamento dessa técnica envolve basicamente a ação programada de dois elementos: a nuclease Cas9 e o RNA guia (*gRNA*), composto a partir da fusão do *trans activating* RNA (*tracrRNA*) com o CRISPR RNA (*crRNA*). Contudo, para a realização de quebras na dupla fita do DNA pela Cas9 seja possível, essa endonuclease deve estar obrigatoriamente associada ao RNA duplex constituído pelo *tracrRNA* e o *crRNA* para formar pares de base com sequências alvo de DNA, permitindo que a Cas9 introduza as quebras na dupla fita em um local específico (Figura 5) (BARRANGOU, 2013; SELLE E BARRANGOU, 2015; MARRAFFINI, 2016).

Para a aplicação da técnica de CRISPR-Cas9, com maior facilidade em diferentes organismos, o RNA duplo (*tracrRNA:crRNA*) foi manipulado de forma que constituísse um único RNA, denominado de *single guide* RNA (*sgRNA*), mantendo as funções de ambos (JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013).

Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação do sistema CRISPR-Cas9 do tipo II. (Adaptado de CHEN et al., 2017).

O sgRNA contém duas características essenciais para o correto funcionamento desse sistema: uma sequência N_{20} na extremidade 5' que determina a região alvo da Cas9 pelo emparelhamento de bases e uma estrutura em cadeia dupla na extremidade 3' que se acopla à enzima Cas9. Deste modo, a junção do sgRNA com a endonuclease Cas9 forma o sistema CRISPR-Cas9, que pode ser direcionado a qualquer sequência de DNA onde pretende-se promover a alteração/edição genética (SAMPSON E WEISS, 2014, SANDER E JOUNG, 2014; STEMBERG et al., 2016).

A Cas9, na técnica de CRISPR, forma uma estrutura composta pelo sgRNA e por dois domínios com capacidade de clivar as sequências alvo no DNA. A estrutura bilobulada da enzima Cas9 utiliza seu domínio HNH para clivar a fita de DNA complementar a sequência N_{20} contida na posição 5' do sgRNA, já o domínio RuvC atua clivando a fita complementar à sequência alvo (ANDERS et al., 2014; NISHIMASU et al., 2014).

O reconhecimento do DNA alvo pela Cas9 requer, além do emparelhamento de bases, a presença de uma sequência curta de nucleotídeos, denominada sequência PAM (CHEN et al., 2014; PATTANAYAK et al., 2013). O *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) - motivo de sequência curta e adjacente à sequência alvo no DNA - desempenha um papel importante no reconhecimento do sítio de clivagem pela Cas9, sinalizando o sítio de ancoramento na região alvo. A sequência PAM no sistema CRISPR-Cas9 do tipo II corresponde aos aminoácidos 5'-NGG-3', localizados na adjacência da sequência alvo no DNA (GASIUNAS et al., 2012; DOUDNA E CHARPENTIER, 2014; JINEK et al., 2014; HELER et al., 2014).

A interação da enzima Cas9 com o sgRNA resulta em uma alteração conformacional em sua estrutura, que acarreta a formação do domínio de interação com o PAM. Então, esse complexo passa a atuar simultaneamente nas duas fitas do DNA alvo. Neste ponto, os resíduos conservados do aminoácido arginina, presentes na Cas9, ligam-se aos nucleotídeos (NGG) da sequência PAM, imobilizando a fita complementar da região alvo. Em paralelo, a outra região do complexo Cas9:sgRNA interage com grupamento fosfodiéster da fita que contém a sequência complementar ao N₂₀, contido no sgRNA, afastando-as (CHOI E LEE, 2016; JIANG E DOUDNA; 2017).

Com a separação das fitas, a abertura formada permite a interação do sgRNA com a sua sequência complementar ao DNA alvo, iniciando o processo que envolve o reconhecimento de uma sequência de aproximadamente 12 nucleotídeos de extensão pelo N₂₀, com alta especificidade ao sgRNA. A partir de então, um pareamento completo e estável é formado entre o sgRNA:Cas9 e a região alvo. A carga negativa proveniente da formação do *heteroduplex* sgRNA/DNA, envolvido pelo sulco interlobular da Cas9, que é positivamente carregado, promove a clivagem da dupla fita a uma distância de aproximadamente 4 nucleotídeos do PAM pelos domínios HNH e RuvC da enzima Cas9, originando extremidades abruptas no DNA alvo. Por fim, o DNA alvo é reparado por mecanismos de recombinação homóloga, com a inserção de um template doador contendo as modificações desejadas, ou por recombinação não-homóloga (MOJICA et al., 2005; MARRAFFINE E SONTHEIMER, 2010; ROHS et al., 2010; MULEPATI et al., 2014; STERNBERG et al., 2014; HELER et al., 2015).

2.4.1.1. Recombinação e reparo de quebras na dupla fita do DNA

O reparo do DNA constitui um fenômeno de alta complexidade. Os mecanismos de reparação comumente envolvidos na reconstituição de regiões lesionadas no genoma podem agir em casos distintos por várias vias principais, que podem ocorrer completamente independentes. Essas vias diferem em seu mecanismo de ação conforme o nível em que as lesões são revertidas ou removidas do genoma por inúmeros complexos proteicos que modificam quimicamente o DNA durante o processo de reparação (AYORA et al., 2011; MATTHEWS E SIMONS, 2014).

As vias que reparam o DNA podem ser divididas em dois grupos principais quanto ao seu mecanismo de ação no processamento do reparo (Figura 6). No primeiro, extremidades lesionadas são alinhadas e unidas utilizando homologia de sequência a partir de um template doador com similaridade à sequência presente na região danificada, que serve como molde para recombinação e restauração do DNA, ao passo que, no segundo grupo, as regiões genômicas lesionadas são diretamente reunidas e religadas, constituindo, deste modo, as vias de recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR) e não-homóloga (*nonhomologous end-joining* - NHEJ) (ARAVIND et al., 2001; HAFFERIN E TOMKINS, 2005).

Figura 6. Visão geral dos principais mecanismos de recombinação e reparo do DNA bactérias. Recombinação homóloga (HR) (A). Recombinação não-homóloga (NHEJ) (B). (Adaptado de BROOKHOUSER et al., 2017).

No processo de edição de genes, a principal etapa para inserção das modificações desejadas no DNA é a geração de quebras na dupla fita em uma região específica a ser modificada, como, por exemplo, as desencadeadas pelos sistemas CRISPR-Cas9. Essas mutações que envolvem a quebra da dupla fita no DNA são completamente dependentes de uma maquinaria de reparo eficiente (SANDER E JOUNG, 2014; ARAVIND et al., 2001).

A HR é o mecanismo de reparo de DNA mais universal e bem caracterizado em bactérias, constituindo-se em um mecanismo de reparo prático para a introdução de mutações com o sistema CRISPR-Cas9. Deste modo, a reparação mediada por HR pode ser utilizada para introduzir mutações pontuais ou específicas por meio da inserção de uma sequência de DNA exógeno contendo as modificações desejadas, resultando na deleção ou inserção de grandes segmentos genômicos. (ALONSO et al., 2013; SELLE E BARRANGOU, 2015).

Na via de reparo por recombinação homóloga, de maneira geral, a quebra na dupla fita do DNA recruta as proteínas RecD, RecC e RecB que têm atividade de helicase, com RecB tendo também a atividade de exonuclease. Essas proteínas necessitam do reconhecimento de uma sequência *chi*, e em função disso, ocasiona o retardo no início do processamento da lesão no DNA, causando alterações conformacionais, que, por sua vez, facilitam o recrutamento das proteínas RecA em uma das fitas simples na região lesionada do DNA. O *heteroduplex* formado pelas proteínas RecA com as fitas simples da região lesionada do DNA é, então, submetido à revisão conformacional, e, havendo homologia de sequências, ocorre uma eventual invasão da fita no segmento de DNA que serve como molde para

recombinação, formando uma junção de *Holliday*. A resolução do DNA heteroduplex na junção de Holliday resulta em recombinação recíproca ou não recíproca. (KOWALCZYKOWSKI et al., 1994; KUZMINOV, 1999; KOWALCZYKOWSKI, 2000; COX, 2002; LUSETTI E COX, 2002; AMUNDENSEN et al., 2007; DILLIGHAN E KOWALCZYKOWSKI, 2008; DIDELOT E MAIDEN, 2010).

Um outro caminho utilizado pelas bactérias para recombinação homóloga envolvendo proteínas Rec é sistema RecF, RecO, RecR, RecJ e RecQ. Essa via apresenta uma redundância parcial com o complexo RecBCD, descrito anteriormente. A proteína com atividade de helicase RecQ desenrola a fita de DNA das extremidades não coesivas e a nuclease RecJ gera uma saliência na dupla fita, permitindo que o complexo formado por RecF, RecO e RecR recrutem a RecA para a extremidade cuja a saliência foi gerada pela RecJ. A partir de então, as etapas restantes da invasão da dupla fita pela sequência homóloga, bem como a resolução da junção de Holliday são semelhantes aos descritos na via de RecBCD (WEBB et al., 1997; WELLER et al., 2002; MORIMATSU E KOWALCZYKOWSKI, 2003; AMUNDENSEN E SMITH, 2003; ROCHA et al., 2005; COX, 2007; WIGLEY, 2013; SELLE E BARRANGOU, 2015).

Em contrapartida, o mecanismo de recombinação não homóloga é aparentemente mais simples, comparado ao homólogo. No entanto, é dependente da existência de duas proteínas-chave: a Ku e a LigD. A via de recombinação não-homóloga (NHEJ) também pode levar à introdução eficiente de mutações do tipo inserção/deleção (indels). As proteínas Ku e LigD, envolvidas nesse mecanismo em bactérias, podem oferecer uma via eficiente para a geração de mutantes. O NHEJ ocorre por meio da ligação da proteína Ku a um terminal não coesivo na região da quebra da dupla do DNA e pelo conseguinte recrutamento e ligação da região lesionada pela proteína LigD, sem que haja a necessidade da inserção de um fragmento homólogo, resultando em deleções e inserções de comprimentos variáveis durante o reparo (SHUMAN E GLICKMAN, 2007; LIEBER, 2010; LENHART et al., 2012; ALONSO et al., 2013; SELLE E BARRANGOU, 2015; SANDER E JOUNG, 2014; SU et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas, DNA genômico, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens *Escherichia coli* (DH5 α) e *Bacillus sp.* (RZ2MS9), utilizadas no presente estudo, foram rotineiramente crescidas a partir de estoque em -80°C, em meio de cultura Luria Bertani (LB) 10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extrato de levedura para 1000 mL de H₂O deionizada) a 37°C e 28°C, respectivamente, para obtenção de colônias isoladas. Plasmídeos e DNA genômico foram extraídos utilizando respectivamente os kits *Qiaprep Spin Miniprep* (Qiagen) e *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo-se instruções do fabricante.

O sistema de plasmídeos duplos foi adotado para o emprego da técnica de CRISPR-Cas9, separando-se a Cas9 e o sgRNA, com alvo no gene *ipdC* da linhagem RZ2MS9, em dois plasmídeos: séries pCas e pTargetF, respectivamente (JIANG et al. 2015), ambos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Welington Luiz de Araújo, docente do Departamento de Microbiologia, ICB-USP.

Para o nocaute gênico foram utilizados os plasmídeos: pCas, que carrega a sequência que codifica a enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (MGAS5005) com seu promotor nativo *Pcas*, o gene *Kan^R* (resistência a canamicina), o replicon de sensibilidade à temperatura, *temperature-sensitive (Ts)* *repA101* ambos provenientes do plasmídeo pKD46 para autodepuração, o gene *λ -Red* para recombinação homóloga do cassete de DNA doador, sob o controle do promotor *P_{arab}* (induzido por L-arabinose) e um sgRNA com uma sequência N₂₀ alvo no replicon *pMB1* do plasmídeo pTargetF (sgRNA-pMB1) sob controle de um promotor induzido por IPTG, *P_{trc}* (JIANG et al., 2015) (Figura 7A). Já o segundo plasmídeo, o pTargetF, carrega sequências do sgRNA (tracrRNA:crRNA), do promotor *pJ23119*, do gene *aadA* resistente à espectinomicina, do replicon *pMB1* e múltiplos sítios de restrição (Figura 7B) (JIANG et al., 2015).

Figura 7. Mapa dos plasmídeos utilizados no nocaute do gene *ipdC* do *Bacillus sp.* (RZ2MS9) com a técnica de CRISPR-Cas9. Plasmídeo pCas: Cas9- gene da Cas9 de *S. pyogenes* (MGAS5005); araC- promotor *P_{araB}*; gam, bet e exonuclease - gene *λ-Red*; lacI- promotor *P_{trc}*; Cas9Bire - sgRNA com alvo no promotor pMB1 do plasmídeo pTargetF; repA101- replicon sensível a temperatura; Kan^R- gene de resistência a canamicina (A). **Plasmídeo pTargetF:** Replicon pMB1; Promotor pj23119; Cas9Bire- sequência do sgRNA; aadA- gene de resistência a espectinomicina (B). (Retirado de www.adeegene.org).

3.2. Transformação do *Bacillus sp.* com o plasmídeo pCas

A transformação com o plasmídeo pCas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Schuter et al., 1989. A linhagem RZ2MS9 foi inicialmente crescida em um pré-inóculo de 10 mL de meio de cultura LB, acrescido de ácido 2-aminoacético (concentração final de 0,1%) para promover uma maior eficiência de transformação, por 24 horas a 28°C em agitador orbital (180 rpm). Após o crescimento, a densidade óptica (OD) do pré-inóculo foi aferida em espectrofotômetro a uma absorbância de $\lambda = 550\text{nm}$. Posteriormente, alíquotas do pré-inóculo foram diluídas em 100 mL de meio LB líquido novamente acrescido de ácido 2-aminoacético (0,1%), para obtenção de um inóculo inicial com uma $OD_{550\text{nm}} = 0,01$.

O inóculo foi então incubado em agitador orbital (180 rpm) a 28°C até atingir uma $OD_{550\text{nm}} = 0,2$. Em seguida, o meio foi centrifugado a 15.000 g por 4 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensão em 2,5 mL de tampão de eletroporação (400 mM de sacarose, 1 mM MgCl_2 , 7 mM de fosfato de potássio, pH 6,0) gelado ($\sim 4^\circ\text{C}$). As amostras ressuspensas, foram novamente centrifugadas a 15.000 g por 6 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Essa operação foi repetida mais uma vez seguida de nova ressuspensão de *pellet* com tampão de eletroporação. Posteriormente, alíquotas de 800 μL foram inseridas em cubetas de eletroporação *Genepulser* 0,2, previamente resfriadas ($\sim 4^\circ\text{C}$) e mantidas em gelo durante todo o procedimento.

Alíquotas de 30 ng e 100 ng do plasmídeo pCas foram inseridas nas cubetas de eletroporação separadamente, contendo as células bacterianas eletrocompetentes, sendo então incubados por 10 minutos a 4°C e, posteriormente, eletroporadas utilizando um capacitor de 25 μF , 1.3 kV e resistor de 400 Ω , *Genepulser* (Bio-Rad). Após a eletroporação, as cubetas contendo as linhagens foram mantidas a 4°C por mais 10 minutos sendo a posteriori, as células bacterianas, diluídas em 1,2 mL de meio de cultura LB e incubadas por 3 horas a 28°C em agitador orbital (180 rpm).

Logo após, duas alíquotas de 100 μL foram espalhadas individualmente em placas de Petri contendo o meio de cultura LB-ágar acrescido do antibiótico sulfato de canamicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O restante do volume da diluição foi novamente centrifugado a 15.000 g por 5 minutos e o sobrenadante descartado, mantendo-se apenas uma pequena quantidade para a ressuspensão do *pellet* e espalhamento em placas nas mesmas condições descritas para as alíquotas iniciais. Os transformantes foram obtidos após 24 horas de incubação a 28°C. As colônias obtidas foram contadas para determinação da eficiência de transformação (número de transformantes por μg de DNA^{-1}).

3.3. Identificação dos transformantes com o pCas e curva de crescimento

A confirmação da transformação da linhagem RZ2MS9 com o plasmídeo pCas foi realizada a partir do crescimento das linhagens transformadas em 5 mL de meio de cultura LB com a adição do antibiótico sulfato de canamicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas a 28°C. Em seguida, as culturas foram

centrifugadas e o plasmídeo pCas extraído, a partir do *pellet* formado, utilizando o kit *Qiaprep Spin Miniprep* (Qiagen®).

A detecção do pCas foi realizada por meio de PCR com *primers* desenhados especificamente para plasmídeo pCas, pCasF (5'-CGGTGCCACTTTTTCAAGTT-3') e pCasR (5'-GTTTGAGACGAGTCGCTTCC-3'), em uma reação contendo: 10 ng do DNA molde; 0,2 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 0,2 mM de dNTP; 1x do tampão da enzima Taq *Buffer*; 3,5 mM de MgCl₂ e 0,06 U. μ L da enzima Taq DNA polimerase (*Thermo scientific*®).

A reação consistiu nos seguintes ciclos de termociclagem: 94°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos (95°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os amplicons obtidos na reação foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com SYBR® *green* (Sigma-Aldrich). Como controle positivo para detecção foi utilizado o próprio plasmídeo pCas usado na transformação e como controle negativo foi utilizado o DNA do *Bacillus sp.* Já para o controle da reação PCR, o DNA molde foi substituído por H₂O deionizada estéril.

Para avaliar a cinética do crescimento, as linhagens selvagem e transformada com plasmídeo pCas, foram inicialmente crescidas em um pré-inóculo de 10 mL de meio de cultura LB acrescido ou não de 100 μ g mL⁻¹ do antibiótico sulfato de canamicina, por 24 horas a 28°C em agitador orbital (180 rpm). Após o crescimento, a densidade óptica (OD) do pré-inóculo foi aferida em espectrofotômetro a uma absorvância de λ = 600nm. Posteriormente, alíquotas do pré-inóculo foram diluídas em frascos contendo 100 mL de meio de cultura LB, acrescido ou não de 100 μ g mL⁻¹ do antibiótico sulfato de canamicina, em triplicata para alcançarem uma OD inicial de 0.1, em frascos contendo 100 mL de meio de cultura LB, acrescido ou não de 100 μ g mL⁻¹ do antibiótico sulfato de canamicina, em triplicata. Em seguida, as culturas foram incubadas a 28°C em agitador orbital (180 rpm) por um período total 48 horas. As leituras da densidade óptica foram aferidas em espectrofotômetro a uma absorvância de λ = 600nm sendo realizadas a cada 2 horas, nas primeiras 12 horas de crescimento, e posteriormente às 24 horas e 48 horas após o início do crescimento.

3.4. Obtenção e seleção de sequências N₂₀ para o sgRNA

As sequências N₂₀ que compõem o sgRNA nos plasmídeos pTarget_{ipdC} foram construídas com base na sequência do gene *ipdC* (OGY01885.1) e direcionadas para um alvo do referido gene, no genoma da linhagem RZ2MS9, flanqueado por uma sequência PAM (NGG) (JIANG et al., 2015). As ferramentas CRISPR RGEN Tools Cas-OFFinder vers. 2.4 (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) (BAE et al., 2014), CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/dev/>) (LABUN et al., 2016) e CRISPOR vers. 4.2 (<http://tefor.net/crisporDev/crisporBeta/crispor.py>) (HAEUSSLER et al., 2016) foram utilizadas para a geração das sequências N₂₀ com base na sequência do gene *ipdC*, e identificação dos potenciais “*off-target sites*” utilizando o *draft* de genoma da RZ2MS9 (MJB01000031.1) como referência. A sequência do genoma da linhagem RZ2MS9 foi submetida nas plataformas sobrescritas,

para inserção em suas respectivas bases de dados. Em seguida, após a inclusão dos dados do genoma, a sequência do gene *ipdC*, isoladamente, foi inserida nos mecanismos de buscas das respectivas plataformas contra a base de dados da sequência criada para o próprio genoma da linhagem, afim de gerar sequências N₂₀ de sítios únicos e eliminar *off-targets*.

A seleção das sequências obtidas nas plataformas para utilização na montagem do sgRNA, foi realizada com base nos seguintes critérios estabelecidos com base nas indicações das plataformas: conteúdo de GC próximo a 40% ou superior, escore de especificidade mais próximo de 100%, escore de out-off-frames $\geq 50\%$ e baixo número de sítios *off-targets*.

3.5. Construção dos plasmídeos da série pTarget_{ipdC}

Os plasmídeos da série pTarget_{ipdC} foram construídos a partir do plasmídeo pTargetF, sendo constituído da sequência de sgRNA, o promotor pJ23119, a sequência N₂₀ alvo no gene *ipdC*, o gene *aadA* resistente à espectinomicina, o replicon pMB1 e múltiplos sítios de restrição (JIANG et al., 2015).

Para a construção da série pTarget_{ipdC}, o pTargetF foi digerido com as enzimas *Bam*H1 e *Eco*R1 (NEB) em uma reação *double digest* contendo 1,5 µg do plasmídeo pTargetF, previamente extraído de *E. coli* linhagem DH5α, 1x do NEBuffer 3.1; 800 U mL⁻¹ da enzima *Eco*R1 e 600 U mL⁻¹ da enzima *Bam*H1 em um volume final de 50 µL, sendo a reação incubada em termobloco por 2 horas a 37°C. (Figura 8).

Em seguida, a reação foi parada por eletroforese do produto da digestão em gel de agarose a 1,2%, corado com SYBR[®] green (*Sigma-Aldrich*), e a banda de maior comprimento visualizada no gel foi então recortada e o DNA purificado usando o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* Kit, sendo posteriormente utilizado como vetor para a clonagem do sgRNA.

Os insertos utilizados na construção do pTarget_{ipdC} foram produzidos a partir da síntese de oligos com comprimento de 144 pb com a terminação 5' coesiva com *Bam*H1 e o terminal 3' coesivo com *Eco*R1, ambos contendo a sequência do promotor pJ23119, o sgRNA (fusão do trcrRNA:crRNA), e o N₂₀ alvo no gene *ipdC* no genoma do *Bacillus sp*. Esses insertos foram diluídos em tampão TE (1M de Tris HCl pH 8.0 e 0,5M de EDTA pH 8.0) em alíquotas de 100 µM, para posterior utilização na clonagem do pTarget_{ipdC}.

A reação de fosforilação dos insertos foi realizada com T4 polinucleotide Kinase (PNK) (NEB) em uma reação contendo 2 µM de cada oligo; 1x do tampão T4 ligase *Buffer* (NEB) e 200 U mL⁻¹ da enzima T4 PNK em um volume total de 50 µL. Em seguida, a reação foi incubada em termobloco a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 2,5 µL de solução de NaCl 1M a reação de fosforilação e novamente incubou-se a 95°C por 6 minutos para anelamento dos oligos. Posteriormente, as reações foram resfriadas por 2 horas à temperatura ambiente, e então foram purificadas com *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* Kit e diluídas 10x em H₂O deionizada estéril.

A ligação dos insertos ao vetor foi realizada por meio de reação de ligação contendo 1x do DNA Ligase Buffer (*Invitrogen*[®]); vetor e inserto em uma relação molar de 5:1 (100 ng do vetor para 7,4 ng de inserto); 0,005 U mL⁻¹ da enzima T4 DNA Ligase (*Invitrogen*[®]) em um volume final de 20 µL e então incubada *overnight* à 16°C. Após esse período, 10 µL da reação foram utilizados para eletroporação em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5α), sendo, em seguida, recuperadas por 1 hora de crescimento em agitador orbital (180 rpm). Após o crescimento, alíquotas de 100 µL das células recuperadas foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar acrescido do antibiótico espectinomicina (90 µg mL⁻¹).

Os transformantes contendo os plasmídeos da série pTarget_{ipdC} foram identificados por meio de PCR de colônia, utilizando-se *primers reverse*, complementares a cada sequência N₂₀, previamente selecionada das plataformas de análise, contida nos plasmídeos clonados, e um *primer forward* (5'-CTTAACGCTATGGAACTCGC-3') correspondente à região do gene de resistência à espectinomicina (*aadA*), contido no plasmídeo. A reação de PCR utilizando a colônia bacteriana continha 0,2 µM 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 µL⁻¹ da enzima Taq DNA polimerase (*Thermo scientific*[®]) em um volume final de 25 µL. Os ciclos no termociclador corresponderam a 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos; 62°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos) e 72°C por 7 minutos para extensão final. Os amplicons obtidos na reação foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com SYBR[®] green (*Sigma-Aldrich*).

Posteriormente, os clones identificados como positivos na PCR de colônia, tiveram o plasmídeo extraído usando o Kit *QIAprep Spin Miniprep* (*Qiagen*[®]) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração, amostras de 100 ng de cada plasmídeo foram misturados com 5 µM do *primer* MoClo-F (5'-AGCGAGGAAGCGGAAGAGCG-3') (<https://www.addgene.org>), e enviadas para confirmação por sequenciamento pelo método de Sanger no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP (<http://genoma.ib.usp.br/>). Os dados do sequenciamento foram convertidos em formato FASTA e analisados no *software* on-line *ClustalW2* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), comparando-se as sequências obtidas dos clones com as sequências dos insertos, pelo método *Pairwise Sequence Alignment* (PSA), por meio da ferramenta *Matcher*.

3.6. Construção e montagem do cassete de DNA doador

A construção do DNA doador que serviu como molde para a recombinação homóloga foi realizada com dois moldes de fragmentos das sequências *upstream* e *downstream* presentes na região do gene *ipdC*, excluindo-se a região central correspondente a aproximadamente 786 pb. Essas sequências foram obtidas a partir do *draft* do genoma do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 e depositadas no NCBI (*Nation Center for Biotechnology Information*) sob o número *GenBank*: MJB01000031.1, tendo sido utilizadas para o desenho dos respectivos *primers* com o programa *Oligo perfectTM Designer* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizadas na construção dos cassetes de DNA doador para o nocaute do gene *ipdC* no *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9

<i>Primers do cassete de DNA doador do gene ipdC</i>	
<i>Primers</i>	<i>Sequências 5' - 3'</i>
<i>ipdC Upstream forward (Up -f)</i>	AAGCTTTTGCTGACCGAATCTTTTC
<i>ipdC Upstream reverse (Up -r)</i>	TATGTATCGAGAACTGCCCGCTCTACTTGGA
<i>ipdC Downstream forward (Dn -f)</i>	TAGAGCGGGCAGTTTCTCGATACATATTGGAAGTGA
<i>ipdC Downstream reverse (Dn -r)</i>	AAGCTTGACTACACGAATTAGGAATTGAACA

Na primeira reação de PCR, correspondente ao primeiro *round* de construção do cassete, as regiões *Upstream* (*Up -f* e *Up -r*) e *Downstream* (*Dn -f* e *Dn -r*) do gene *ipdC*, foram amplificadas, separadamente, utilizando sequências dos *primers* modificados como descrito em Choi e Schweizer (2005) na seguinte reação, contendo: 0,2 µM de cada *primer*; 0,2 mM de cada dNTP's; 1x do tampão da enzima *Taq Buffer*; 3,5 mM de MgCl₂; 0,12 U µL da enzima *Taq DNA polimerase* (*Thermo scientific[®]*), 10 ng do DNA molde e H₂O deionizada estéril em um volume final de 50 µL. Os ciclos no termociclador corresponderam a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos (95°C por 30 segundos; 62°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos) seguido por 72°C por 7 minutos de extensão final. Após a reação, os amplicons visualizados em gel de agarose a 1,2%, corado com SYBR[®]*green* (*Sigma-Aldrich*), apresentaram um fragmento de aproximadamente 450 pb.

Na segunda reação de PCR, que compreende a etapa de montagem do cassete doador do gene *ipdC*, 50 ng do produto de PCR das regiões *upstream* e *downstream*, amplificados no primeiro *round*, foram utilizados como molde em uma nova reação com as mesmas condições de componentes e programa de termociclagem do respectivo *round*. Porém, nessa etapa da montagem, as reações foram submetidas aos três primeiros ciclos da termociclagem sem a adição de *primers*. Após a conclusão desse ciclo inicial, a reação foi pausada e os *primers Up forward* e *Dn reverse* foram inseridos na reação. Em seguida, a reação foi retomada até a conclusão do programa completo da PCR, como descrito anteriormente para o primeiro *round*. Os amplicons obtidos, contendo um produto de PCR de aproximadamente 900 pb, foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com

SYBR[®] *green* (Sigma-Aldrich). Em seguida, as bandas contendo fragmento foram excisadas do gel e purificadas utilizando *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*.

Posteriormente, amostras de 40 ng do cassete, foram misturados com 5 μ M do *primer ipdC Up f* (5'-AAGCTTTTGCTGACCGAATCTTTTCC-3') e enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (<http://genoma.ib.usp.br/>). A confirmação da região deletada na construção do cassete foi realizada por meio do *software* BLAST, utilizando a ferramenta *Blastx* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov), comparando a sequência do cassete contra a sequência do gene *ipdC* do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9. Para facilitar a visualização do alinhamento das sequências pelo BLAST, os dados foram inseridos no *software* on-line Kablammo (www.kablammo.wasmuthlab.org).

3.7. Nocaute do gene *ipdC* com a técnica de CRISPR-Cas9

O nocaute do gene *ipdC* no genoma da linhagem RZ2MS9 com sistema CRISPR-Cas9 foi realizado em dois tratamentos, consistindo dos seguintes: linhagem RZ2MS9 transformada com pCas + pTarget_{*ipdC-1*} + cassete doador; linhagem RZ2MS9 transformada com o pCas + pTarget_{*ipdC-1*} sem o cassete doador.

A linhagem RZ2MS9-pCas foi crescida em meio LB contendo o antibiótico sulfato de canamicina 100 μ g mL⁻¹ e acrescido ou não de L-arabinose (concentração final de 10 mM) para indução dos genes do complexo λ -Red, facilitando a recombinação do cassete doador. A partir de então, células eletrocompetentes da linhagem RZ2MS9-pCas, foram transformadas com 300 ng do pTarget_{*ipdC-1*} carregando o sgRNA com o N₂₀ alvo no gene *ipdC*, que foi eletroporado junto com 600 ng do cassete de DNA doador (*dsDNA* ~ 900 pb), previamente construído com as extremidades homólogas a cada região (*upstream* ou *downstream*) do gene *ipdC*. A eletroporação foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.2. Para o tratamento onde não foi fornecido o DNA doador todas as etapas da transformação foram realizadas sem a adição de L-arabinose no meio de cultura.

Após a eletroporação, as células foram recuperadas por 1 horas antes de serem inoculadas em meio LB-ágar contendo canamicina (100 μ g mL⁻¹) e espectinomicina (500 μ g mL⁻¹), com ou sem a adição de L-arabinose (concentração final de 10mM) e em seguida incubadas *overnight* a 28°C. Após o crescimento, colônias isoladas dos transformantes, foram crescidas em 10 mL de meio LB líquido por 24 horas a 28°C em agitador orbital (180 rpm). Logo após, as culturas foram centrifugadas, 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 utilizado como template na reação de PCR para detecção dos mutantes Δ *ipdC*, consistindo dos seguintes componentes: 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 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 a 94°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos (95°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para a reação controle da PCR o DNA molde foi substituído por H₂O deionizada estéril.

Os amplicons foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, e posteriormente as bandas foram excisadas do gel e purificadas com o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*. Alíquotas de 40 ng dos amplicons purificados foram misturadas com 5 µM do *primer* de construção do cassete doador *ipdC Up f* (5'-AAGCTTTTGCTGACCGAATCTTTTCC-3') e enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo. Os dados do sequenciamento foram analisados no *software* on-line *Clustal Omega* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) e a confirmação dos mutantes foi feita alinhando-se as sequências obtidas dos amplicons à sequência do cassete doador e do gene *ipdC* da linhagem RZ2MS9, pelo método *Multiple Sequence Alignment* (MSA).

Para a cura dos plasmídeos, a linhagem RZ2MS9 $\Delta ipdC$ contendo as séries pCas e pTarget_{*ipdC*}, foi inicialmente repicada em placas contendo meio LB-ágar acrescido do antibiótico canamicina (100 µg mL⁻¹) e incubadas por 24 horas a 28°C. Após esse período, colônias isoladas da linhagem mutante foram inoculadas em 2 mL de meio LB contendo canamicina (100 µg mL⁻¹) e IPTG (Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosídeo) (concentração final de 10 mM) e, novamente, incubadas por 48 horas a 28°C em agitador orbital (180 rpm) sendo em seguida diluídas até 1.10⁻⁶ e espalhadas separadamente em placas contendo meio LB-ágar com espectinomicina (500 µg mL⁻¹) e canamicina (100 µg mL⁻¹) separadamente. A cura do pTarget_{*ipdC-1*} foi verificada através da determinação de sua sensibilidade a espectinomicina (500 µg mL⁻¹). A cura do pCas foi realizada por crescimento das linhagens a 37°C por 48 horas em meio LB sem adição de antibiótico e confirmada pela sensibilidade a canamicina (100 µg mL⁻¹).

3.8. Avaliação da biossíntese do AIA dependente do L-triptofano

As linhagens RZ2MS9 WT e $\Delta ipdC-1$ utilizadas para avaliação da biossíntese de ácido indol acético foram previamente crescidas em placas com meio de cultura LB-ágar por 24 horas a 28°C para obtenção de colônias isoladas. As colônias crescidas foram transferidas para tubos contendo 5 mL meio LB líquido com e sem adição do aminoácido L-triptofano (concentração final de 5 mM) e incubadas a 28°C em agitador orbital (180 rpm) na ausência de luz. A biossíntese do AIA foi avaliada nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.) de acordo com o método descrito por Brick et al. (1991) com algumas modificações.

A cada 24 h.a.i., 2 mL do meio de cultura, apresentando crescimento bacteriano, foram extraídos e transferidos para centrifugação a 15.000 g por 15 minutos em microtubos de 2 mL sendo posteriormente retirada uma alíquota de 1,4 mL do sobrenadante do centrifugado, que foi transferido novamente, para microtubos contendo 0,6 mL do reagente de *Salkowski* (2% de FeCl₃ 0,5M em 35% de ácido perclórico). As amostras acrescidas com o reagente foram incubadas a 28°C por 30 minutos, em

ambiente ausente de luz, para reação dos compostos indólicos presentes no sobrenadante do centrifugado da cultura das células com os sais férricos presentes no reagente, ocasionando o desenvolvimento de coloração rósea com variações de intensidade de acordo com as concentrações do AIA.

A intensidade da cor apresentada na reação dos compostos indólicos com o reagente de *Salkowsky* foi quantificada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de $\lambda=530\text{nm}$ e as concentrações de AIA estimadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de ácido indol acético 0, 25; 50; 100; 150; 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*Sigma-Aldrich*) em meio de cultura não inoculado, com a adição de L-triptofano 5 mM. Os experimentos foram realizados em triplicata e o meio de cultura LB acrescido de L-triptofano e sem crescimento bacteriano foi utilizado como *standard* nas leituras espectrofotométricas.

3.9. Análise estatística

Os dados gerados nos experimentos de transformação com o plasmídeo pCas, nocaute do gene *ipdC* com a técnica de CRISPR-Cas9 e biossíntese do AIA dependente de L-triptofano foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com comparação das médias dos tratamentos pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$). Já os dados da curva de crescimento das linhagens transformada com pCas e selvagem foram submetidos à análise de correlação. Ambos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2014).

4. RESULTADOS

4.1. Eficiência da transformação do *Bacillus sp.* com o plasmídeo pCas

A transformação do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 com o plasmídeo pCas contendo o gene da endonuclease Cas9 foi eficiente, entretanto foram observadas diferenças quanto à sua eficiência de acordo com a concentração de plasmídeos utilizada na eletroporação das células bacterianas. Observou-se que na concentração de 30 ng do plasmídeo, um maior número de transformantes por μg de DNA plasmidial foi obtido, $6,43 \cdot 10^4$ transformantes por μg de DNA^{-1} , enquanto que na concentração de 100 ng do plasmídeo o número de transformantes foi $1,90 \cdot 10^4$ por μg de DNA^{-1} (Figura 9).

Figura 9. Eficiência de transformação do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 com o plasmídeo pCas nas concentrações de 30 ng e 100 ng. As médias do número de transformantes diferem entre as concentrações do plasmídeo pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2. Detecção dos transformantes com o pCas e curva de crescimento

Os produtos da PCR, plasmídeos extraídos da linhagem RZ2MS9 e o controle positivo apresentaram um fragmento de amplificação com tamanho aproximado de 600 pb, não houve amplificação do controle negativo (Figura 10). Esse tamanho de fragmento, visualizado na eletroforese, consiste do comprimento esperado para amplificação com os *primers* desenhados a partir da sequência do gene da Cas9 contido no plasmídeo pCas, confirmando sua presença nas linhagens transformadas.

Figura 10. Perfil eletroforético da PCR de detecção dos transformantes com plasmídeo pCas contendo o gene da endonuclease Cas9. Da esquerda para a direita: Marcador molecular 1kb *ladder* (Sinapse®); 1. DNA genômico da linhagem RZ2MS9; 2. Plasmídeo pCas; 3. Plasmídeo extraído da linhagem RZ2MS9; 4. Produto PCR sem DNA.

Após a confirmação da inserção do plasmídeo pCas nas células bacterianas, a linhagem RZ2MS9-pCas foi avaliada quanto à cinética do seu crescimento em relação à linhagem selvagem, no meio de cultura LB líquido com e sem a adição do antibiótico sulfato de canamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo observado algumas diferenças nas fases de crescimento em comparação com a linhagem selvagem (Figura 11). Quando comparadas em relação ao crescimento em meio de cultura LB não seletivo, ou seja, sem a adição do antibiótico canamicina, as linhagens RZ2MS9-pCas e WT apresentam diferença no tempo de crescimento, com um retardo inicial de aproximadamente 2 horas da linhagem transformada com o pCas em relação à linhagem selvagem, na etapa do crescimento bacteriano que compreende o início da fase *lag*. No entanto, é possível observar uma menor diferença entre o crescimento das linhagens em 4 horas após a incubação.

Figura 11. Curva de crescimento das linhagens RZ2MS9 WT e RZ2MS9 transformada com plasmídeo pCas9 em meio de cultura LB (Lúria Bertani) seletivo, acrescido do antibiótico sulfato de canamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e não seletivo.

O tempo total decorrido para alcance da fase estacionária do crescimento pelas linhagens, compreendendo desde o início do crescimento, passando pela fase *lag* e pela fase exponencial, foi de aproximadamente 12 horas, após esse tempo a densidade ótica aferida passou a apresentar valores constantes até o período final das leituras em 48 horas de crescimento. A linhagem RZ2MS9 - pCas em meio com e sem antibiótico em relação à linhagem selvagem apresentou alto coeficiente de correlação em relação à curva de crescimento bacteriano, $R^2 = 0,977$ e $R^2 = 0,897$ respectivamente (Figura 12).

Figura 12. Correlação do crescimento das linhagens RZ2MS9-pCas e RZ2MS9-WT. Correlação do crescimento entre as linhagens em meio de cultura LB não seletivo (A). Correlação do crescimento da linhagem RZ2MS9-pCas em meio de cultura LB seletivo, acrescido de sulfato de canamicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com a linhagem RZ2MS9-WT crescida em meio de cultura LB não seletivo (B). As linhagens apresentam uma forte correlação positiva no crescimento em ambos os meios.

4.3. Sequências N_{20} para o sgRNA dos plasmídeos Target^{*ipdC*}

Um total de 115 sequências N_{20} foi gerado nas 3 plataformas (CHOP CHOP, CRISPOR e RGEN Tools), dentre as quais apenas 3 sequências N_{20} aparecem individualmente nas plataformas de análise, sendo 1 sequência na CHOP CHOP e 2 na CRISPOR. As demais sequências geradas aparecem em comum entre 2 ou entre as 3 plataformas, tendo sido obtidas 78 sequências de N_{20} em comum entre as plataformas CHOP CHOP e CRISPOR, 2 sequências entre RGEN e CRISPOR e 32 sequências entre as 3 plataformas (Figura 13). Essas sequências apresentaram variações em relação aos sítios de localização dentro do gene *ipdC* e quanto ao sentido da dupla fita do DNA, tendo sido obtidas sequências tanto no sentido 5'-3' quanto no sentido 3'-5'.

Figura 13. Diagrama de Venn, apresentando o número de sgRNAs gerados nas plataformas RGEN Tools Cas-Offinder ver. 2.4 (A), CHOP CHOP (B) e CRISPOR ver. 4.2 (C), os números dentro dos círculos correspondem ao total de sequências N_{20} geradas pela plataforma e as intersecções entre os círculos são referentes ao número de sequências em comum entre as plataformas.

As sequências N_{20} obtidas a partir do gene *ipdC* nas 3 plataformas de análise apresentam-se com diferentes teores de GC, sítios *off target*, escores de especificidade e *out-off-frames*. Desta forma, as sequências foram selecionadas de acordo com critérios pré-estabelecidos para cada um dos fatores descritos visando a seleção dos N_{20} com maior eficiência. Assim, as sequências geradas foram ranqueadas, selecionando-se apenas uma sequência de cada plataforma para montagem no sgRNA que compõe os plasmídeos pTarget_{ipdC}. Entre as sequências selecionadas, duas aparecem em comum entre as plataformas CRISPOR e CHOP CHOP e uma em comum com as 3 plataformas. (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências N_{20} com alvo no gene *ipdC* da linhagem RZ2MS9, geradas pelas plataformas de bioinformática RGEN Tools Cas-Offinder ver. 2.4, CRISPOR ver. 4.2 e CHOP CHOP.

Sequências	PAM	Eficiência %	Sentido	Plataforma	GC%	Out-off-frame %	Off-targets
**ATACGGTCCAGTTGTAATGC	AGG	84.1	←	RGEN Tools	45.0	66.9	0
*GGATTGAACCTTCAGTAAA	AGG	46.0	→	CHOP CHOP	39.0	NI	0
*CCCATACTGAACGTCGCGAT	GGG	68.0	→	CRISPOR	NI	68.0	0

NI- Conteúdo não informado pela plataforma, automaticamente calculado para o ranking de sequência N_{20} gerada; Seta para a direita corresponde a fita 5'-3'; Seta para a esquerda corresponde a fita 3'-5'; **Sequências em comum entre 3 as plataformas. *Sequência em comum entre 2 plataformas.

4.4. Construção dos plasmídeos da série pTarget_{ipdC} e do cassete doador

A série pTarget_{ipdC} que contém as sequências N₂₀, selecionadas das plataformas de bioinformática RGEN Tools (1) e CRISPOR (2), foi clonada com êxito, enquanto o plasmídeo com o sgRNA do N₂₀ selecionado na plataforma CHOP CHOP não foi obtido. A confirmação da clonagem foi feita a partir do sequenciamento da região contendo o sgRNA com a sequência N₂₀, de modo que os dados do sequenciamento foram alinhados na ferramenta *Match* do programa *ClustalW* com as sequências dos respectivos oligos contendo o N₂₀ no sgRNA, (Figura 14A e B).

Figura 14. Confirmação da clonagem do inserto contendo o sgRNA nos plasmídeos da série Target_{ipdC}. As sequências dos clones foram alinhadas com a sequência N₂₀ dos oligonucleotídeos que compõem o sgRNA. As linhas coloridas correspondem à detecção da base no sequenciamento e os traços verticais correspondem ao alinhamento entre as sequências. (A) N₂₀. 1 Target_{ipdC-1}; (B) N₂₀. 2 Target_{ipdC-2}.

Em relação ao DNA doador, cada uma das regiões amplificadas separadamente apresentou produtos de PCR com tamanho aproximado de 450 pb (Figura 15A). Já no segundo *round* da reação, os amplicons do primeiro *round*, unidos em única reação, foram recombinados em 3 ciclos de reação sem *primers*, sendo, a partir do terceiro ciclo, inseridos os *primers* correspondentes ao *foward* da região *Up* e *reverse* da região *Dw*. Essa reação amplifica a sequência formada no ciclo de recombinação, gerando então o cassete doador para o nocaute com uma sequência correspondente a do gene *ipdC* do *Bacillus sp.* aproximadamente 900 pb. O cassete obtido com a reação *overlap* foi confirmado quanto à similaridade com a sequência do gene *ipdC* do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 (Figura 15B).

Figura 15. Gel de agarose (1,2%) com os amplicons obtidos no primeiro e segundo round da *overlap* PCR (A). Amplicon da região *upstream* do gene *ipdC* (1). Amplicon da região *Downstream* (2). Cassete doador do respectivo gene, obtido a partir da recombinação e amplificação dos produtos do primeiro round da reação *overlap* (3). Alinhamento da sequência do cassete com a do gene realizada no programa BLAST. As linhas horizontais indicam o número de bases similares, entre o gene *ipdC* do *Bacillus* sp. (RZ2MS9) (linha superior) e as sequências do cassete de DNA doador (linha inferior). O gráfico de visualização foi gerado no software on-line *Kablammo* (B).

4.5. Nocaute do gene *ipdC* com a técnica de CRISPR-Cas9 e identificação das linhagens mutantes

O nocaute do gene *ipdC* no genoma da linhagem RZ2MS9 com sistema CRISPR-Cas9 foi realizado a partir do sistema de plasmídeos duplos, separando-se a enzima Cas9 do sgRNA. O DNA doador que serviu como molde para recombinação homóloga nessa técnica de CRISPR-Cas9 também foi fornecido separadamente no momento da eletroporação das células da linhagem RZ2MS9-pCas com o plasmídeo pTarget_{*ipdC*}-1.

Entre os tratamentos empregados para avaliar a eficiência do sistema CRISPR-Cas9 na geração de mutantes nocautes para o gene *ipdC* da linhagem RZ2MS9, todos apresentaram transformantes que cresceram em placas contendo o antibiótico sulfato de canamicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e espectinomicina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, a eficiência de mutação foi variável nos transformantes que continham o DNA doador e naqueles cuja sequência não foi fornecida no momento da eletroporação das células, com as médias diferindo pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$) (Figura 16).

No tratamento contendo o pCas e o pTarget_{*ipdC*}-1 mas sem presença do DNA doador, o número de transformantes foi consideravelmente inferior aos obtidos na linhagem onde sistema foi utilizado por completo (pCas - pTarget_{*ipdC*}-1 - cassete doador).

Ressalta-se que no tratamento contendo o cassete de DNA doador, o plasmídeo pCas foi ativado para expressão dos genes λ -red, por meio do crescimento, previa e posteriormente ao nocaute, em meio

de cultura acrescido de L-arabinose (10 mM concentração final), para auxiliar na recombinação homóloga do cassete doador. Na linhagem em que não foi oferecido o cassete doador, o reparo da quebra da dupla fita ocasionando pela endonuclease Cas9 foi, provavelmente, ocasionado por mecanismos endógenos de recombinação não-homóloga das células.

Figura 16. Eficiência do nocaute do gene *ipdC* no genoma do *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 com a técnica de CRISPR-Cas9. O número de transformantes por $\mu\text{g de DNA}^{-1}$ foi calculado considerando as concentrações do plasmídeo pTarget_{ipdC-1} e do cassete doador aplicadas na transformação, sendo estas 300 ng e 600 ng, respectivamente. Os tratamentos diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Após 24 horas de crescimento na nova placa, 4 linhagens transformantes com o sistema completo (pCas+pTarget_{ipdC-1}+ DNA doador) foram selecionadas para confirmação do nocaute por PCR, realizada a partir da extração e utilização do DNA genômico como template para a reação com os primers *Up foward* e *Dw reverse*, empregados na construção do cassete doador. Dentre as 4 linhagens selecionadas, todas apresentaram diferenças quanto ao comprimento dos amplicons obtidos na reação PCR, em comparação com a linhagem selvagem, indicando o nocaute do gene do gene *ipdC* (Figura 17A). Diferenças nos perfis dos amplicons dos mutantes entre si também foram constatadas. A linhagem $\Delta ipdC-1$ apresentou uma pequena diferença no comprimento do amplicon em relação às linhagens $\Delta ipdC-3$ e $\Delta ipdC-4$ e uma diferença um pouco maior em relação à linhagem $\Delta ipdC-2$, do mesmo modo, desta última para com as linhagens $\Delta ipdC-3$ e 4.

Dentre as linhagens mutantes que apresentaram diferença no perfil de bandas em relação à linhagem selvagem, a linhagem $\Delta ipdC-1$ foi selecionada para o sequenciamento e confirmação da inserção do cassete de DNA doador. Os dados do resultado do sequenciamento do amplicon da respectiva linhagem foram alinhados com a sequência do cassete de DNA doador e do gene *ipdC*, sendo observada similaridade entre as sequências (Figura 17B). Deste modo, confirmando a mutação no gene *ipdC*, promovida pela técnica de CRISPR-Cas9.

Figura 17. Perfil eletroforético dos amplicons gerados na PCR de detecção dos mutantes nocaute para o gene *ipdC* no *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9, em gel de agarose (1.2%) corado com SYBR[®] green (Sigma-Aldrich). 1, 2, 3 e 4 correspondem às bandas dos respectivos mutantes Δ ipdC-1, 2, 3 e 4; WT corresponde ao amplicom da linhagem RZ2MS9 selvagem (A). Alinhamento entre as sequências do gene *ipdC* na linhagem WT, do DNA doador e do amplicon da linhagem RZ2MS9 Δ ipdC-1. Preto indica bases idênticas entre as 3 sequências; Cinza indica bases idênticas entre a linhagem WT e o DNA doador; Azul indica as bases idênticas entre o DNA doador e a linhagem Δ ipdC-1; Verde indica as bases idênticas entre a linhagem WT e a Δ ipdC-1, as sequências incolores não apresentam identidade (B).

A cura do plasmídeo pTarget_{ipdC-1} no *Bacillus sp.* $\Delta ipdC$ -1 foi realizada crescendo-se a linhagem em 2 mL⁻¹ de meio de cultura LB líquido acrescido do antibiótico sulfato de canamicina (100 µg mL⁻¹) e de IPTG por um período de 48h a 28°C e 180rpm. O plasmídeo pCas possui em sua sequência um sgRNA ativado pelo promotor *P_{trc}* com alvo na sequência do promotor pMB1 do plasmídeo pTarget_{ipdC}, ocasionando a destruição desse plasmídeo pela endonuclease Cas9. Deste modo as linhagens não apresentaram crescimento na placa contendo o antibiótico espectinomicina (500 µg mL⁻¹).

Após a cura do plasmídeo pTarget_{ipdC-1}, a linhagem $\Delta ipdC$ -1 - pCas, foi novamente crescida em meio LB líquido, por um período de 48h a 37°C e 180rpm. O plasmídeo pCas possui um replicon rico em Timina e Adenina, que com o aumento da temperatura ocasiona o seu desmembramento e destruição. A linhagem $\Delta ipdC$ -1 curada do pCas não apresentou crescimento na presença do antibiótico sulfato de canamicina.

A execução experimental do nocaute até a obtenção dos mutantes do gene *ipdC* no *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 com a técnica de CRISPR-Cas9 no sistema de plasmídeos duplos, foi dividida em 3 etapas principais sendo elas: Preparação, Nocaute do gene *ipdC*, e Obtenção de mutantes, compreendendo, desta forma, as etapas de transformação com o plasmídeo pCas e construção do plasmídeo pTarget_{ipdC} e do cassete doador, nocaute com sistema CRISPR-Cas9, confirmação das linhagens mutantes e cura dos plasmídeos, respectivamente. O tempo total requerido para realização de todas as etapas foi de aproximadamente 22 dias, com o número de dias necessários para realização de cada etapa sendo variável (Tabela 3). Contudo, ressalta-se que no tempo total não foi incluído o sequenciamento das amostras, uma vez que esse procedimento foi terceirizado em todas as etapas do processo.

Tabela 3. Tempo requerido para obtenção de mutantes nocautes para o gene *ipdC* no *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 com a técnica de CRISPR-Cas9 no sistema de plasmídeos duplos.

Etapas	Experimentos	Tempo de execução
PREPARAÇÃO	Produção das células eletrocompetentes	02 dias
	Transformação com o plasmídeo pCas	01 dia
	Construção do plasmídeo pTarget _{ipdC-1} (sgRNA)	03 dias
	Construção do cassete de DNA doador	02 dias
NOCAUTE	Produção das células eletrocompetentes	02 dias
	Transformação com o pTarget _{ipdC-1} + DNA doador	01 dia
	Crescimento das linhagens nocauteadas	01 dia
OBTENÇÃO DOS MUTANTES	Replicagem e crescimento das colônias dos mutantes	01 dia
	Extração de DNA genômico dos mutantes	02 dias
	Identificação dos mutantes por PCR	01 dia
	Cura dos plasmídeos pCas e pTarget _{ipdC-1}	06 dias

4.6. Avaliação da biossíntese do AIA nas linhagens RZ2MS9-WT e $\Delta ipdC$

A biossíntese do ácido indol acético (AIA) via L-triptofano dependente foi avaliada nas linhagens RZ2MS9-WT e nocaute para o gene *ipdC* ($\Delta ipdC$) nos períodos correspondentes a 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i). As concentrações do fitormônio sintetizadas nos diferentes tempos avaliados diferiram entre as linhagens selvagem e $\Delta ipdC$ nos tempos avaliados (Figura 18).

Figura 18. Biossíntese do ácido indol acético (AIA) via L-triptofano dependente pelas linhagens selvagem (WT) e nocaute para o gene *ipdC* ($\Delta ipdC$) em 24, 48 e 72 horas de crescimento. A biossíntese do fitormônio difere entre as linhagens de acordo com o tempo de crescimento. Colunas com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)).

Em 24 h.a.i., a síntese do AIA pela linhagem RZ2MS9 $\Delta ipdC$ -1 foi reduzida em 87,96%, em comparação à linhagem selvagem. As concentrações do AIA observadas foram de 5,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$, na linhagem selvagem e na linhagem $\Delta ipdC$, respectivamente. Já 48 h.a. i, a redução da síntese do AIA pela linhagem $\Delta ipdC$, em comparação à linhagem selvagem, foi de 88,25%, sendo as concentrações do AIA de 11,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sintetizado pela linhagem selvagem e 1,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pela

linhagem $\Delta ipdC$ -1 Em ambos os tempos de crescimento, 24 h.a.i. e 48 h.a.i., a biossíntese do AIA na linhagem $\Delta ipdC$ -1 não diferiu estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Em 72 h.a.i. a redução da biossíntese do AIA pela linhagem $\Delta ipdC$ -1 foi de 58,27 % em relação à linhagem selvagem. A produção do AIA pela linhagem selvagem nesse tempo de crescimento foi de $12,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto que na linhagem $\Delta ipdC$ a síntese do fitormônio correspondeu a $5,02 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ressalta-se também que em 72 h.a.i., a síntese do AIA pela linhagem RZ2MS9 nocaute para o gene *ipdC* não difere estatisticamente da síntese do fitormônio observada na linhagem selvagem em 24 h.a.i. do crescimento pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Outrossim, pode-se constatar que a biossíntese do AIA dependente do L-triptofano pelas linhagens selvagem e $\Delta ipdC$, passou a aumentar com o tempo de crescimento, embora na linhagem $\Delta ipdC$, as concentrações detectadas tenham sido inferiores em comparação com a linhagem selvagem. Além disso, a biossíntese do AIA na ausência do aminoácido L-triptofano também foi avaliada, não sendo observada síntese do fitormônio em nenhum dos tempos de crescimento, tanto na linhagem selvagem, quanto na linhagem $\Delta ipdC$.

5. DISCUSSÃO

A genética reversa, por meio de inúmeras técnicas moleculares, tem revolucionado a forma como entendemos o funcionamento e a importância dos genes. Uma das principais aplicações dessa abordagem consiste na geração de organismos nocauteados geneticamente para entender o papel dos genes na regulação de processos nos organismos (SANDER E JOUNG, 2014; SHAH et al., 2015; BOETTCHER E MCMANUS, 2015). No presente estudo, a técnica empregada para compreender a função do gene *ipdC*, na biossíntese do ácido indol acético (AIA) via dependente do L-triptofano pela rizobactéria promotora do crescimento em plantas (RPCP) *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 foi a técnica de CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ou repetições palindrômicas curtas regularmente interespçadas.

Essa técnica, em comparação a outras ferramentas moleculares como “nucleases dedo de zinco” ZFN’s e ativador de transcrição de nucleases efetoras (TALE), oferece uma versatilidade sem precedentes para manipulação de genomas, requerendo apenas a construção de uma matriz CRISPR e um sgRNA com alvo em um sítio específico, precedido por uma sequência PAM (COBB et al., 2015).

No gene *ipdC* da linhagem RZ2MS9, uma vasta gama de sequências PAM (NGG) foi detectada gerando um total de 115 sequências N₂₀ com possibilidade de direcionamento do sistema CRISPR-Cas9 para diferentes sítios de clivagem no respectivo gene da linhagem.

Contudo, apenas duas sequências desse total, individualmente, foram clonadas nos plasmídeos pTarget_{*ipdC*} que expressam o sgRNA contendo a sequência alvo no referido gene, sendo apenas uma sequência N₂₀, suficiente para promover a quebra na dupla fita do DNA, uma vez que o sistema CRISPR-Cas9 é tido como de alta especificidade (JIANG E DOUDNA, 2017). Segundo Pliatsika e Rigoutsos (2015) a capacidade do sgRNA em direcionar com precisão a região alvo no DNA evitando a ocorrência de “*off-targets sites*” é de suma importância, uma vez que o N₂₀, contido no sgRNA, é indispensável para que a interação com a sequência alvo possa ocorrer de maneira precisa. Deste modo, essas sequências foram previamente selecionadas por algoritmos nas plataformas de bioinformática, que promoveram uma busca completa no *draft* do genoma da linhagem RZ2MS9, garantindo a unicidade e especificidade de cada sequência gerada.

O sistema CRISPR-Cas9 tem sido amplamente empregado de maneira exitosa na modificação de genomas de diferentes organismos devido a sua baixa complexidade e eficiência (CONG et al., 2013; HWANG et al., 2013; YU et al., 2013; ZHENG et al., 2014; PLATT et al., 2014 ABLAIN et al., 2015; KHATODIA et al., 2016; LIU et al., 2017; SHEN et al., 2017; TONG et al., 2018).

Em bactérias, essa técnica tem sido aplicada por meio da inserção de plasmídeos, contendo os principais elementos que a compõe, sendo estes: a endonuclease Cas9 e o tracrRNA:crRNA, inseridos separadamente ou fusionados em um único RNA guia, o sgRNA. Esses dois elementos principais formam o complexo responsável por promover a quebra na dupla fita do DNA em uma região específica

para a qual o complexo é direcionado pela sequência N₂₀ contida no sgRNA, que, por sua vez, é complementar à sequência alvo no genoma (JINEK et al., 2012). A eficiência da técnica de CRISPR-Cas9 na geração de mutantes é dependente, além da quebra da dupla fita, de uma sequência de DNA doador que serve como *template* para a recombinação homóloga e inserção da sequência contendo a mutação de interesse (JIANG et al., 2015).

Na linhagem RZ2MS9, a técnica de CRISPR-Cas9 foi executada segundo o método proposto por Jiang et. (2015), utilizando um sistema de plasmídeos duplos, onde a endonuclease Cas9 de *S. pyogenes* (sistema CRISPR-Cas9 do tipo II) e o sgRNA produzido a partir da fusão do trcrRNA com o crRNA foram separados nos plasmídeos pCas e pTarget_{ipdC}, este último obtido a partir do plasmídeo pTargeF. Além de um cassete de DNA doador com aproximadamente 900 pb, obtido por meio de *overlap* PCR das regiões *upstream* e *downstream* do gene *ipdC* contido no genoma da respectiva linhagem. Ambos plasmídeos foram construídos com o objetivo de facilitar a geração de mutantes em único gene ou em vários genes em multiplex ou edição contínua.

O número de transformantes obtidos no nocaute do gene *ipdC* na linhagem RZ2MS9 com a técnica de CRISPR-Cas9 foi da ordem de 1.10^4 nas linhagens em que o cassete doador foi inserido e o sistema de recombinação λ -Red contido no plasmídeo pCas, foi ativado por meio da indução do promotor P_{arab} em função da adição de L-arabinose no meio de cultura cujo a linhagem RZ2MS9 fora crescida antes e durante a execução do nocaute. O sistema do vírus bacteriófago λ Red inclui os genes *Gam*, *Beta* e *Exo* de recombinação de fagos. A função do Gam é evitar que nucleases das próprias bactérias possam degradar os fragmentos de DNA doador, permitindo sua preservação. O produto do gene Beta, por sua vez, é uma proteína que liga-se ao DNA fita simples promovendo o anelamento de duas moléculas de DNA complementares. Já o produto do gene *Exo* consiste de uma exonuclease que atua no sentido 5' - 3' do DNA. Juntas, essas proteínas inserem o DNA doador no alvo desejado, criando recombinantes genéticos e aumentando a eficiência na geração de mutantes (SHARAN et al., 2009).

A eficiência do sistema CRISPR-Cas9 na geração de linhagens mutantes tem sido descrita em diferentes espécies de bactérias, utilizando a associação de mecanismos exógenos e endógenos de reparo na dupla fita do DNA, bem como de recombinação de sequências de DNA doador de diferentes comprimentos. Jiang et al. (2015) demonstraram que a utilização do sistema CRISPR-Cas9, atrelado ao mecanismo de recombinação λ Red contido no plasmídeo pCas, promoveu um aumento no número de mutantes de *E. coli* linhagem MG1655 e *Tatumella citrea* linhagem DSM 13699, tendo observado que a ativação desse mecanismo possibilitou a recombinação de sequências de DNA doador com comprimento ≥ 40 pb, constatando, também, que a medida em que o comprimento do DNA doador foi aumentado, a eficiência da mutação cresceu conjuntamente.

Similarmente, So et al. (2017) demonstraram que a eficiência de mutação em *Bacillus subtilis* com sistema CRISPR-Cas9, em plasmídeos duplos, com o sgRNA e a endonuclease Cas9 separados, diminui substancialmente à medida em que o comprimento do DNA doador diminui, indicando também que o DNA doador, nesse gênero de *Bacillus*, deve ter um comprimento superior a 400 pb para manter

a alta eficiência de mutação usando CRISPR-Cas9 associado com mecanismos de recombinação homóloga. No entanto, esses autores utilizaram a própria maquinaria endógena de recombinação do *B. subtilis*.

Outrossim, na linhagem RZ2MS9, cujo o doador não foi oferecido e os genes do complexo λ -Red não foram ativados, observou-se uma redução de 64,08% no número de transformantes, evidenciando que o sistema de reparo endógeno da linhagem RZ2MS9 também pode atuar na quebra da dupla fita DNA promovida pela endonuclease Cas9, reparando-a, embora de maneira menos eficiente em comparação com o complexo λ -Red. Desta forma, sugerindo a existência de um mecanismo de reparo por recombinação não-homóloga ainda não explorado no genoma do *Bacillus sp.* Todavia, embora tenha-se observado esse fenômeno, a identificação desses mutantes não foi possível devido a não inserção do cassete de DNA doador, o que dificulta a seleção e detecção por reação PCR.

O sistema CRISPR-Cas9 tem demonstrado ser uma técnica de rápida execução em comparação a outros métodos de engenharia de genomas (CHOI E LEE, 2016). O tempo total demandado para obtenção das células bacterianas com as modificações de interesse no DNA da linhagem RZ2MS9 foi de aproximadamente 22 dias, excluindo-se as etapas que demandaram sequenciamento. Entre as principais etapas requeridas para realização do nocaute com técnica de CRISPR-Cas9, duas se destacam pelo tempo de execução, sendo elas a construção do plasmídeo contendo sgRNA (Preparação) e a cura dos plasmídeos (Obtenção dos mutantes).

Zhang et al. (2016) também avaliaram o tempo necessário para a geração de mutantes com sistema CRISPR-Cas9, de um único plasmídeo, em *Bacillus subtilis*, onde em comparação com outras técnicas de edição de genomas como Marcadores de contra seleção, Plasmídeos suicidas e Cre/LoxP, com o sistema CRISPR-Cas9, observaram que este último apresenta o menor tempo de execução, tendo estabelecido o período total de 12,5 dias para geração dos mutantes nessa bactéria. Contudo, diferentemente do presente estudo, o tempo de cura dos plasmídeos descrito por esses autores, é de 2 dias, enquanto no sistema utilizado neste experimento foi de 6 dias, sendo 3 dias para a cura do pCas e 3 dias para a cura do pTarget_{ipdC}, o que contribui para necessidade de um período maior de execução da técnica de CRISPR-Cas9 com sistema de plasmídeos duplos na linhagem RZ2MS9.

O gene *ipdC* codifica uma enzima-chave para geração do ácido indol acético, na via IPyA em bactérias promotoras do crescimento em plantas, a enzima indol piruvato descarboxilase (IPDC), cuja função é a descarboxilação do ácido indol pirúvico (IPyA), convertendo-o em 3-indol-acetaldeído, que é oxidado à AIA (BUGARELI 2013; GOSWAMI et al., 2016). O nocaute desse gene em diferentes gêneros de bactérias como *Azospirillum brasilense*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Serratia sp.* e *Pseudomonas sp.* possibilitou uma melhor compreensão da sua influência na biossíntese do AIA e na promoção do crescimento vegetal por meio da interação bactéria-planta, de forma que para obtenção das linhagens mutantes as técnicas moleculares empregadas consistiram principalmente do uso de plasmídeos contendo Transposons, *Target Tron system* e Recombinação homóloga com plasmídeo

contendo vetor suicida (MALHOTRA E SRIVASTAVA, 2008; PATTEN E GLICK, 2002; HASSAN E BANO, 2016; OUYANG et al., 2017).

No *Bacillus* sp. linhagem RZ2MS9, o nocaute do gene *ipdC* que codifica enzima indol-3 piruvato descarboxilase (IPDC) foi obtido por meio do sistema CRISPR-Cas9, sendo uma técnica precisa e inovadora para geração de nocaute gênico, podendo ser aplicado em diferentes espécies de *Bacillus* já caracterizadas com o respectivo gene. Ressalta-se, contudo, que o presente estudo é pioneiro no nocaute do gene *ipdC* em uma linhagem de *Bacillus* spp. promotora do crescimento em plantas, bem como no uso da técnica de CRISPR-Cas9 para essa finalidade.

A biossíntese do AIA dependente do L-triptofano por rizobactérias promotoras do crescimento em plantas, entre elas o gênero *Bacillus* spp., e os seus efeitos na promoção do crescimento das plantas tem sido constantemente relatada por diferentes autores. Batista (2017) avaliou a promoção do crescimento pela linhagem RZ2MS9, tendo observado que essa linhagem foi capaz de promover o crescimento em *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, tendo atribuído à biossíntese do AIA, sintetizado por essa linhagem, o principal mecanismo atuante na promoção do crescimento vegetal, relatando que seu efeito foi significativamente menor em mutantes *diageotrópicas* (*dgt*) dessa planta, defectivas para receptores do fitormônio. O pico da síntese do fitormônio por essa linhagem, avaliado em diferentes concentrações do aminoácido L-triptofano, ocorreu após 24 horas do crescimento bacteriano em 1 g L⁻¹ do aminoácido precursor em 30 mL meio de cultura LB. No entanto, no presente experimento a biossíntese do AIA dependente do L-triptofano foi avaliada em 5 mL de meio de cultura LB acrescido de 5mM do aminoácido, onde o pico da síntese do AIA pela linhagem RZ2MS9 selvagem, foi observado a partir de 48 horas do crescimento bacteriano.

Asari et al. (2017) observaram que a inoculação da bactéria promotora do crescimento em plantas *Bacillus amyloliquefaciens* linhagem UCMB5113 promoveu o crescimento de *Arabidopsis thaliana* influenciando na morfogênese e no aumento do comprimento da raiz e do número de pelos radiculares, sendo esse efeito atribuído, principalmente, à síntese de fitormônios secretados pela bactéria. Além disso, esses autores constataram que houve um aumento na biossíntese do ácido indol acético na presença dos exudatos radiculares de *Arabidopsis. thaliana* e da adição do aminoácido L-triptofano no meio de cultura, tendo também observado o pico da síntese do AIA no período entre 24 e 48 h.a.i. do crescimento bacteriano em meio de cultura mínimo (M9).

De maneira similar, Mishra e Kumar, (2015) também avaliaram a biossíntese do ácido indol acético pelas rizobactérias promotoras do crescimento em plantas *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, tendo observado que são capazes de sintetizar o fitormônio em diferentes condições de pH, salinidade, fontes de carbono, vitaminas e aminoácidos, constatando que as concentrações do AIA foram variáveis em função das condições avaliadas. O pico da biossíntese do fitormônio observado por esses autores, ocorreu entre 72 e 96 h.a.i. do crescimento bacteriano em meio de cultura *JNFB*, de forma que um aumento progressivo na biossíntese do AIA também pode ser observado com o aumento do tempo de crescimento bacteriano.

A inativação dos genes nas vias de biossíntese do ácido indol acético, entre eles o gene *ipdC*, na via L-triptofano dependente, IPyA, pode resultar em uma diminuição de até 90% na biossíntese do ácido indol acético, de forma que em decorrência da alteração do curso normal do processo biossintético, a habilidade de interação das bactérias com as plantas, bem como a promoção do crescimento vegetal, podem ser substancialmente afetadas, deste modo sendo um indicativo da importância desse gene na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano, assim como da via IPyA, em bactérias promotoras do crescimento em plantas (DOBBELAERE et al., 1999; SPAEPEN E VANDERLEYDEN, 2011).

As concentrações do ácido indol acético, obtidas a partir do sobrenadante da cultura da linhagem RZ2MS9 *ΔipdC*, apontam para uma redução na biossíntese do AIA, quando comparada com a linhagem selvagem, variando de acordo com o tempo de crescimento, de forma que a redução da síntese do AIA de 88,25%, observada em 24 horas de crescimento é progressivamente reduzida até atingir 58,27% no período de 72 h.a.i.

Outrossim, quando comparadas, a linhagem mutante no período de 24 h.a.i. e a linhagem selvagem no período de 72 h.a.i., em relação a biossíntese do AIA, não se observa diferença significativa entre as mesmas. Esse fenômeno pode ser atribuído, principalmente, à expressão de genes de outras vias metabólicas envolvidas na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano, tais como os das vias IAN e IAM cuja a presença de genes já foi detectada no genoma do *Bacillus sp.* (Figura 3) (BATISTA, 2017). Deste modo, podendo estar relacionados com a detecção de concentrações de AIA na linhagem nocaute para o gene *ipdC*, sendo um indicativo de que outras vias de biossíntese do fitormônio podem ser ativadas em função da disrupção na via IPyA, ou ainda que a expressão desses genes ocorre tardiamente em relação ao gene *ipdC*.

Em *A. brasilense* linhagem SMIT568s10 *ΔipdC*, Malhotra e Srivastava (2008) também observaram diferenças na biossíntese do AIA em comparação à linhagem selvagem *A. brasilense* SM, tendo constatado uma redução de 50% na síntese do fitormônio em meio de cultura acrescido de L-triptofano em uma concentração de 5 mM. Além disso, a quantificação dos compostos intermediários AIA1d e TOL na via IPyA foram significativamente reduzidos. Além disso, a capacidade de promover o crescimento radicular em sorgum pela linhagem nocaute também apresentou diminuição. Contudo, a redução da biossíntese do AIA em apenas 50%, pode, segundo os autores, estar relacionada à presença de mais de uma cópia do gene *ipdC* presente no genoma da linhagem.

Em contraste com esses resultados, Patten e Glick (2002) relatam que a disrupção do gene *ipdC* em *Pseudomonas putida* linhagem GR12-2 levou a uma drástica diminuição na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano, com uma redução de 96% da síntese do fitormônio quando comparada à linhagem selvagem em 42 horas de crescimento. Tendo observado que mesmo em concentrações crescentes do L-triptofano, adicionadas no meio de cultura, a linhagem mutante não foi capaz de sintetizar o fitormônio em concentrações significativas em relação à linhagem selvagem. Contudo, de acordo com esses autores, o nocaute do gene *ipdC* não interferiu significativamente na habilidade dessa bactéria de colonizar as raízes de canola. Porém a capacidade de promover o crescimento vegetal foi

dramaticamente afetada. De modo similar, Ouyang et al., (2017) observaram que em *Serratia sp.* linhagem ZM, o nocaute do gene *ipdC* ocasionou uma redução de 70% na biossíntese do ácido indol acético dependente do L-triptofano, tendo evidenciado que sob condições de estresse, com baixos teores de nitrogênio, a capacidade de sobrevivência dessa linhagem mutante diminui significativamente, evidenciando que o gene *ipdC*, em função da biossíntese do AIA, exerce um papel vital na sua resistência ao estresse.

Em todos os casos observados, tanto no presente experimento quanto nos demais sobescritos, o principal precursor para a síntese do AIA é o aminoácido L-triptofano, a sua adição em diferentes concentrações no meio de cultura é capaz de acarretar um aumento na biossíntese bacteriana do AIA (MERINO et al., 2008; SPAEPEN E VANDERLEYDEN, 2011). Esse aminoácido é secretado pelas raízes das plantas, sendo a contrapartida dos vegetais na interação com as bactérias, de forma que na sua presença a síntese do AIA é estimulada e consequentemente ocasiona o crescimento radicular das plantas (KRAVCHENKO et al., 2002).

Na linhagem RZ2MS9 a biossíntese do AIA foi avaliada na presença e ausência do aminoácido L-triptofano, sendo que, na sua ausência, não foi detectada produção do fitormônio em nenhum dos tempos de crescimento avaliados, o que aponta a inexistência de vias de síntese do ácido indol acético independentes desse aminoácido. Todavia, na presença do L-triptofano, em uma concentração final de 5 mM no meio de cultura LB, pode-se verificar a biossíntese do fitormônio variando significativamente quanto a concentração do AIA secretado pelas linhagens em diferentes tempos de crescimento - entre 24 e 72 horas nas linhagens WT e entre 48 e 72 h.a.i. na linhagem nocaute para o gene *ipdC*.

O estudo da influência do triptofano na biossíntese do AIA pelo *Bacillus amiloliquencies* linhagem FZB42, demonstrou que o nocaute dos genes *trpA* e *trpB*, *trpD* e *trpE* afeta os passos iniciais da síntese endógena do triptofano e consequentemente acarretam uma diminuição de 75% na síntese do AIA pelas linhagens mutantes em comparação com a linhagem selvagem, indicando que a principal via de produção do AIA em *B. amiloliquefaciens*, além de ser estimulada pelo triptofano exógeno, é, também, dependente da biossíntese endógena desse aminoácido. A promoção do crescimento vegetal por essas bactérias, avaliada em um bioensaio com a inoculação das linhagens mutantes em *Limna minor*, resultou em apenas um ligeiro aumento do peso fresco das plantas, sendo essa diminuição da habilidade de promoção do crescimento das plantas, atribuída à redução severa da biossíntese do AIA (Idris et al., 2007).

Além de ser influenciada pelo aminoácido L-triptofano, a biossíntese AIA nas bactérias promotoras do crescimento em plantas está estritamente relacionada à fase de crescimento, de maneira que o pico da produção do AIA tem sido constantemente detectado ao atingir a fase estacionária do crescimento, na qual a expressão do gene *ipdC* na presença do L-triptofano é aumentada, sendo esta fase bastante caracterizada em diferentes espécies de bactérias (DODD et al., 2010; SHI et al., 2015; RIU E PATTEN, 2008; SPAEPEN et al., 2007). Corroborando com esses autores, os resultados obtidos no presente experimento, demonstram que a linhagem RZ2MS9 selvagem, bem como a linhagem $\Delta ipdC$,

apresentam as maiores concentrações do AIA após alcançarem a fase estacionária do seu crescimento em meio de cultura LB acrescido do L-triptofano. Deste modo, evidenciando que nessas linhagens, independentemente da disrupção do gene *ipdC*, a síntese do AIA é aumentada conforme o tempo de crescimento, onde o máximo das concentrações do fitormônio são detectadas a partir da fase estacionária.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 para o nocaute do gene *ipdC* no *Bacillus sp.* linhagem RZ2MS9 comprovou ser uma potente ferramenta para o estudo da função desse gene, sendo eficiente na geração de linhagens mutantes, com um tempo total de execução de 22 dias que abrangeu 3 fases: preparação, nocaute e obtenção dos mutantes. Apesar da eficiência e velocidade de obtenção de mutantes, comparada a outras técnicas de edição e nocaute, novos métodos da técnica do CRISPR-Cas9, como plasmídeos únicos contendo o sgRNA e a endonuclease Cas9, CRISPR-Cas9 Nicasés e silenciamento com CRISPR-dCas9, podem ser empregados nessa linhagem, visando a redução no tempo total de execução, bem como o estabelecimento de novas ferramentas para o estudo do genoma no *Bacillus sp.* Além disso, a detecção das linhagens mutantes por PCR, empregada nesse estudo, necessita de validação para confirmar efetivamente a presença do cassete de DNA doador bem como a sua inserção nas regiões homólogas no gene *ipdC*.

A linhagem RZ2MS9 nocaute para o gene *ipdC* apresentou redução da biossíntese do AIA, na presença de 5 mM do aminoácido L-triptofano em comparação com a linhagem selvagem. De modo que, com o aumento no tempo de crescimento desta última, observou-se que a síntese do AIA exibe uma tendência de estabilidade em relação às concentrações do fitormônio detectadas, enquanto que na linhagem nocaute para o gene *ipdC*, um comportamento inverso foi observado, onde a concentração do AIA detectado, embora em quantidade significativamente inferior em relação à selvagem, apresentou uma tendência de crescimento ao longo do tempo. Desse modo, sugerindo a presença de outros genes capazes de sintetizar o AIA dependente do L-triptofano por outras vias de biossíntese, fazendo-se necessária a realização de estudos mais aprofundados acerca desse mecanismo nessa linhagem. O presente estudo foi pioneiro no nocaute do gene *ipdC* em uma linhagem de *Bacillus* com a técnica de CRISPR-Cas9 na qual, até o presente momento, não foram descritos mutantes para esse gene e nem o uso dessa técnica para tal finalidade.

Portanto, considera-se que os resultados obtidos no presente estudo contribuem para um melhor entendimento da influência do gene *ipdC* na biossíntese do AIA dependente do L-triptofano pela via IPyA no genoma da linhagem RZ2MS9. Além disso, os mutantes obtidos com a técnica de CRISPR-Cas9 poderão ser utilizados em experimentos futuros visando a caracterização do real efeito fisiológico do AIA sintetizado pelo *Bacillus sp.* nas plantas, bem como da sua importância na interação bactéria-planta e na capacidade de promoção do crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS

- Ablain, J., Durand, E. M., Yang, S., Zhou, Y., Zon, L. I. (2015). A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, 32(6), 756-764.
- Ahmed, A., Hasnain, S. (2014). Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol. J. Microbiol*, 63(3), 261-266.
- Ahemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- Alonso, J. C., Cardenas, P. P., Sanchez, H., Hejna, J., Suzuki, Y., Takeyasu, K. (2013). Early steps of double-strand break repair in *Bacillus subtilis*. *DNA repair*, 12(3), 162-176.
- Amitai, G., Sorek, R. (2016). CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 67.
- Amundsen, S. K., Taylor, A. F., Reddy, M., Smith, G. R. (2007). Intersubunit signaling in RecBCD enzyme, a complex protein machine regulated by Chi hot spots. *Genes & development*, 21(24), 3296-3307.
- Amundsen, S. K., Smith, G. R. (2003). Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell*, 112(6), 741-744.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569.
- Aravind, L., Koonin, E. V. (2001). Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome research*, 11(8), 1365-1374.
- Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D. V., Bejai, S., Meijer, J. (2017). Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta*, 245(1), 15-30.
- 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 Science*, 673-677.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small- subunit- ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4), 202-206.
- Ayora, S., Carrasco, B., Cárdenas, P. P., César, C. E., Cañas, C., Yadav, T., Alonso, J. C. (2011). Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 35(6), 1055-1081.

- 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.
- Bae, T., Schneewind, O. (2006). Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid*, 55(1), 58-63.
- Bae, S., Park, J., Kim, J. S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), 1473-1475.
- 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.
- Barrangou, R. (2013). CRISPR- Cas systems and RNA- guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(3), 267-278.
- Barrangou, R., Doudna, J. A. (2016). Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature biotechnology*, 34(9), 933.
- Batista, B. D. (2013). *Promoção de crescimento em milho (Zea mays L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (Paullinia cupana var. sorbilis)* (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo).
- Batista, B. D., Taniguti, L. M., Almeida, J. R., Azevedo, J. L., Quecine, M. C. (2016). Draft genome sequence of multitrait plant growth-promoting *Bacillus* sp. strain RZ2MS9. *Genome announcements*, 4(6), e01402-16.
- Batista, B. D. (2017) *Promoção de crescimento vegetal por Bacillus sp. RZ2MS9: dos genes ao campo* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Beauregard, P. B. (2015). Not just sweet talkers: How roots stimulate their colonization by beneficial bacteria. In *Advances in Botanical Research* (Vol.75, pp.1-20). Academic Press
- Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B., Barbas, C. F. (1998). Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14628-14633.
- Bettiol, W., Morandi, M. A. B., Pinto, Z. V., JÚNIOR, P., Correa, E. B., Moura, A. B., Bezerra, J. L. (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. *Embrapa Meio Ambiente-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Bhattacharyya, C., Bakshi, U., Mallick, I., Mukherji, S., Bera, B., Ghosh, A. (2017). Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhatai* strain AB211. *Frontiers in microbiology*, 8, 411.

- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., Marraffini, L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic acids research*, 41(15), 7429-7437.
- Bric J. M., Bostock R.M, Silverstone S. E., (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 535-538
- Broek, A. V., Lambrecht, M., Eggermont, K., Vanderleyden, J. (1999). Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1338-1342.
- Brookhouser, N., Raman, S., Potts, C., Brafman, D. A. (2017). May I cut in? Gene editing approaches in human induced pluripotent stem cells. *Cells*, 6(1), 5.
- Borriess, R. (2016). Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: an update. In *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 163-184). Springer, Cham.
- Boettcher, M., McManus, M. T. (2015). Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular cell*, 58(4), 575-585.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Carreno-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., Baca, B. E. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular and General Genetics*, 264(4), 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*, 33(2), 440-459.
- Charpentier, E. (2015). CRISPR- Cas9: how research on a bacterial RNA- guided mechanism opened new perspectives in biotechnology and biomedicine. *EMBO molecular medicine*, 7(4), 363-365.
- Chaabouni, I., Guesmi, A., Cherif, A. (2012). Secondary metabolites of *Bacillus*: Potentials in biotechnology. In *Bacillus thuringiensis biotechnology* (pp. 347-366). Springer, Dordrecht.
- Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W. S., Bae, T., Ji, Q. (2017). Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *Journal of the American Chemical Society*, 139(10), 3790-3795.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., Guo, J. H. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 848-864.
- Chen, H., Choi, J., Bailey, S. (2014). Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., Kim, J. S. (2013). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*.

- Choi, K. R., Lee, S. Y. (2016). CRISPR technologies for bacterial systems: current achievements and future directions. *Biotechnology advances*, 34(7), 1180-1209.
- Cobb, R. E., Wang, Y., Zhao, H. (2014). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS synthetic biology*, 4(6), 723-728.
- Cohen, J. D., Slovin, J. P., Hendrickson, A. M. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in plant science*, 8(5), 197-199.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 1231143.
- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 243(4), 463-472.
- Cox MM (2002) Historical overview: Searching for replication help in all the rec places. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8173–8180.
- Cox, M. M. (2007). Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 127
- Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Collier, J. A., Shapiro, L. (2011). The essential genome of a bacterium. *Molecular systems biology*, 7(1), 528.
- Da Costa, P. B., Granada, C. E., Ambrosini, A., Moreira, F., de Souza, R., dos Passos, J. F. M., Passaglia, L. M. (2014). A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *PLoS One*, 9(12), e116020.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602.
- Defez, R., Esposito, R., Angelini, C., Bianco, C. (2016). Overproduction of indole-3-acetic acid in free-living rhizobia induces transcriptional changes resembling those occurring in nodule bacteroids. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(6), 484-495.
- Di, D. W., Zhang, C., Luo, P., An, C. W., Guo, G. Q. (2016). The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA?. *Plant growth regulation*, 78 (3), 275-285.
- Didelot, X., Maiden, M. C. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in microbiology*, 18(7), 315-322.
- Dillingham, M. S., Kowalczykowski, S. C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 642-671.

- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Brener, S. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*, 28 (9), 871-879.
- Dodd, I. C., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I., & Belimov, A. A. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, 157(3), 361-379.
- 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*, 106(1), 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.
- Facella, P., Daddiego, L., Giuliano, G., Perrotta, G. (2012). Gibberellin and auxin influence the diurnal transcription pattern of photoreceptor genes via CRY1a in tomato. *PloS one*, 7(1), e30121.
- Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1-12.
- Freitas, S. S., Aguilar Vildoso, C. I. (2004). Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28(6).
- Gaj, T., Gersbach, C. A., Barbas III, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*, 2(3), 183-205.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.
- 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.
- Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Gaikwad, K., Annapurna, K. (2008). Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. *Current microbiology*, 57(4), 312-317.

- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., Annapurna, K. (2010). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 333-364). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hassan, T. U., Bano, A. (2016). Comparative effects of wild type *Stenotrophomonas maltophilia* and its indole acetic acid- deficient mutants on wheat. *Plant Biology*, 18(5), 835-841.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598
- Hefferin, M. L., Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair*, 4(6), 639-648.
- Heler, R., Marraffini, L. A., Bikard, D. (2014). Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR- Cas immune systems. *Molecular microbiology*, 93(1), 1-9.
- Heler, R., Samai, P., Modell, J. W., Weiner, C., Goldberg, G. W., Bikard, D., Marraffini, L. A. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*, 519(7542), 199.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), 227.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619-626.
- Iqbal, A., Hasnain, S. (2013). *Aeromonas punctata* PNS-1: a promising candidate to change the root morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* in MS and sand system. *Acta physiologiae plantarum*, 35(3), 657-665.
- 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.
- Jha, C. K., Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2), 108-119.
- 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.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233.
- Jiang, F., Taylor, D. W., Chen, J. S., Kornfeld, J. E., Zhou, K., Thompson, A. J., Doudna, J. A. (2016). Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 351(6275), 867-871.
- Jiang, F., Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505-529.

- Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., Yang, S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome using the CRISPR-Cas9 system. *Applied and environmental microbiology*, AEM-04023.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 1225829.
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Kaplan, M. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997.
- Kaushal, M., Wani, S. P. (2016). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of microbiology*, 66(1), 35-42.
- Keyeo, F., Ai'shah, O. N., Amir, H. G. (2011). Diazotroph in promoting growth of rice seedlings. *Biotechnology*, 10(3), 267-273.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental chemistry letters*, 7(1), 1-19.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P., & Tuteja, N. (2016). The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. *Frontiers in plant science*, 7, 506.
- Kloepper, J. W. (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). *Azospirillum/plant associations*, 137-166.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885.
- Kochar, M., Vaishnavi, A., Upadhyay, A., Srivastava, S. (2013). Bacterial Biosynthesis of Indole- 3- Acetic Acid: Signal Messenger Service. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 309-325.
- Korasick, D. A., Enders, T. A., Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of experimental botany*, 64(9), 2541-2555.
- Koul, V., Adholeya, A., Kochar, M. (2015). Sphere of influence of indole acetic acid and nitric oxide in bacteria. *Journal of basic microbiology*, 55(5), 543-553.
- Kowalczykowski, S. C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends in biochemical sciences*, 25(4), 156-165.
- Kowalczykowski S. C., Dixon D. A., Eggleston A. K., Lauder S. D., Rehrauer W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58: 401–465.
- Kudoyarova, G. R., Arkhipova, T. N., Melent'ev, A. I. (2015). Role of bacterial phytohormones in plant growth regulation and their development. In *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem* (pp. 69-86). Springer, Cham.
- Kuklinsky- Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani- Kleiner, A. A., Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean- associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental microbiology*, 6(12), 1244-1251.

- Kumar, V., Baweja, M., Singh, P. K., Shukla, P. (2016). Recent developments in systems biology and metabolic engineering of plant–microbe interactions. *Frontiers in plant science*, 7, 1421.
- Kumar, P., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. (2012). Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological research*, 167(8), 493-499.
- Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 751–813
- Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B., Valen, E. (2016). CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic acids research*, 44 (W1), W272-W276.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A. V., Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology*, 8(7), 298-300.
- Lambowitz, A. M., Zimmerly, S. (2011). Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a003616.
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T., Prusty, R. (2006). Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant and Cell Physiology*, 47(6), 788-792.
- Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W., Simmons, L. A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 76(3), 530-564.
- Lin, G. H., Chang, C. Y., Lin, H. R. (2015). Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 988, 53-58.
- Lillestøl, R. K., Shah, S. A., Brügger, K., Redder, P., Phan, H., Christiansen, J., Garrett, R. A. (2009). CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Molecular microbiology*, 72(1), 259-272.
- Liu, J., Zhou, Y., Qi, X., Chen, J., Chen, W., Qiu, G., Wu, N. (2017). CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. *Human genetics*, 136(1), 1-12.
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79, 181-211.
- Lusetti, S. L., & Cox, M. M. (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 71-100.
- Ma, Y., Oliveira, R. S., Freitas, H., & Zhang, C. (2016). Biochemical and molecular mechanisms of plant-microbe-metal interactions: relevance for phytoremediation. *Frontiers in plant science*, 7, 918.
- 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.

- 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. *gypsophylae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(7), 634-642.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339 (6121), 823-826
- Marraffini, L. A. (2016). The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications. In *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations (Internet)*. University of Oklahoma Health Sciences Center.
- Marraffini, L. A., Sontheimer, E. J. (2010). Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280), 568.
- Martínez-Morales, L. J., Soto-Urzúa, L., Baca, B. E., Sánchez-Ahédo, J. A. (2003). Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters*, 228(2), 167-173.
- Matthews, L. A., & Simmons, L. A. (2014). Bacterial non-homologous end joining requires teamwork. *Journal of bacteriology*, JB-02042.
- 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.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.
- Mehry, A., Akbar, M., Giti, E. (2008). Colonization and nitrogenase activity of *Triticum aestivum* (cv. Baccross and Mahdavi) to the dual inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2, 4-D. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11 (12), 1541-1550.
- Merzaeva, O. V., Shirokikh, I. G. (2010). The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1), 44-50.
- Merino, E., Jensen, R. A., Yanofsky, C. (2008). Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 78-86.
- Mishra, V. K., Kumar, A. (2015). Biosynthesis of indole-3-acetic acid by plant growth promoting rhizobacteria, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *African Journal of Microbiology Research*, 9(16), 1139-1149.
- Mojica, F. J., García-Martínez, J., Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.

- Morimatsu, K., Kowalczykowski, S. C. (2003). RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Molecular cell*, 11(5), 1337-1347.
- Mulepati, S., Héroux, A., Bailey, S. (2014). Crystal structure of a CRISPR RNA-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. *Science*, 1256996.
- Nadeem, S. M., Naveed, M., Ahmad, M., & Zahir, Z. A. (2015). Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In *Plant microbes symbiosis: applied facets* (pp. 1-36). Springer, New Delhi.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- Novo, L. A., Castro, P. M., Alvarenga, P., da Silva, E. F. (2018). Plant Growth–Promoting Rhizobacteria-Assisted Phytoremediation of Mine Soils. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* (pp. 281-295).
- 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.
- Paque, S., Weijers, D. (2016). Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC biology*, 14(1), 67.
- Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., Ahmad, P. (2016). Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant growth regulation*, 35(3), 877-902.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guiling, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology*, 31(9), 839.
- Patel, T. S., Minocheherhomji, F. P. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Blessing to Agriculture. *Int. J. Pure App. Biosci*, 6(2), 481-492.
- Patten, C. L., Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Pereira, T. C. (2016). Introdução à técnica de CRISPR. Ribeirão Preto-SP, Sociedade Brasileira de Genética, 250p.
- 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.
- Persello- Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26(2), 189-199.

- Peters, J. M., Colavin, A., Shi, H., Czarny, T. L., Larson, M. H., Wong, S., Shiver, A. L. (2016). A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. *Cell*, 165(6), 1493-1506.
- 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.
- Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., Graham, D. B. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159(2), 440-455.
- Pliatsika, V., Rigoutsos, I. (2015). "Off-Spotter": very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biology direct*, 10(1), 4.
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. In *Plant-associated bacteria* (pp. 195-230). Springer, Dordrecht.
- 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.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 435-443.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3), 142-149..
- Rocha, E. P., Cornet, E., Michel, B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS genetics*, 1(2), e15.
- Rohs, R., Jin, X., West, S. M., Joshi, R., Honig, B., Mann, R. S. (2010). Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annual review of biochemistry*, 79, 233-269.
- Saharan, B. S., Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Sampson, T. R., Weiss, D. S. (2014). Exploiting CRISPR/C as systems for biotechnology. *Bioessays*, 36(1), 34-38.
- Sander, J. D., Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347.
- Sansinenea, E., Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33(8), 1523-1538.
- Santner, A., Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459(7250), 1071.

- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.
- Schurter, W., Geiser, M., Mathé, D. (1989). Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned delta-endotoxin gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 218 (1), 177-181.
- Selle, K., Barrangou, R. (2015). Harnessing CRISPR–Cas systems for bacterial genome editing. *Trends in microbiology*, 23(4), 225-232.
- Shah, A. N., Davey, C. F., Whitebitch, A. C., Miller, A. C., Moens, C. B. (2015). Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nature methods*, 12(6), 535.
- Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G., Court, D. L. (2009). Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature protocols*, 4(2), 206.
- 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.
- Shao, J., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., Zhang, R. (2015). Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and fertility of soils*, 51(3), 321-330.
- Shen, B., Brown, K., Long, S., Sibley, L. D. (2017). Development of CRISPR/Cas9 for efficient genome editing in *Toxoplasma gondii*. In *In Vitro Mutagenesis* (pp. 79-103). Humana Press, New York, NY.
- Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 209-217.
- Shim, J., Kim, J. W., Shea, P. J., & Oh, B. T. (2015). IAA production by *Bacillus sp.* JH 2- 2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *Journal of basic microbiology*, 55(5), 652-658.
- Shuman, S., Glickman, M. S. (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 852.
- Silva, T., Davies, P. J. (2007). Elongation rates and endogenous indoleacetic acid levels in roots of pea mutants differing in internode length. *Physiologia plantarum*, 129(4), 804-812.
- Simon, S., Petrasek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454-460.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16), 1265-1277.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31 (4), 425-448.

- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62.
- Sternberg, S. H., Richter, H., Charpentier, E., Qimron, U. (2016). Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Molecular cell*, 61(6), 797-808.
- Su, T., Liu, F., Gu, P., Jin, H., Chang, Y., Wang, Q., Qi, Q. (2016). A CRISPR-Cas9 assisted non-homologous end-joining strategy for one-step engineering of bacterial genome. *Scientific reports*, 6, 37895.
- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., Venturi, V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. *Microbial Ecology*, 63(2), 249-266.
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P., Morrison, D. A. (2001). An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in Streptococcus pneumoniae. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5190-5196.
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., van der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (3), 748-757.
- Tschoeke, B. A. P. (2016) *Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (Burkholderia ambifaria) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho*. (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo)
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
- Tong, Y., Robertsen, H. L., Blin, K., Weber, T., Lee, S. Y. (2018). CRISPR-Cas9 Toolkit for Actinomycete Genome Editing. In *Synthetic Metabolic Pathways* (pp. 163-184). Humana Press, New York, NY.
- 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., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, 4, 356.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573.
- 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.
- Verbon, E. H., Liberman, L. M. (2016). Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in plant science*, 21 (3), 218-229.

- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Wang, W., Zhai, Y., Cao, L., Tan, H., Zhang, R. (2016). Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice (*Oryza sativa* L.). *Microbiological research*, 188, 1-8.
- Webb, B. L., Cox, M. M., Inman, R. B. (1997). Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. *Cell*, 91(3), 347-356.
- Weller, G. R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L. M., Scanlan, E., Della, M., Devine, K. M. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, 297(5587), 1686-1689.
- Wigley, D. B. (2013). Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 9.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl_1), 487-511.
- Yadav, A., Gaur, I., Goel, N., Mitra, M., Saleem, B., Goswami, S., Upadhyaya, K. C. (2015). Rhizospheric microbes are excellent plant growth promoters. *Indian Journal of Natural Sciences*, 5(30), 6584-6595.
- Yang, Z. B., Geng, X., He, C., Zhang, F., Wang, R., Horst, W. J., Ding, Z. (2014). TAA1-regulated local auxin biosynthesis in the root-apex transition zone mediates the aluminum-induced inhibition of root growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Yu, Z., Ren, M., Wang, Z., Zhang, B., Rong, Y. S., Jiao, R., Gao, G. (2013). Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 195(1), 289-291.
- 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, K., Duan, X., Wu, J. (2016). Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 6, 27943.
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G. M., Arlotta, P. (2011). Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature biotechnology*, 29(2), 149.
- Zheng, Q., Cai, X., Tan, M. H., Schaffert, S., Arnold, C. P., Gong, X., Huang, S. (2014). Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques*, 57(3), 115-124.