

Potencial para promoção de crescimento de plantas em bactérias endofíticas da rabo-de-guariba

Bandeira, Izabel Correa¹; Sousa, Thiago Fernandes³; Lima, Ícaro Nascimento²;
Mendes, Valdira Costa²; Costa, Gerodes Vasconcelos da²; Silva, Gilvan Ferreira
da¹

¹Embrapa Amazônia Ocidental, ²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,

³Universidade Federal do Amazonas

Email: izacbandeira@gmail.com

Resumo

Apesar de o fósforo ser abundante na natureza, mais de 40% dos solos cultiváveis mundiais apresentam baixa produtividade relacionada com a falta desse nutriente. As aplicações constantes de fertilizantes químicos usadas para contornar esse problema geram impactos negativos ao meio ambiente como a eutrofização de corpos d'água. Atualmente, o uso de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) tem sido uma forma alternativa, econômica e sustentável de reduzir o uso de fertilizantes químicos, visto que essas bactérias podem apresentar características para solubilização de fosfato e outros nutrientes, produção de fitohormônios e indução de resistência na planta contra fitopatógenos. Neste trabalho, foram analisados os isolados BRG2 e BRG7 quanto ao seu potencial de solubilização *in vitro* de fosfatos inorgânicos em meio PVK com fontes de alumínio e ferro. Além disso, a partir da obtenção do genoma completo desses isolados foi realizada uma prospecção de genes relacionados à promoção de crescimento de plantas. Os índices de solubilização (IS) obtidos para os dois isolados indicam uma elevada eficiência de solubilização, com IS > 18 para fonte de alumínio e IS > 20 para fonte de ferro. A identificação filogenômica de BRG2 revelou uma nova espécie de *Paraburkholderia* com dDDH < 70% em relação às espécies tipo mais próximas. Em adição, foram identificados genes relacionados à produção do fitohormônio ácido indol acético, ACC desaminase, fosfatase inorgânica, produção de celulose e aril-polienos. Esses resultados indicam que a espécie possui grande potencial para a promoção do crescimento de plantas e futuramente pode ser testada como um bioinoculante em solos ricos em fosfato inorgânico de alumínio ou ferro.

Palavras-Chave: Fosfato; Biocontrole; Mineração genômica

Introdução

A deficiência nutricional é um dos principais problemas que afetam o crescimento das plantas, impactando a produção agrícola mundial (Pandey 2015). O fósforo é o segundo nutriente de maior importância, pois faz parte da estrutura de ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolipídios e fosfoproteínas, estando diretamente envolvido nas reações de energia, fotossíntese e respiração celular

(Mendes et al.2014). E apesar de ser abundante na natureza, mais de 40% dos solos cultiváveis mundiais apresentam baixa produtividade relacionada com a falta desse nutriente (Vance 2001).

Solos tropicais são grandes exemplos desse problema, e isso acontece devida elevada capacidade de adsorção das formas disponíveis de fósforo em superfícies argilosas (Barros et al. 2005). A formação de diferentes complexos com o fósforo disponível é influenciada também pelo pH do solo, ocorrendo em solos ácidos a formação de complexos com óxidos de alumínio e ferro, e em solos alcalinos com óxidos de cálcio (Shen et al. 2011; Aliyat et al. 2020). Esse problema é contornado por meio de aplicações constantes de fertilizantes químicos, gerando impactos negativos ao meio ambiente como a eutrofização de corpos d'água.

Uma alternativa econômica e sustentável para redução do uso de fertilizantes químicos é a prospecção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP). Essas bactérias apresentam características fisiológicas para solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, antimicrobianos e fitohormônios, e podem ser usadas para o manejo e fertilização de plantas (Qassim et al. 2018; Valle-Romero et al. 2023).

Nesse cenário, destaca-se o gênero *Paraburkholderia* pela capacidade de atuar no biocontrole de fitopatógenos, biofertilização, biorremediação e por possuir baixa capacidade de causar doenças em humanos e plantas (Angus et al. 2014; Sawana et al. 2014; Estrada-De Los Santos et al. 2016; Dias et al. 2019). Devido a essas características, técnicas de mineração de genomas e engenharia genética tem sido aplicadas para a seleção, melhoramento de linhagens e expressão heteróloga de produtos naturais de interesse biotecnológico para formulação de potentes biopesticidas (Xheng et al. 2020; Donoso et al. 2017; Petrova et al. 2022).

Nesse sentido, o presente trabalho investigou traços funcionais de solubilização de fosfato, identificação de genes relacionados ao metabolismo secundário e promoção de crescimento vegetal em uma nova espécie de *Paraburkholderia*.

Material e Métodos

Isolamento seletivo de bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato

A coleta ocorreu no dia 24 de abril de 2022 sendo selecionados caules rastejantes sadios da samambaia amazônica *Phlebodium decumanum* (rabo-de-guariba) inquilina de um tronco de *Handroanthus impetiginosus* (Ipê-roxo) localizado na Embrapa Amazônia Ocidental (Rodovia AM 010, km 29, Manaus-AM). As amostras foram lavadas com água e detergente neutro, seguido de desinfestação superficial do material vegetal em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto, álcool 70% por 30s e três lavagens em água destilada estéril. Em seguida, foram inoculados pequenos fragmentos em placa de Petri com meio de cultura PVK e CAS Ágar e incubadas a 28°C.

Análise do índice de solubilização de fosfato

Colônias purificadas foram inoculadas em placas de Petri com três tipos de meio PVK modificado para avaliar a solubilização de fosfato inorgânico de cálcio, alumínio e ferro ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4), o experimento foi realizado em triplicatae incubado a 28°C. O diâmetro da colônia e o halo de solubilização foram medidos em 24 e 48 horas, e usados para calcular o Índice de Solubilização (Kirui et. al. 2022).

Identificação filogenômica e mineração de genes relacionados a promoção decrescimento de plantas

A análise filogenômica foi realizada pelo TYGS Type (Strain) Genome Server disponível em <https://tygs.dsmz.de>, utilizando genomas de espécies tipo disponíveis (Meier-Kolthoff 2019). A anotação funcional de genes foi realizada pelo servidor do RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) disponível em <https://rast.nmpdr.org/>, para a detecção de genes alvos também foi utilizado a ferramenta de BLAST dentro do servidor (Aziz et al. 2008). A identificação de Clusters de Genes Biossintéticos (BGC's) foi feita pelo AntiSMASH, disponível em <https://antismash.secondarymetabolites.org/>, comparados com dados da literatura para identificação de prováveis BGC's envolvidos na interação bactéria-planta, e para a determinação da conservação de genes nos BGC's alvos com os BGC's de espécies de interesse foi utilizado o pipeline clinker & clustermap.js (Gilchrist et al. 2021).

Os isolados brg2 e brg7 avaliados nesse trabalho se destacaram por apresentarem atividade positiva para produção de sideróforos, além de elevada capacidade de solubilização de fosfatos de alumínio e ferro (Figura 1).

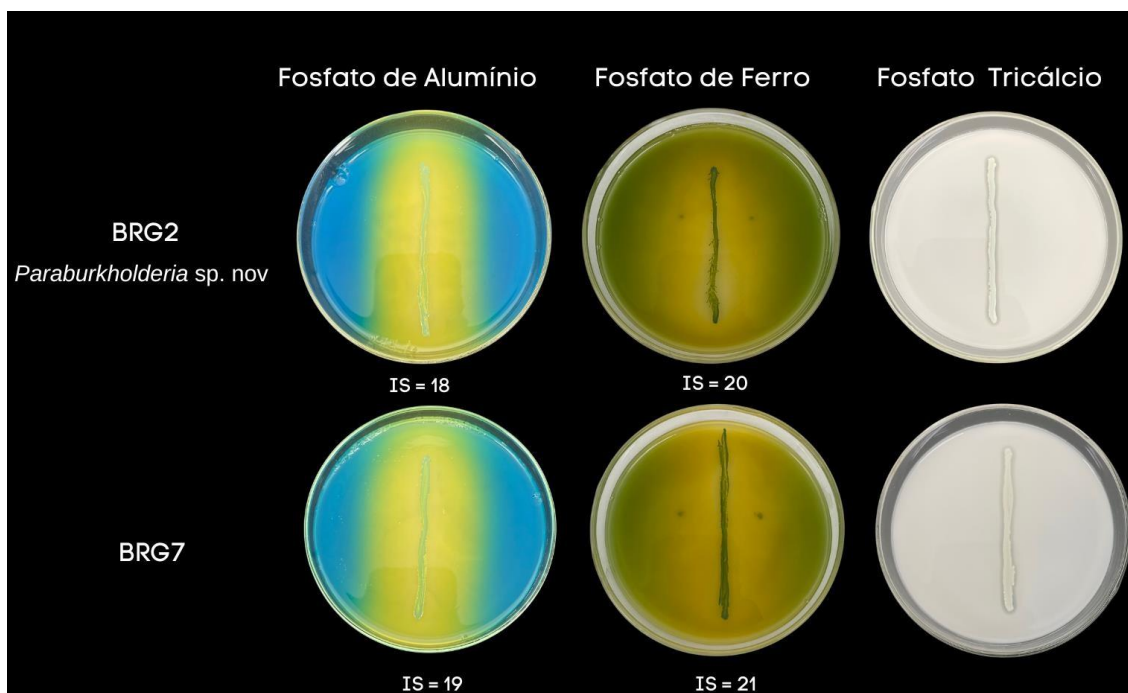


Figura 1. Elevada capacidade de solubilização de fosfato de alumínio e ferro (IS >18) 48 horas após inoculação em meio PVK com bromocresol green. IS = Índice de Solubilização.

A análise do índice de solubilização (IS) em 24 horas de cultivo apresentou alta eficiência para as fontes de alumínio e ferro de ambos isolados, com valores de índice acima de 10 (Tabela 1). Os índices de solubilização de $AlPO_4$ e $FePO_4$ em 48 horas de ambos isolados mostram-se cinco e seis vezes maiores do que os reportados por Sembiring (2022) para *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia* e *Burkholderia seminalis* e por Xuan (2018) para *Burkholderia cepacia*, consideradas bactérias com alta eficiência de solubilização.

Tabela 1. Índice de solubilização (diâmetro do halo solubilizado/diâmetro da colônia)

Fontes de fosfato	<i>Paraburkholderia sp. nov.</i>		BRG7	
	24h	48h	24h	48h
Alumínio	IS=11,3	IS=18	IS=12,6	IS=19
Ferro	IS=11	IS=20	IS=12,3	IS=21
Cálcio	baixo	baixo	baixo	baixo

A análise filogenômica no TYGS indicou que o isolado brg2 é uma nova espécie dentro do gênero *Paraburkholderia* com dDDH de 33.8 e 33.7 com as

espécies tipo mais proximamente relacionadas de *Paraburkholderia eburnea* e *Paraburkholderia bannensis*, respectivamente. O genoma da nova espécie apresenta ~8Mb de tamanho e conteúdo G+C de 63%. Bactérias presentes no mesmo clado filogenético como linhagens de *Paraburkholderia tropica* são reconhecidas como promotoras de crescimento de sorgo, cana-de-açúcar, tomate e outras espécies vegetais (Silva et al. 2018; Kuramae et al. 2020; Vio et al. 2022).

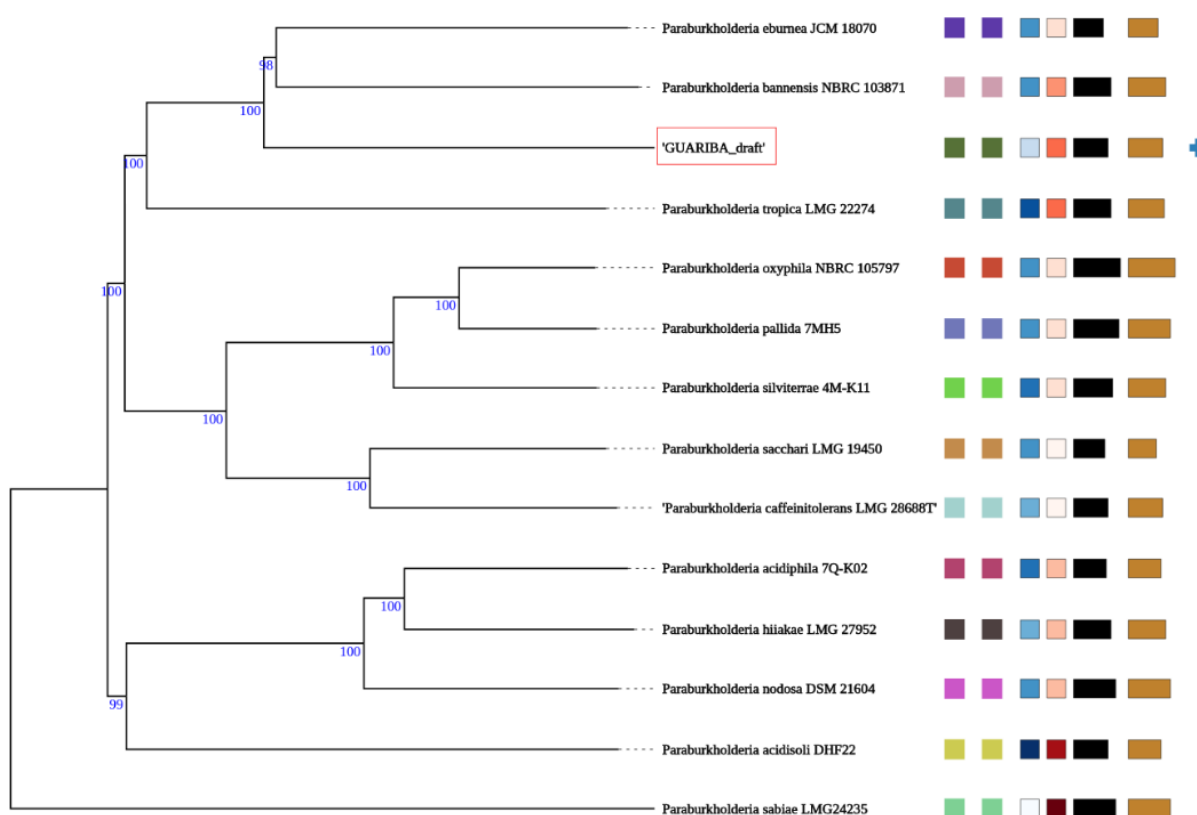


Figura 2. Análise filogenômica utilizando o TYGS, onde o retângulo em vermelho destaca a nova espécie isolada neste trabalho.

A mineração genômica de BCG's feita no antimash revelou 11 clusters de genes, sendo um de PKS, quatro para produção de terpenos, um NRPS, um RiPP, um híbrido e dois não classificados (Other). Dentre esses clusters o 52.1 (Figura 3) exibiu relação com a biossíntese de aril-poliênos, pigmentos semelhantes aos carotenoides com capacidade protetiva de danos induzidos pela luz e espécies reativas de oxigênio que podem causar estresse dentro de tecidos vegetais (Graciela et al. 2019).

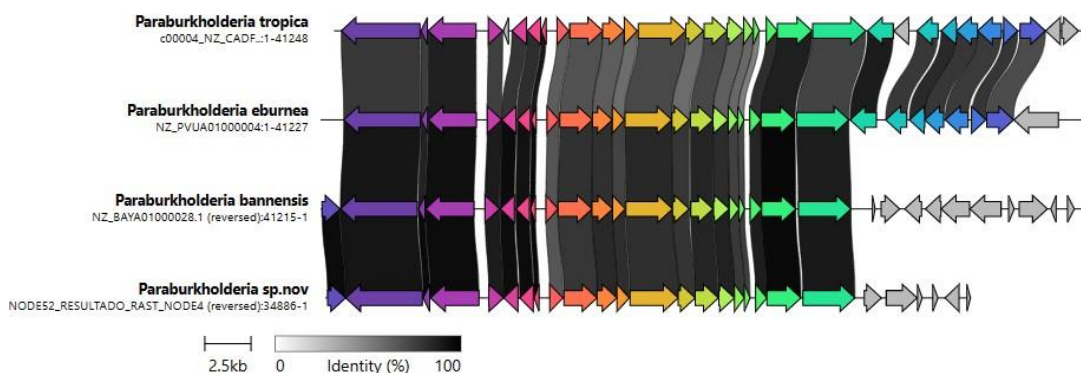


Figura 3. Análise de sinteniapara a biossíntese de aril-polienos.

A anotação gerada pelo RAST indicou no genoma de *Paraburkholderia* sp. nova presença de uma via completa para a produção de L-Tryptophano (Tabela 2), produção de AIA pela via TAM e de celulose por meio do operon bcs.

Tabela 2. Genes de *Paraburkholderia* sp. nov BRG2 para biossíntese de triptofano, ácido indol-3-acético (AIA), ACC desaminase, fosfatase e celulose.

	Função predita	Código enzima
Enzimas relacionadas à produção de Triptofano		
trpE	Antranilato sintase	4.1.3.27
trpD	Antranilato fosforibosiltransferase	2.4.2.18
trpA	Triptofano subunidade α sintase	4.2.1.20
trpB	Triptofano subunidade β sintase	4.2.1.20
trpC	Indol-3-glicerol fosfato sintase	4.1.1.48
Enzimas relacionadas à produção de AIA, celulose, fosfatase e degradação do etileno		
YedL	N-acetiltransferase	2.3.1.-
YhcX	Nitrilase	-
AldA	Aldeído desidrogenase	1.2.1
	Monoamina oxidase	1.4.3.4
ACCD	ACC desaminase	3.5.99.7
PPA1	Pirofosfatase inorgânica	3.6.1.1
BCS	Operon Celulose Sintase	
	Beta-1,4-Glucanase (celulase)	3.2.1.4

Os genes para produção de celulose, síntese de ácido indol acético (IAA) e ACC desaminase estão diretamente relacionados a capacidade de *Paraburkholderia* spp. de colonizar e promover o crescimento de plantas. A

presença do gene para 1- aminociclopropano-1-carboxilato mostra que a nova espécie pode ser capaz de diminuir o nível de etileno nas plantas hospedeiras, mediando respostas de resistência e tolerância ao stress ambiental (Esmaeel et al. 2018). A detecção do gene *ppa1* para pirofosfatase inorgânica corrobora com os dados *in vitro* obtidos para solubilização de fosfatos inorgânicos e a região vizinha indica a presença de genes que podem também estar relacionados a essa atividade biológica.

Conclusões

Os isolados avaliados neste estudo exibem alta eficiência para solubilização de fosfatos inorgânicos de alumínio e ferro. A obtenção do genoma de BRG2 indicou que este isolado é uma nova espécie de *Paraburkholderia* spp. e apresenta diversos genes com funções relacionadas a promoção do crescimento de plantas, como produção de aril-polienos, fosfatase inorgânica, AIA, ACC desaminase e celulose. Esses resultados indicam que a espécie possui grande potencial de promover o crescimento de plantas e futuramente pode se tornar um bioinoculante como a espécie *Paraburkholderia tropica* que está no mesmo clado na análise filogenômica do TYGS.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo suporte financeiro e concessão de Bolsas de estudo obtido a partir do programa Prospam (Edital Nº 008/2021). Ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES-Procad AmazonMicro e CAPES-Amazônia Legal.

Referências

- Adnan, M.; Fahad, S.; Zamin, M.; Shah, S.; Mian, I.A.; Danish, S.; et al. 2020. Coupling phosphate-solubilizing bacteria with phosphorus supplements improve maize phosphorus acquisition and growth under lime induced salinity stress. *Plants* 9(7): 900.
- Aliyat, F.Z.; Maldani, M.; El Guilli, M.; Nassiri, L.; Ibjibijen, J. 2020. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate solid sludge of the moroccan phosphate mines. *The Open Agriculture Journal* 14(1).

Angus, A.A.; Agapakis, C.M.; Fong, S.; Yerrapragada, S.; Estrada-de Los Santos, P.; Yang, P.; Hirsch, A.M. 2014. Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. *PloS one* 9(1): e83779.

Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A. et al. 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9(1).

Barros, N.F.; Comerford, N.B. 2005. Phosphorus sorption, desorption and resorption by soils of the Brazilian Cerrado supporting eucalypt. *Biomass and Bioenergy* 28(2): 229-236.

Dias, G.M.; de Sousa Pires, A.; Grilo, V.S.; Castro, M.R.; de Figueiredo Vilela, L.; Neves, B.C. 2019. Comparative genomics of *Paraburkholderia kururiensis* and its potential in bioremediation, biofertilization, and biocontrol of plant pathogens. *Microbiology Open* 8(8): e00801.

Donoso, R.; Leiva-Novoa, P.; Zúñiga, A.; Timmermann, T.; Recabarren-Gajardo, G.; González, B. 2017. Biochemical and genetic bases of indole-3-acetic acid (auxin phytohormone) degradation by the plant-growth-promoting rhizobacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 83(1): e01991-16.

Estrada-De Los Santos, P.; Vinuesa, P.; Martínez-Aguilar, L.; Hirsch, A.M.; Caballero-Mellado, J. 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Current Microbiology* 67: 51-60.

Esmael, Q.; Miotto, L.; Rondeau, M.; Leclère, V.; Clément, C.; Jacquard, C.; Barka, E.A. 2018. *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN-plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 9: 2093.

Gilchrist, C.L.M.; Chooi, Y.H. 2021. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics* 18: btab007.

Kirui, C. K.; Njeru, E.M.; Runo, S. 2022. Diversity and phosphate solubilization efficiency of phosphate solubilizing bacteria isolated from semi-arid agroecosystems of Eastern Kenya. *Microbiology Insights* 15.

Kuramae, E.E.; Derksen, S.; Schlemper, T.R.; Dimitrov, M.R.; Costa, O.Y.; da Silveira, A.P. 2020. Sorghum growth promotion by *Paraburkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense*: Putative mechanisms revealed by genomics and metagenomics. *Microorganisms* 8(5): 725.

Kuramae, E.E.; Derksen, S.; Schlemper, T.R.; Dimitrov, M.R.; Costa, O.Y.; da Silveira, A.P. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 10: 2182.

Mendes, G.O.; Freitas, A.L.M.; Pereira, O.L.; Silva, I.R.; Vassilev, N.B.; Costa, M.D. 2014. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology* 64(1): 239-249.

Pandey, R. 2015. Mineral Nutrition of Plants. In: Bahadur, B.; Venkat Rajam, M.; Sahijram, L.; Krishnamurthy, K. (eds). *Plant Biology and Biotechnology*. Springer. Nova Deli. 499-538p.

Petrova, Y.D.; Zhao, J.; Webster, G.; Mullins, A.J.; Williams, K.; Alswat, A.S.; et al. 2022. Cloning and expression of *Burkholderia* polyynne biosynthetic gene clusters in *Paraburkholderia* hosts provides a strategy for biopesticide development. *Microbial biotechnology* 15(10): 2547-2561.

Sawana, A.; Adeolu, M.; Gupta, R.S. 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics* 5: 429.

Sembiring, M.; Sabrina, T. 2022. Diversity of phosphate solubilizing bacteria and fungi from andisol soil affected by the eruption of Mount Sinabung, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 23(2).

Shen, J.; Yuan, L.; Zhang, J.; Li, H.; Bai, Z.; Chen, X.; Zhang, W.; Zhang, F. 2011. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology* 156(3): 997-1005.

Silva, P.R.A.D.; Simões-Araújo, J.L.; Vidal, M.S.; Cruz, L.M.; Souza, E.M.D.; Baldani, J.I. 2018. Draft genome sequence of *Paraburkholderia tropica* Ppe8 strain, a sugarcane endophytic diazotrophic bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 210-211.

Tilman, D.; Cassman, K.G.; Matson, P.A.; Naylor, R.; Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418(6898): 671-677.

Tilman, D.; Fargione, J.; Wolff, B.; D'antonio, C.; Dobson, A.; Howarth, R.; et al. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292(5515): 281-284.

Valle-Romero, P.; García-López, J.V.; Redondo-Gómez, S.; Flores-Duarte, N.J.; Rodríguez-Liorente, I.D.; Idaszkin, Y.L.; et al. 2023. Biofertilization with PGP Bacteria Improve Strawberry Plant Performance under Sub-Optimum Phosphorus Fertilization. *Agronomy* 13(2): 335.

Vance, C.P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* 127(2): 390-397.

Vio, S.A.; Bernabeu, P.R.; García, S.S.; Galar, M.L.; Luna, M.F. 2022. Tracking and plant growth-promoting effect of *Paraburkholderia tropica* MTo-293 applied to *Solanum lycopersicum*. *Journal of Basic Microbiology* 62(7): 875-886.

Xuan, L.N.T.; Tien, P.D.; Van Dung, T.; Hung, N.N. 2018. Solubilization Of Ferrous Phosphate and Aluminum Phosphate by Bacteria Isolated from Floating Rice in Tri Ton Dis-Trict, an Giang Province, Mekong Delta. Conservation And Development of The Floating Rice Based Agroecological Farming Systems 59.

Zheng, W.; Wang, X.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Li, A.; Bian, X. 2020. Establishment of recombineering genome editing system in *Paraburkholderia megapolitana* empowers activation of silent biosynthetic gene clusters. *Microbial Biotechnology* 13(2): 397-405.