

Mineração genômica de *Bacillus velezensis* MPUR 51.6 voltada a identificação de genes relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento vegetal

Amorim, Ana Beatriz Araújo¹; Sousa, Thiago Fernandes ²; Silva, Gilvan Ferreira³

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, ²Universidade Federal do Amazonas, ³Embrapa Amazônia Ocidental
E-mails: beatrizamorim51@gmail; thiago.f.sousa@ufv.br; gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Bactérias do gênero *Bacillus* constituem grande parte dos produtos para o biocontrole de pragas e doenças em plantas, sendo de grande importância para a promoção de uma agricultura mais sustentável pela minimização de impactos ambientais e pela substituição de pesticidas químicos. Nesse sentido, *Bacillus velezensis* FZB42 é reconhecido como uma linhagem modelo para biocontrole e promoção de crescimento de plantas devido a alta produção de fitormônios e de potentes metabólitos secundários antifúngicos. No presente trabalho, foi analisado o potencial genômico de MPUR 51.6 isolada de sedimento do rio Purús. A análise filogenômica revelou proximidade com 91.8% de dDDH de MPUR 51.6 com a linhagem FZB42 e a análise de sintenia confirma a presença de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) para produção dos antimicrobianos macrolactina H, bacilaeno, bacilibactina, bacilisina, difigidina e surfactina. Além disso, foi identificado um BGC específico da linhagem MPUR 51.6 para produção de um antibiótico tiopeptídico no qual não está caracterizado nos bancos de dados. Foram identificados genes relacionados ao metabolismo do ácido indol-3-acético (AIA) demonstrando o potencial da linhagem na produção de fitormônios. Por fim, os ensaios de antagonismo com MPUR 51.6 demonstrou resultados positivos para inibição de *Fusarium fabacearum* CPAA 10621, *Colletotrichum scovilei* INPA 2917 e *Colletotrichum spaethianum* INPA 2908. Esses resultados confirmam o potencial de MPUR 51.6 aplicação na agricultura e caracterização de novos produtos naturais. Este trabalho também demonstra o uso de recursos genéticos amazônicos para prospecção de novos ativos biológicos.

Palavras-Chave: *Bacillus*, BGCs, fitormônios.

Introdução

Bacillus velezensis é uma bactéria Gram-positiva reconhecida como modelo de agente de biocontrole, sendo alvo de inúmeras investigações recentes para melhor compreender suas propriedades (Fan et al. 2018). O potencial antimicrobiano de *B. velezensis* é atribuído à produção de compostos

bioativos, como lipopeptídeos, surfactantes e enzimas. Seu amplo espectro de atividade contra diversos fitopatógenos torna *B. velezensis* uma alternativa promissora aos pesticidas químicos, contribuindo para uma agricultura mais sustentável e segura (Chowdhury et al. 2015).

Para se ter uma ideia do potencial metabólico de *B. velezensis*, a linhagem FZB42 produz sete moléculas fungicidas (fengicina, bacilomicina D, bacilibactina, dificidina, bacilisina, amylocyclicina e plantazolicina). Esse isolado, já foi aplicado como biocontrolador de *Fusarium graminearum* em trigo, *Xanthomonas oryzae* em arroz, *Phytophthora sojae* em soja, *Sclerotinia sclerotiorum* em tomate, *Rhizoctonia solani* em alface e muitas outras espécies de importância econômica (Erlacher et al. 2014; Wu et al. 2015; Farzand et al. 2019; Hanif et al. 2019; Han et al. 2021).

Além do potencial de biocontrole, *B. velezensis* também tem potencial para promoção de crescimento vegetal muito devido a vias alternativas para produção de ácido indol acético (AIA) (Myo et al. 2019). Análises com a deleção dos genes *trpABDE* (genes relacionados ao precursor de AIA triptofano), *ysnE* (AIA transacetilase) e *yhcX* (nitrilase) mostram que nos mutantes houve tanto uma diminuição drástica de AIA produzido quanto perda de capacidade em promover o crescimento vegetal (Idris et al. 2007).

No presente trabalho, foi obtido o genoma completo de uma linhagem de *Bacillus velezensis* dos sedimentos do rio Purús. As comparações genômicas revelam alta similaridade com o isolado modelo de biocontrole FZB42. Nesse sentido, focamos na análise de genes compartilhados entre esses isolados a fim de identificar genes de interesse para o biocontrole e promoção de crescimento, bem como identificar variações entre esses isolados.

Material e Métodos

Obtenção do isolado MPUR 51.6

1g de sedimento do rio Purús (Amazônia) foi diluído em 10 mL de água destilada ultrapura. 50 µL dessa diluição foi plaqueada em meio ISP2 por dois dias a uma temperatura de 28°C. A colônia foi isolada e conservada em ISP2 + 20% de glicerol.

Sequenciamento do genoma completo, análise filogenômica e análise de cluster gênicos biossintéticos (BGCs)

A extração de DNA foi realizada seguindo as recomendações do protocolo CTAB 2%, e o sequenciamento foi realizado por meio da plataforma Illumina usando 150 de pair ended. A análise filogenômica foi realizada pela plataforma TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) e a identificação de clusters gênicos biossintéticos foi realizada por meio da plataforma antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>).

Análise comparativa via orthovenn e sintenia

A análise de sintenia foi realizada usando o pipeline clinker & clustermap.js (Gilchrist et al. 2021). Para isso, os arquivos Genbank de BGCs já caracterizados foram extraídos pelo repositório MIBIG. Os arquivos genbank dos BGCs de MPUR 51.6 foram obtidos por meio do antiSMASH. A comparação nos BGCs e as buscas de similaridade foram baseadas no algoritmo TBLASTX em clinker e a visualização da sintenia foi realizada pelo clustermap.js.

Análise de antagonismo in vitro

Placas contendo o meio BDA (200 g/L Batata; 20 g/L Dextrose; 15 g/L de ágar) foram inoculadas com o isolado MPUR 51.6 a uma distância de oito centímetros das bordas em conjunto com o fitopatógeno, no qual foi inoculado no centro da placa. Após as inoculações as placas foram incubadas a 28°C por sete dias. O controle foi realizado com a inoculação do fitopatógeno no centro da placa e sem a inoculação de MPUR 51.6. Os fitopatógenos testados foram: *Fusarium fabacearum* CPAA 10621, *Colletotrichum scovillei* INPA 2910, *Colletotrichum spaethianum* 2908.

Resultados e Discussão

A análise filogenômica permitiu a identificação de MPUR 51.6 como pertencente à espécie *Bacillus velezensis* FZB42 com 91.8% de dDDH em relação ao isolado FZB42 (Figura 1). A análise de cluster gênico biossintético revelou 15 BGCs correspondentes a quatro PKS, duas à produção terpenos, três híbridos, quatro NRPS, um RiPP e um BGC não classificado (Other). 5 BGCs

foram identificados com 100% de similaridade com BGCs relacionados à produção de macrolactina H, bacilaeno, bacilibactina, bacilisina, difcidina e surfactina. As análises de sintenia confirmam o potencial para produção desses compostos que são em sua maioria antifúngicos (Chowdhury et al. 2015) (Figura 2).

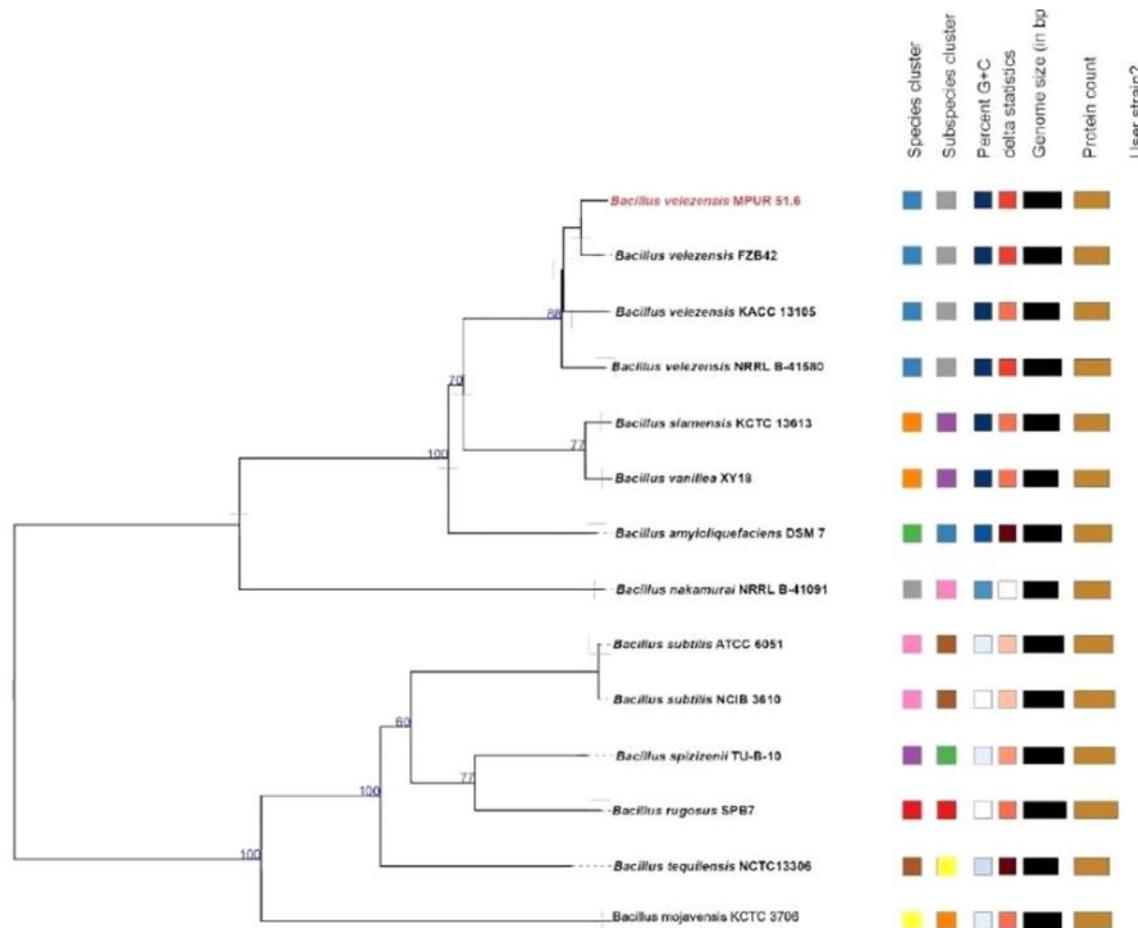


Figura 1 - Filograma com base no genoma completo mostrando as relações de MPUR 51.6 com isolados de *Bacillus velezensis*. O isolado obtido neste estudo está marcado de vermelho.

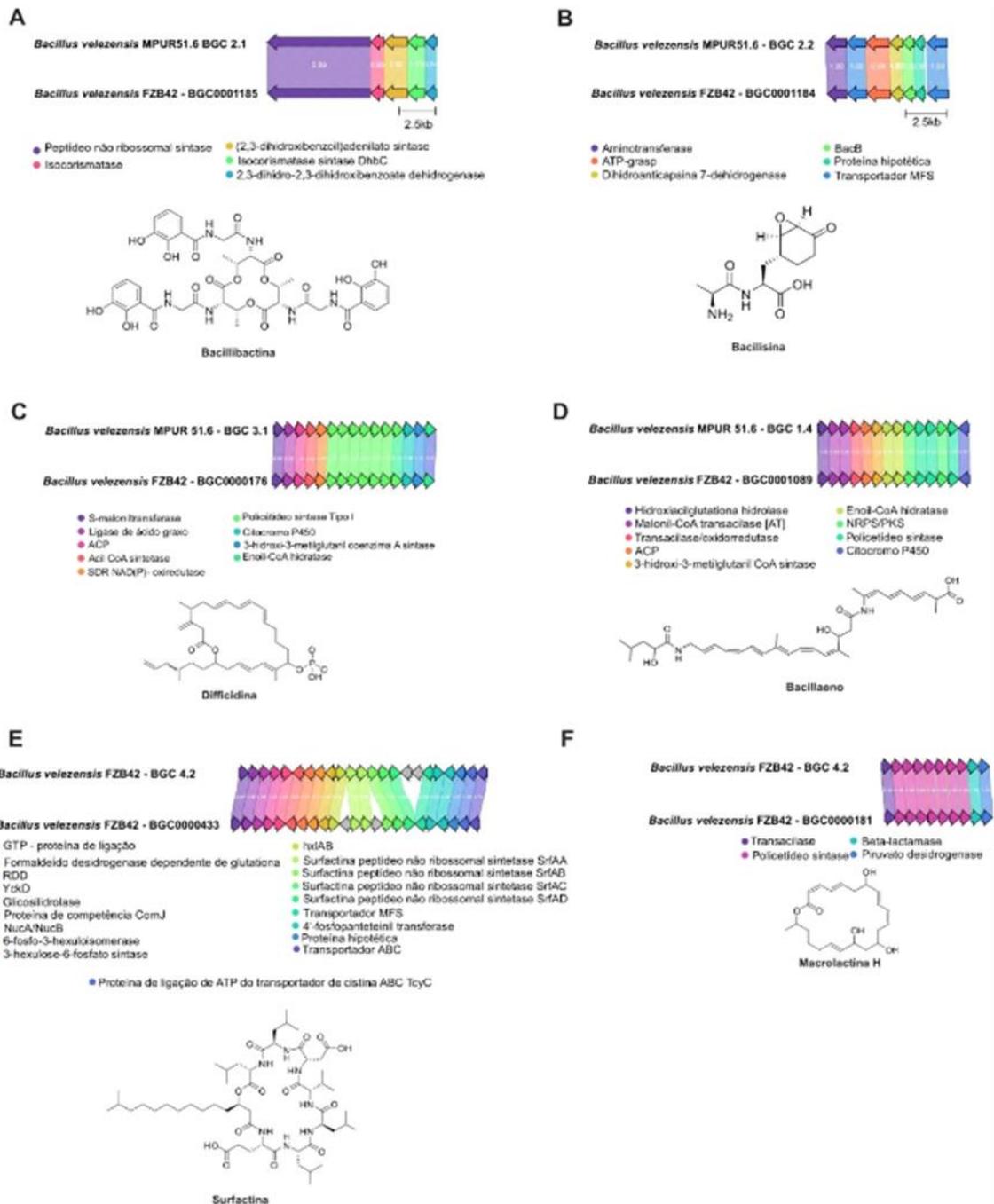


Figura 2 - Análise de sintenia de cluster gênicos biossintéticos entre MPUR 51.6 e FZB42. A) Sintenia de BGCs relacionados a produção de bacilibactina; B) Sintenia de BGCs relacionados a produção de bacilisina; C) Sintenia entre BGCs relacionados a produção de difficidina; D) Sintenia dos BGCs relacionados a produção de bacillaeno; E) Sintenia dos BGCs relacionado a produção de surfactina; F) Sintenia dos BGCs relacionado a produção de macrolactina H.

Além disso, foi identificado um BGC não compartilhado entre MPUR 51.6 e FZB42 relacionado a um peptídeo ribossomal pós traducionalmente modificado. Esses resultados indicam que o isolado amazônico obtido nesse trabalho, além das características desejáveis de biocontrole, possui mais um

cluster biossintético no qual até o presente momento permanece não identificado e que possui características de um BGC relacionado a produção de antibióticos tiopeptídicos (Figura 3).

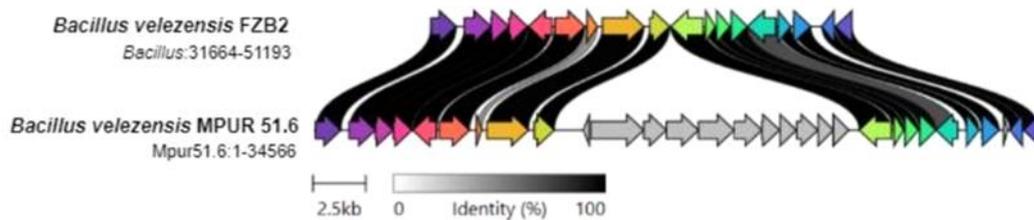


Figura 3 - Análise de sintenia entre regiões homólogas de MPUR 51.6 e FZB42 revelando a inserção de um BGC organizado em operon (genes em cinza) para a produção de tiopeptídeos no genoma de MPUR 51.6.

A análise comparativa entre MPUR 51.6 e FZB42 mostra 15 proteínas não compartilhadas. Quando realizado o blast para a identificação da função foram observados hit com proteínas de fagos nos scaffolds 2, 3 e 5 (Figura 4). Em adição quando prospectados genes relacionados à produção de AIA, todos os genes foram localizados, o que indica que o isolado MPUR 51.6 pode promover o crescimento de plantas (Tabela 1).

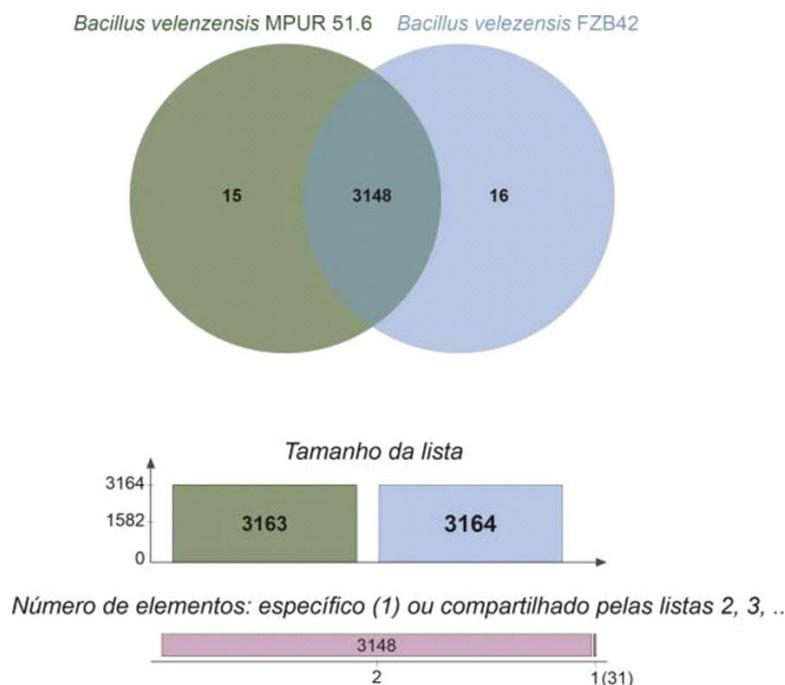


Figura 4 - Análise de proteínas ortólogas preditas com base no genoma dos isolados MPUR 51.6 e FZB42 mostrando 3148 proteínas compartilhadas e 31 proteínas específicas.

Tabela 1- Genes de *Bacillus velezensis* FZB42 e *Bacillus velezensis* MPUR 51.6 associados à biossíntese de triptofano e ao metabolismo do ácido indol-3-acético (AIA).

Acesso das proteínas de FZB42	Função predita do gene	Código da enzima (EC)	Identidade dos acessos de proteínas de FZB2 com MPUR 51.6 (pb / identidade%)
<i>Enzimas relacionadas à produção de Triptofano</i>			
<i>trpE</i> CAL26225.1	Antranilato sintase	4.1.3.27	512/515 (99%)
<i>trpD</i> CAL26226.1	Antranilato fosforibosiltransferase	2.4.2.18	335/338 (99%)
<i>trpA</i> CAL26231.1	Triptofano subunidade α sintase	4.2.1.20	261/265 (98%)
<i>trpB</i> CAL26229.1	Triptofano subunidade β sintase	4.2.1.20	396/400 (99%)
<i>Proteínas homólogas envolvidas na biossíntese de AIA</i>			
<i>YedL</i> CAL26203.1	<i>N</i> -acetiltransferase	2.3.1	170/173 (98%)
<i>YozC</i> CAL26192.1	NADP-dependente indol-3-acetaldeído desidrogenase	1.2.1.3	67/67 (100%)
<i>YhcX</i> CAL26199.1	Nitrilase	3.5.5.1	511/512 (99%)

O ensaio de cultura pareada revelou a produção de antifúngicos, sendo MPUR 51.6 capaz de inibir o crescimento micelial de todos os fitopatógenos testados, com destaque para a inibição de INPA 2910 no qual foi observada a maior redução (Figura 5). *Colletotricum scovillei* INPA 2910 foi isolado como um patógeno causando podridão de fruto em pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense*), esse fitopatógeno representa ameaça a diversas variedades de pimenta no mundo todo (Kanto et al. 2014; Oo et al. 2017).

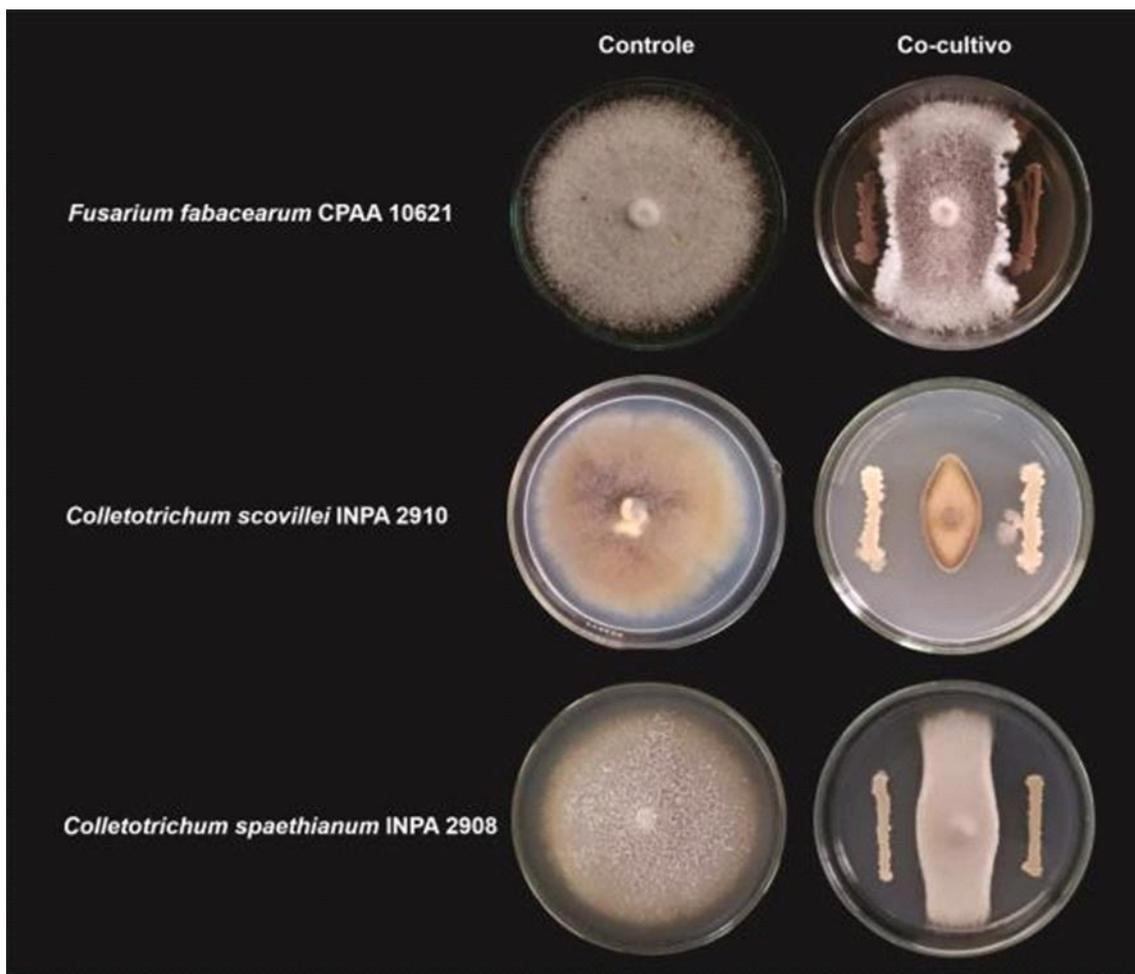


Figura 5 - Ensaio qualitativo do potencial para produção de antifúngico em *Bacillus velezensis* MPUR 51.6 contra diferentes espécies de fitopatógenos.

Esses resultados em conjunto demonstram que o isolado amazônico de *Bacillus velezensis* possui características para o biocontrole e promoção de crescimento. Além disso, genes específicos foram identificados e podem ser a chave para caracterização de novos produtos naturais bem como novos ativos biotecnológicos.

Conclusões

O isolado MPUR 51.6 pertence a espécie *Bacillus velezensis*. A linhagem possui 15 BGCs envolvidos na biossíntese de produtos naturais. Com base nos BGCs que apresentaram alta similaridade foi possível prever o potencial para produção de macrolactina H, bacilaeno, bacilibactina, bacilisina, difidina e surfactina. Um BGC específico da linhagem MPUR 51.6 relacionado a antibióticos tiopeptídicos foi identificado. Além disso, genes relacionados à

produção de AIA foram localizados no genoma, indicando que o isolado MPUR 51.6 pode promover o crescimento de plantas. Os testes de antagonismo contra diferentes fitopatógenos revelam a produção de antifúngicos.

Referências

Chowdhury, S.; Hartmann, A.; Gao, X. Borriss, R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review. *Frontiers in Microbiology* 6: 780.

Erlacher, A.; Cardinale, M.; Grosch, R.; Grube, M.; Berg, G. 2014. The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology* 5: 175.

Farzand, A.; Moosa, A.; Zubair, M.; Khan, A.; Massawe, V.; Tahir, S.; Gao, X. 2019. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by the induction of systemic resistance and regulation of antioxidant pathways in tomato using fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Biomolecules* 9(10): 613.

Fan, B.; Wang, C.; Song, X.; Ding, X.; Wu, L.; Wu, H.; Borriss, R. 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology* 9: 2491.

Gilchrist, C.M.L.; Chooi, Y.H. 2021. clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics* 37(16): 2473-2475.

Hanif, A.; Zhang, F.; Li, P.; Li, C.; Xu, Y.; Zubair, M.; Gao, X. 2019. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins* 11(5): 295.

Han, X.; Shen, D.; Xiong, Q.; Bao, B.; Zhang, W.; Dai, T.; Fan, B. 2021. The plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *Phytophthora sojae* due to bacilysin production. *Applied and Environmental Microbiology* 87(23): e01601-21.

Idris, E.; Iglesias, 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.

Kanto, T.; Uematsu, S.; Tsukamoto, T.; Moriwaki, J.; Yamagishi, N.; Usami, T.; Sato, T. 2014. Anthracnose of sweet pepper caused by *Colletotrichum scovillei* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 80: 73-78.

Myo, M.; Liu, B.; Ma, J.; Shi, L.; Jiang, M.; Zhang, K.; Ge, B. 2019. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control* 134: 23-31.

Oo, M.; Lim, G.; Jang, A.; Oh, K. 2017. Characterization and pathogenicity of new record of anthracnose on various chili varieties caused by *Colletotrichum scovillei* in Korea. *Mycobiology* 45(3): 184-191.

Wu, L.; Wu, H.; Chen, L.; Yu, X.; Borriss, R.; Gao, X. 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports* 5(1): 12975.