

Universidade Federal de São João del-Rei
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

SAMUEL FELIPE AZEVEDO GALVÃO

**Análise genômica e monitoramento de bactérias
promotoras de crescimento de plantas**

São João del-Rei
Minas Gerais – Brasil
Dezembro de 2023

SAMUEL FELIPE AZEVEDO GALVÃO

**Análise genômica e monitoramento de bactérias
promotoras de crescimento de plantas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

São João del-Rei
Minas Gerais – Brasil
Dezembro de 2023

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G182a Galvão, Samuel Felipe Azevedo .
Análise genômica e monitoramento de bactérias
promotoras de crescimento de plantas / Samuel Felipe
Azevedo Galvão ; orientadora Sylvia Morais de Souza
Tinôco. -- São João del-Rei, 2023.
98 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Bioengenharia) -- Universidade Federal de São João
del-Rei, 2023.

1. Bacillus. 2. Genoma. 3. Marcadores
moleculares. 4. PCR em tempo real. 5. Priestia. I.
Tinôco, Sylvania Morais de Souza, orient. II. Título.

MEMBROS DA BANCA		FUNÇÃO	TÍTULO	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
NOME COMPLETO	CPF			
Sylvia Moraes de Sousa Tinôco	286.650.018-08	Presidente	DS	UFSJ/Embrapa
Ubiraci Gomes de Paula Lana	012.034.146-84	Coorientador	DS	Embrapa
Christiane Abreu de Oliveira Paiva	980.429.396-04	Coorientador	DS	Embrapa
Diego Mauricio Riaño Pachón	236.044.238-48	Membro	DS	USP
Vera Lúcia Dos Santos	586.059.246-91	Membro	DS	UFMG

Título definitivo da Dissertação: Análise genômica e monitoramento de bactérias promotoras de crescimento de plantas

Em sessão pública após exposição de 40 min. O candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca durante o período de 120 min., tendo a banca chegado ao seguinte resultado:

Aprovação por unanimidade.

Aprovação somente após satisfazer as exigências que constam na folha de modificações, no prazo fixado pela banca (não superior a quarenta e cinco dias).

Reprovação.

Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata, que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima relacionada e pelo candidato.

Local e data: Sete Lagoas, 19 de dezembro de 2023,

Sylvia Moraes de Sousa Tinôco (Presidente): _____

Ubiraci Gomes de Paula Lana (Coorientador): _____

Christiane Abreu de Oliveira Paiva (Coorientador): _____

Diego Mauricio Riaño Pachón (Membro 1): _____

Vera Lúcia Dos Santos (Membro 2): _____

Samuel Felipe Azevedo Galvão (Candidato): _____

Coordenador do Programa: _____
Prof. Dr. Antônio Márcio Rodrigues

Obs.: O aluno deverá encaminhar à coordenação do curso, no prazo máximo de 45 dias os exemplares definitivos da dissertação ou tese.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO,
ADMINISTRAÇÃO E CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 19/12/2023

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 3/2023 - PPBE (13.03)

(Nº do Protocolo: 23122.000027/2024-05)

(Assinado digitalmente em 02/01/2024 10:49)

ANTONIO MARCIO RODRIGUES

COORDENADOR DE CURSO - TITULAR

PPBE (13.03)

Matricula: ###876#0

(Assinado digitalmente em 24/01/2024 15:54)

CHRISTIANE ABREU DE OLIVEIRA PAIVA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.396-##

(Assinado digitalmente em 02/01/2024 10:58)

VERA LÚCIA DOS SANTOS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.246-##

(Assinado digitalmente em 08/01/2024 10:31)

SYLVIA MORAIS DE SOUZA TINOCO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.018-##

(Assinado digitalmente em 02/01/2024 13:12)

DIEGO MAURICIO RIAÑO PACHÓN

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.238-##

(Assinado digitalmente em 12/01/2024 11:59)

UBIRACI GOMES DE PAULA LANA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.146-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: **3**, ano: **2023**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **02/01/2024** e o código de verificação: **f2d861b0ee**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Sueli e Geovani, pelo apoio incondicional durante essa jornada, vocês foram meu porto seguro e minha maior motivação.
Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais Sueli e Geovani, por me proporcionar a condição de realizar esta conquista.

À minha orientadora Dra. Sylvia e coorientadores Dr. Ubiraci e Dra Christiane, pela paciência, dedicação, e por terem compartilhado seus conhecimentos e suas experiências que foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

À banca examinadora, Dra. Vera e Dr. Diego, pelas correções e críticas que contribuíram para o aprimoramento desta pesquisa.

À Universidade Federal de São Joao del-Rei, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Bioengenharia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e amparo à pesquisa.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela estrutura e recursos disponibilizados para a realização deste trabalho e pela minha formação pessoal e profissional.

Aos funcionários da Embrapa Milho e Sorgo, por todo apoio na realização do trabalho.

E a todos que de forma direta ou indireta participaram desta conquista, muito obrigado!

GALVÃO, Samuel Felipe Azevedo (MS). Universidade Federal de São João del-Rei, dezembro de 2023. **ANÁLISE GENÔMICA E MONITORAMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**. Orientadora: Sylvia Morais de Sousa Tinôco. Coorientadores: Ubiraci Gomes de Paula Lana e Christiane Abreu de Oliveira Paiva

RESUMO

O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) é benéfico para uma agricultura mais sustentável. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o genoma de três linhagens de BPCP e desenvolver e testar marcadores moleculares específicos para seu monitoramento em plântulas de milho após a inoculação das sementes. O sequenciamento do genoma das cepas B116, B119 e B2084 da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 4000 e estratégia final de 150 *paired-end*. Os softwares RAST e PROKKA foram utilizados para a anotação funcional do genoma. As sequências concatenadas foram alinhadas usando o programa ClustalW e as árvores filogenéticas foram construídas usando o software MEGA X com um método de ML baseado em distância calculado pelo modelo GTR com GD discreto e 1000 bootstraps, pelo software JModelTest. A metodologia Kmer foi utilizada para identificar regiões genômicas únicas e o Primer3plus e Primer-BLAST foram usados para confirmar a especificidade e qualidade dos oligonucleotídeos específicos para análise de PCR em tempo real. Os oligonucleotídeos foram validados e testados em plantas de milho cultivadas em condições hidropônicas até 22 dias após a inoculação. Todas as estirpes apresentaram diferentes categorias de PGPB, incluindo metabolismo de fósforo, aminoácidos e derivados, metabolismo de nitrogênio, metabólitos secundários, metabolismo e aquisição de ferro e motilidade e quimiotaxia. Foram observados 292 genes responsáveis pela promoção de crescimento na estirpe B116, 268 genes na estirpe B119 e 167 na estirpa B2084. Sendo 61 destes genes exclusivos para B116, 33 para a estirpe B119, enquanto a estirpe B2084 não apresentou nenhum gene exclusivo relacionado a promoção de crescimento. As estirpes B116, B2084 e B119 foram classificadas como *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis* e *Prestia megaterium*,

respectivamente. Após a validação de um par de oligonucleotídeos específicos para cada estirpe foram feitos experimentos de monitoramento na planta. A estirpe B119 foi encontrada nas sementes após um dia, enquanto as estirpes B116 e B2084 após três dias pós-inoculação. A B2084 foi mais abundante na parte aérea após 10 dias, enquanto as demais linhagens foram mais abundantes na semente do que na raiz e na parte aérea. Os resultados indicaram que essas estirpes possuem diferentes genes associados aos mecanismos de crescimento das plantas, assim como padrões de colonização distintos.

Palavras-Chave: *Bacillus*; genoma; marcadores moleculares; PCR em tempo real; *Prestia*.

GALVÃO, Samuel Felipe Azevedo (MS). Universidade Federal de São João del-Rei, dezembro de 2023. **GENOMIC ANALYSIS AND MONITORING OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA.** Orientadora: Sylvia Morais de Sousa Tinôco. Coorientadores: Ubiraci Gomes de Paula Lana e Christiane Abreu de Oliveira Paiva

ABSTRACT

The use of plant growth promoting bacteria (PGPB) is beneficial for more sustainable agriculture. The objective of this work was to characterize the genome of three BPCP strains and develop and test specific molecular markers for monitoring them in maize seedlings after seed inoculation. The genome sequencing of strains B116, B119 and B2084 from the Embrapa Milho and Sorgo Multifunctional Microorganism Collection was carried out using the Illumina HiSeq 4000 platform and a final strategy of 150 pair-end. The RAST and PROKKA software were used for functional annotation of the genome. Concatenated sequences were aligned using the ClustalW program and phylogenetic trees were constructed using MEGA X software with a distance-based ML method calculated by the GTR model with discrete GD and 1000 bootstraps, as directed by JModelTest software. The Kmer methodology was used to identify unique genomic regions and Primer3plus and Primer-BLAST were used to confirm oligonucleotide specificity and quality for real-time PCR analysis. The oligonucleotides were validated and tested on maize plants grown in hydroponic conditions up to 22 days after inoculation. All strains presented different categories of PGPB, including phosphorus metabolism, amino acids and derivatives, nitrogen metabolism, secondary metabolites, iron metabolism and acquisition and motility and chemotaxis. The strain B116 presented 292 genes responsible for promoting growth, the strains B119 presented 268 genes, while strain B2084 presented 167 genes. Out of this, 61 were exclusive to B116, 33 to strain B119 and, on the other hand, strain B2084 did not present any exclusive gene related to plant growth promotion. Strains B116, B2084 and B119 were classified as *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis* and *Prestia megaterium*, respectively. After validating a pair of specific oligonucleotides for each strain, monitoring experiments were carried out in plant. The B119 strain was observed in the seeds after one day, while the B116 and B2084 strains after three days post-

inoculation. B2084 was more abundant in the shoot after 10 days, while the other strains were more abundant in the seed than in the root and shoot. The results indicated that these strains have different genes associated with plant growth mechanisms, as well as distinct colonization patterns.

Key words: *Bacillus*; genome; molecular markers; *Prestia*; real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Grupos de genes encontrados nas estirpes estudadas, os grupos funcionais foram separados com base nas anotações estruturais realizadas nos softwares PROKKA, RAST, BUSCO e PANZER.....27
- Figura 2.** Genes responsáveis pela formação do flagelo identificados nos genomas das estirpes bacterianas B116, B119 e B2084. As vias foram construídas com o auxílio do KEEG pathway database, os genes presentes foram identificados com os softwares PROKKA e RAST.....29
- Figura 3.** Diagrama de Venn relacionando todos os genes encontrados nas estirpes B116, B119 e B2084. Diagrama montado com o auxílio da anotação estrutural feita pelos softwares Prokka e Rast utilizando a plataforma jVenn (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/index.html>).....31
- Figura 4.** Diagrama de Venn de todos os genes relacionados à promoção de crescimento de plantas presentes nas estirpes B116, B119 e B2084. Diagrama montado com o auxílio da anotação estrutural feita pelos softwares Prokka e Rast utilizando a plataforma jVenn (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/index.html>).....33
- Figura 5.** Árvore filogenética baseada em sequências concatenadas de vinte e seis genes (*AcsA*, *ArgS*, *CcpA*, *DeoD*, *DnaJ*, *FumC*, *GuaA*, *GyrA*, *GyrB*, *IlvD*, *LeuS*, *LonA*, *LonB*, *MetG*, *MutL*, *MutS*, *Nth*, *Pgi*, *PoIA*, *Pura*, *Pyc*, *PyrE*, *RecA*, *RpoB*, *SecA* e *TrpB*), mostrando a relação filogenética entre membros do gênero *Bacillus* e *Priestia*. Esta árvore foi gerada com o software MEGA 11 (1000 bootstraps) sob o modelo GTR selecionado por jModelTest e com distribuição GD. A estirpe PAO1 de *Paenibacillus macerans* foi usada como grupo externo.35
- Figura 6.** Curvas de amplificação obtidas nos testes de amplificação com os oligonucleotídeos desenvolvidos para as estirpes B116, B19 e B2084. **A:** B116_P1 Ct: 10,529; **B:** B116_P2 Ct: 11,661; **C:** B116_P3 Ct: 21,204; **D:** B119_P1 Ct: 20,236; **E:** B119_P2 Ct: 13,219; **F:** B119_P3 Ct: 13,742; **G:** B2084_P1 Ct: 10,078; **H:** B2084_P2 Ct: 14,036; **I:** B2084_P3 Ct: 16,013. O Ct descrito se refere ao valor médio para as três repetições.....37
- Figura 7.** Curvas de dissociação obtidas no teste de amplificação para as estirpes B116, B118 e B2084 para os oligonucleotídeos **(A)** B116_P1; **(B)** B116_P2; **(C)**

B116_P3; **(D)** B119_P1; **(E)** B119_P2; **(F)** B119_P3; **(G)** B2084_P1; **(H)** B2084_P2, **(I)** B2084_P3.....38

Figura 8. Curvas de amplificação dos oligonucleotídeos específicos testados na estirpe alvo e nas outras estirpes estudadas. (A)Oligonucleotídeo B116_P1 nas estirpes B119 e B2084; (B) Oligonucleotídeo B116_P2 nas estirpes B119 e B2084; (C) Oligonucleotídeo B116_P3 nas estirpes B119 eB2084; (D) Oligonucleotídeo B119_P1 nas estirpes B116 e B2084; (E) Oligonucleotídeo B119_P2 nas estirpes B116 e B2084; (F) Oligonucleotídeo B119_P3 nas estirpes B116 eB2084; (G) Oligonucleotídeo B2084_P1 nas estirpes B116 e B119; (H) Oligonucleotídeo B2084_P2 nas estirpes B116 e B119; (I) Oligonucleotídeo B2084_P3 nas estirpes B116 e B119.....39

Figura 9. Curva padrão obtida através da amplificação do DNA alvo em diferentes diluições para os oligonucleotídeos desenvolvidos para as estirpes B116, B119 e B2084.....40

Figura 10. Monitoramento das estirpes B116, B119 e B2084 inoculadas no genótipo CMSM036 de milho. As coletas foram realizadas a cada 24 horas até o surgimento de raiz e parte aérea nas sementes, e após este período as coletas foram realizadas a cada 3 dias.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes utilizados na análise filogenética das estirpes B116, B119 e B2084.	18
Tabela 2. Estirpes bacterianas utilizados na análise filogenética.	19
Tabela 3. Oligonucleotídeos estirpe-específicos desenvolvidos para as estirpes bacterianas B116, B119 e B2084.	20
Tabela 4. Características gerais do genoma de três estirpes bacterianas promotoras de crescimento de plantas. Dados obtidos por meio de análise com os softwares Rast e Quast.	25
Tabela 5. Número de genes exclusivos relacionados a promoção de crescimento presentes nas estirpes B116, B119 e B2084.	34
Tabela 6. Eficiência dos oligonucleotídeos desenvolvidos (%).	41
Tabela 7. Resumo da análise de variância para características radiculares e peso seco do genótipo de milho inoculado com as estirpes B116, B119 e B2084.	43
Tabela 8. Resumo das análises de variância para características radiculares e peso seco de plântulas de milho inoculadas com as estirpes promotoras de crescimento (B116, B119 e B2084).	44
Tabela S1. Genes relacionados a promoção de crescimento encontrados nas estirpes B116, B119 e B2084.	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO	4
2.2 INTERAÇÃO PLANTA MICRORGANISMO.....	4
2.3 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO das BPCPs	5
2.3.1 Fixação de nitrogênio	5
2.3.2 Solubilização de fosfato	6
2.3.3 Produção de sideróforos.....	7
2.3.4 Produção de exopolissacarídeos (eps) e formação de biofilme.....	7
2.3.5 Fitormônios.....	8
2.4 O GÊNERO <i>BACILLUS</i> / <i>PRIESTIA</i>	10
2.5 MECANISMOS DE COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA DAS BPCPS.....	11
2.5.1 Quimiotaxia e formação de biofilme.....	11
2.5.2 Colonização da raiz pelas bactérias	12
2.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	13
2.7 MÉTODOS UTILIZADOS NO MONITORAMENTO DE BPCPs	13
2.8 MONITORAMENTO DA PRESENÇA DA BACTÉRIA NA PLANTA POR PCR EM TEMPO REAL.....	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 ANOTAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS GENOMAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS B116, B119 E B2084	17
4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ESTIRPES B116, B119 E B2084.....	17
4.3 IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MARCADORES ESTIRPE ESPECÍFICOS.....	19

4.3.1. Desenvolvimento de marcadores estirpe-específicos.....	19
4.3.2. Crescimento das estirpes bacterianas, extração de dna e validação de marcadores estirpe-específicos.	20
4.4 MONITORAMENTO DAS ESTIRPES INOCULADAS EM PLÂNTULAS DE MILHO	21
4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS COM CEPAS BACTERIANAS B116, B119 e B2084.....	23
5. RESULTADOS	25
5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GENOMAS ESTUDADOS.....	25
5.2 ANÁLISE DO GENOMA DAS ESTIRPES B116, B119 E B2084	26
5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA	34
5.4 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO, ESPECIFICIDADE E EFICIÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESTIRPE-ESPECÍFICOS	35
5.5 MONITORAMENTO DAS ESTIRPES INOCULADAS EM PLÂNTULAS DE MILHO	41
5.6 AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO I	65

1. INTRODUÇÃO

Com uma grande participação no produto interno bruto brasileiro (PIB), o agronegócio é responsável pela geração de milhares de empregos, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento econômico do país (Cruz *et al.*, 2017). Um dos maiores desafios enfrentados pelos agricultores no Brasil é o custo de produção, que tem sido impactado significativamente pelo uso de fertilizantes químicos sintéticos (Bosoki *et al.*, 2017). Além disso, o uso excessivo desses insumos pode gerar desequilíbrios ambientais, como alteração da microbiota existente no solo e eutrofização em rios e lagos (Diaz *et al.*, 2018).

Uma alternativa para reduzir o uso dos fertilizantes químicos sintéticos, e consequente diminuição do custo da produção e do impacto causado ao meio ambiente, consiste na utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (Diaz *et al.*, 2018). As BPCPs podem colonizar e promover o crescimento de plantas, aumentando a biomassa, área de superfície radicular para a obtenção de nutrientes e tolerância a estresses. Assim, diversos esforços têm sido direcionados para a identificação e caracterização deste grupo de microrganismos visando o desenvolvimento de formulações para uso comercial. Estudos com BPCP vêm sendo realizados como uma alternativa sustentável ao uso de fertilizantes químicos há muito tempo. No entanto, a maioria dos estudos não inclui rastreamento ou monitoramento das BPCP no ambiente após a sua inoculação, sem confirmação da colonização e estabelecimento bacteriano na rizosfera ou tecidos das plantas. Dentre as BCPS, o gênero *Bacillus* representa uma fração significativa da microbiota presente no solo, possuindo características de interesse que conferem a este gênero vantagens para sua utilização em formulações comerciais e a sua aplicação em campo. A capacidade de formar endósporos resistentes ao calor e à dessecação favorece a sobrevivência em ambientes com condições físicas e químicas estressantes, tornando-os fortes candidatos para a produção de bioinoculantes (Doaa *et al.*, 2022).

Um bioinoculante é um produto com uma ou mais estirpes de microrganismos que atuam beneficiando o desenvolvimento de uma planta (Conceição *et al.*, 2009). Podem atuar por meio de mecanismos como, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo ou mobilização de ferro, podendo ainda produzir fitormônios como ácido indolacético (AIA), citocinina e giberelina. Ou ainda por meio da supressão do crescimento,

infecção ou diminuição dos efeitos negativos de fitopatógenos através de produção de antibióticos e enzimas líticas, competição por nutrientes, ou resistência sistêmica induzida contra patógenos (Akinrinlola *et al.*, 2018).

Diversos estudos demonstram que o uso de inoculantes contendo bactérias solubilizadoras de fosfato têm aumentado significativamente o fósforo (P) disponível no solo e a sua absorção pelas plantas (Estrada-Bonilla *et al.*, 2021; Etesami *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2021). Estudos que vêm sendo realizados pela equipe da Embrapa Milho e Sorgo nos últimos 20 anos culminaram no desenvolvimento do bioproduto comercial BiomaPhos[®] que contém as cepas *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *B. megaterium* (CNPMS B119). Este inoculante líquido, recomendado para o tratamento de sementes ou para pulverização em sulcos de semeadura, associa-se à planta desde o início da formação das raízes (Oliveira-Paiva *et al.*, 2020). As bactérias presentes no produto multiplicam e colonizam a rizosfera vegetal, iniciando a produção de ácidos orgânicos que solubilizam o P fixado ao cálcio, ferro e alumínio presentes na rizosfera, tornando-o prontamente disponível para absorção e assimilação pela planta. Além disso, o BiomaPhos também atua na mineralização do P presente na matéria orgânica do solo (fitato), aumentando a disponibilidade desse elemento para a cultura. Desde o lançamento do inoculante, resultados positivos do uso do BiomaPhos estão sendo relatados pelos produtores em todo Brasil, tendo sido aplicado em uma área de cerca de 350 mil hectares somente em 2019 (Oliveira-Paiva *et al.*, 2020). Atualmente, o inoculante já foi avaliado em mais de 500 áreas comerciais de lavoura de milho e de soja e se encontra em expansão de uso e registro para diversas culturas. Avaliações realizadas em áreas com a produção de milho onde foram feitas aplicações de P, indicaram um ganho médio de produtividade de 8,9% com a aplicação do produto (Oliveira-Paiva *et al.*, 2020).

É importante identificar e conhecer os mecanismos utilizados pelas estirpes bacterianas, que podem atuar de maneira direta ou indireta na promoção do crescimento de plantas. Nesse sentido, a análise do genoma das estirpes possibilita a identificação de genes responsáveis por produzir compostos que podem auxiliar na promoção de crescimento de plantas, como genes ligados à produção de ácidos orgânicos, fitormônios, antibióticos, entre outros. Além disso, possibilitam o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para a identificação e quantificação dessas bactérias de interesse, permitindo o monitoramento da sua colonização e estabelecimento na planta, tanto em experimentos em campo, casa de

vegetação ou *in vitro*. Além disso, auxiliam as empresas produtoras de bioprodutos estipularem um tempo de prateleira adequado para os inoculantes, e monitorarem a utilização indevida dessas estirpes em bioinoculantes não licenciados (Vikram *et al.*, 2016).

Uma das técnicas utilizadas no monitoramento de estirpes de BPCP é a PCR em tempo real. Esta técnica é considerada um método rápido que integra alta sensibilidade e especificidade para a quantificação dos microrganismos presentes em amostras complexas (Gong *et al.*, 2016). É baseada na detecção em tempo real da concentração de ácidos nucleicos gerada após cada ciclo de amplificação por meio da utilização de corantes, oligonucleotídeos e/ou sondas fluorescentes específicas que hibridizam com a sequência de interesse. Essa técnica tem sido utilizada com sucesso na quantificação de microrganismos inoculados em plantas incluindo o milho (Walker *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014; Balsanelli *et al.*, 2016).

Recentemente, pesquisadores da Embrapa sequenciaram o genoma de duas estirpes de BPCP pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, CNPMS B116 (*B. thuringiensis*) e CNPMS B119 (*B. megaterium*). Em seus genomas, foi detectada a presença de genes relacionados a produção de exopolissacarídeos, fixação de nitrogênio, AIA, sideróforos e fosfatases, dentre outros (Velloso *et al.*, 2020). No entanto, ainda se torna necessário identificar regiões únicas que possam servir de base para gerar marcadores estirpe específicos.

Além disso, havia necessidade de sequenciar o genoma da estirpe CNPMS B2084, também componente do bioinoculante BiomaPhos e compreender os mecanismos relacionados à promoção de crescimento e colonização das plantas. Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar o genoma das estirpes CNPMS B116, CNPMS B119 e CNPMS B2084 e desenvolver marcadores moleculares cepa-específicos para o seu monitoramento visando conhecer o padrão e a eficiência do processo de colonização das plantas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) podem aumentar o crescimento das plantas e protegê-las contra diversos fatores como ataques de patógenos, estresses bióticos e abióticos por meio de uma série de mecanismos que atuam de maneira direta e indireta para essa função (Souza *et al.*, 2015; Jaiswar *et al.*, 2023; Bittencourt *et al.*, 2023).

Diversos fatores bióticos como espécie hospedeira, genótipo, e idade da planta podem impactar diretamente na estrutura das comunidades microbianas que estão associadas a planta, assim como fatores abióticos que influenciam na fisiologia da planta hospedeira (Bodenhause *et al.*, 2013). Por exemplo, a comunidade microbiana que reside na filosfera (parte aérea da planta) convive em um ambiente pobre em nutrientes e com fatores como temperatura, umidade, e incidência de radiação UV flutuantes. Já a comunidade microbiana que se encontra na rizosfera reside dentro de um ambiente que é rico em nutrientes devido aos produtos exsudados pelas plantas para atrair microrganismos benéficos e combater patógenos (Bodenhause *et al.*, 2013).

A busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis tem alavancado a pesquisa e o interesse no uso de BPCP, pois seu uso pode levar à redução e/ou substituição do uso de fertilizantes químicos, minimizando impactos ambientais e com um menor custo para o produtor.

2.2 INTERAÇÃO PLANTA MICRORGANISMO

A rizosfera pode ser entendida como a área de atividade microbiana em torno das raízes, e também como a porção de solo afetada pelos exudatos radiculares e colonizado pelas rizobactérias (Hiltner 1904; Pinton *et al.*, 2007).

As plantas são capazes de fornecer uma infinidade de nichos para a proliferação de diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários,

nematoides e vírus. Os microrganismos podem formar associações complexas com as plantas e têm papéis importantes no aumento da produtividade e da saúde da planta em ambientes naturais. A comunicação entre plantas e microrganismos se dá por meio de trocas de sinais que são produzidos e liberados pelas plantas como os exsudatos radiculares, que representam um custo significativo de carbono para a planta, sendo substâncias altamente complexas cujas composições podem ser influenciadas por diversos fatores, incluindo as espécies e genótipos das plantas. Além disso, os microrganismos que residem na rizosfera podem produzir sinais por meio da produção de moléculas análogas aos fitormônios e compostos orgânicos voláteis (COV) (Chagas *et al.*, 2018; Sasse *et al.*, 2018).

Os principais grupos de BPCPs pertencem ao filo *Firmicutes*, que incluem bactérias do gênero *Bacillus*, e filo *Proteobacteria*, que inclui os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Psychrobacter*, *Enterobacter* e *Rahnella* (Batista *et al.*, 2018).

2.3 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO das BPCPs

As bactérias promotoras de crescimento são capazes de promover o crescimento das plantas de maneira direta ou indireta. De maneira direta podem atuar facilitando a aquisição de nutrientes como nitrogênio, fósforo e minerais essenciais via fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e sequestro de ferro por sideróforos ou modulando níveis de hormônios vegetais, através da produção, inibição ou estímulo de fitormônios como auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno. De maneira indireta podem atuar por meio da competição ou antibiose (biocontrole), resistência sistêmica induzida e biossíntese de fitormônios relacionados ao estresse biótico, como o ácido jasmônico e ácido salicílico (Velloso *et al.*, 2020).

2.3.1 Fixação de nitrogênio

O nitrogênio é um dos principais nutrientes e fatores limitantes para o desenvolvimento das plantas. Cerca de 78% de todo o nitrogênio disponível na atmosfera está na forma de N_2 sendo impossível sua assimilação pelas plantas. A

fixação biológica de nitrogênio envolve uma sucessão de processos que vão desde a adaptação da bactéria à planta até a conversão de N_2 atmosférico a amônia (NH_3), catalizada pelo complexo enzimático da nitrogenase, forma que pode ser utilizada pelas plantas (Mus *et al.*, 2016; Marchetti *et al.*, 2015).

As bactérias fixadoras de nitrogênio desenvolveram mecanismos para detectar vários sinais ambientais a fim de adaptar a fixação de nitrogênio às suas limitações fisiológicas, sendo que a disponibilidade de uma fonte de nitrogênio é um sinal regulatório chave que reprime o processo de fixação de nitrogênio. Em rizobactérias simbióticas, a transcrição de genes de fixação de nitrogênio (genes *Nif* e *Fix*) é induzida principalmente por condições de baixo teor de oxigênio. A detecção de baixo oxigênio e a transmissão deste sinal para o nível de expressão gênica *Nif* e *Fix* envolvem pelo menos cinco proteínas regulatórias, *FixL*, *FixJ*, *FixK*, *NifA* e *RpoN* (De Bruijn 2014).

2.3.2 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um dos nutrientes que mais limita o crescimento vegetal, sendo indispensável em quase todos os processos metabólicos da planta, incluindo a fotossíntese e respiração. Apesar de disponível no solo, ele se encontra muitas vezes na forma insolúvel e indisponível para assimilação pelas plantas, que absorvem apenas duas formas solúveis, o íon monobásico ($H_2PO_4^-$) e diabásico (HPO_4^{2-}) (Velloso *et al.*, 2020).

Devido à necessidade de suprir a baixa disponibilidade de P no solo, ocorrem aplicações frequentes de fertilizantes fosfatados que são rapidamente convertidos em formas insolúveis de P. O aumento da geometria e volume das raízes das plantas causado pela inoculação com BPCP aumenta a disponibilidade e o aporte deste nutriente para as plantas (Granada *et al.*, 2018). As BPCP podem ainda disponibilizar o P para as plantas através de mecanismos como a liberação de compostos de dissolução mineral como prótons, íons de hidroxila, sideróforos, CO_2 e ácidos orgânicos, além da liberação de enzimas extracelulares como as fosfatases para a mineralização do fosfato na forma bioquímica ou orgânica (Glick 2012).

2.3.3 Produção de sideróforos

O ferro é necessário para o crescimento e proliferação microbiana. Para sobreviver em ambientes com baixo teor de ferro, alguns microorganismos secretam quelantes de ferro férrico chamados sideróforos. Os sideróforos podem ser divididos em dois grandes grupos incluindo os sideróforos de hidroxamato derivados de vários ácidos, sendo os mais comuns o ácido acético e o anidromevalônico, e de catecolato, que possuem em sua estrutura dois átomos de oxigênio para quelar o ferro, formando um complexo octaédrico, como no caso dos sideróforos pertencentes ao grupo dos hidroxamatos, (Carroll *et al.*, 2018).

Existem dois mecanismos utilizados pelas bactérias para aumentar a disponibilidade de Fe. No primeiro, sideróforos microbianos com alta capacidade redox podem ser reduzidos para doar Fe^{2+} para o sistema de transporte da planta. Neste mecanismo se supõe que os sideróforos microbianos de Fe^{3+} são transportados para o apoplasto da raiz da planta onde pode ocorrer a redução dos sideróforos, e consequente aprisionamento do Fe^{2+} no apoplasto, o que leva a altas concentrações de Fe na raiz (Ahmed E Holmström, 2014; Mengel, 1994). No segundo, sideróforos microbianos podem quelar Fe do solo e então fazer uma nova troca de ligante com fitossideróforos. Este mecanismo depende de vários parâmetros, ou seja, as constantes de estabilidade e as concentrações de ambos microbianos e fitossideróforos, e as condições de pH e redox do ambiente radicular (Masalha *et al.*, 2000; Crowley, 2006).

2.3.4 Produção de exopolissacarídeos (EPS) e formação de biofilme.

Polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS) são subprodutos bacterianos com alto peso molecular, extensivamente estudados e atribuídos a diversas aplicações (Kranthi *et al.*, 2018). Eles são componentes estruturais e funcionais dos biofilmes microbianos desempenhando um papel vital na formação de bioagregados e na sobrevivência das células bacterianas em condições de dessecação, privação de nutrientes ou outras condições de estresse. São essenciais para manter funções celulares primárias e atividade antibacteriana, na biorremediação

de metais pesados, além de auxiliarem na fixação de nitrogênio, uma vez que altas concentrações de oxigênio interferem na ação da nitrogenase que é altamente sensível a este elemento (Kranthi *et al.*, 2018).

O biofilme é a agregação de células microbianas que estão irreversivelmente conectadas com a superfície biótica e abiótica e geralmente contidas em uma matriz formada de substâncias poliméricas extracelulares (SPEs). Os microrganismos liberam EPSs para promover o processo de fixação, a densidade celular do biofilme é alta, variando de 10^8 a 10^{11} de células (Ajijah *et al.*, 2023). Dentro do biofilme possuem diversas vantagens dentre elas proteger a planta de estresse externo, o aumento da adesão a superfícies, altas densidades populacionais, alta tolerância a agentes antimicrobianos (Mohammed 2018). Viver em biofilmes traz diversas vantagens as bactérias promotoras de crescimento, uma vez que melhora a resistência bacteriana a ambientes adversos e promove o aumento da captação de nutrientes liberados na rizosfera (Zhu *et al.*, 2020).

O papel direto da formação de biofilmes e capacidade de colonização foi confirmado por Meneses *et al.*, 2011. Estes autores identificaram um cluster de genes formadores de biofilme no genoma da bactéria fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, que foi considerado responsável pelo primeiro passo na produção de EPS. A estirpe mutante de PAL5 mostrou crescimento e fixação de nitrogênio quando cultivados em diferentes fontes de carbono, mas não produziram EPS ou biofilme. Além disso, a estirpe não conseguiu se prender eficientemente às raízes das plantas de arroz ou colonizar os tecidos internos. Assim, a produção de biofilme é uma característica que permite as BPCP sobreviver a diferentes tipos de estresse ambiental e, se manter ligadas às raízes das plantas, de onde elas podem exercer suas interações benéficas na rizosfera (Paulucci *et al.*, 2015).

2.3.5 Fitormônios

Os fitormônios estão entre os reguladores de crescimento mais importantes, sendo conhecidos por terem um importante impacto no metabolismo das plantas, além de desempenharem um papel vital na estimulação dos mecanismos de resposta de defesa da planta contra o estresse. A suplementação de fitormônios exógenos tem

sido adotada para obter um melhor crescimento e produção sob condições de estresse. A estimulação do crescimento de plantas e a aquisição de nutrientes por rizobactérias benéficas foi correlacionada à biossíntese de reguladores de crescimento de plantas incluindo as auxinas, giberelinas, citocininas etileno e ácido abscísico (Dilfuza *et al.*, 2017).

As auxinas são uma classe de pequenas moléculas capazes de induzir respostas de crescimento em plantas, sendo os primeiros fitormônios vegetais descobertos e estudados (Dilfuza *et al.*, 2017; Keswani *et al.*, 2020). As auxinas estão implicadas na maioria das mudanças relacionadas ao crescimento que ocorrem durante o ciclo de vida de uma planta. O ácido indol-3-acético (AIA) é o hormônio vegetal mais comum da classe das auxinas e regula vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, como a divisão celular, alongamento, diferenciação, desenvolvimento de frutos e resposta fototrópica. As plantas não são os únicos organismos capazes de sintetizar o AIA, microrganismos como bactérias, actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras também são capazes de produzir estes fitormônios (Keswani *et al.*, 2020).

As giberelinas tem a capacidade de regular vários processos de desenvolvimento fisiológico em plantas, incluindo germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, crescimento de caules e folhas, iniciação floral e crescimento de flores e frutos (Bilal *et al.*, 2018). A produção de giberelina já foi observada nos seguintes gêneros e espécies de *Achromobacter xylosoxidans*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum* (Olanrewaju *et al.*, 2017).

As citocininas influenciam vários processos do crescimento, desenvolvimento e fisiologia da planta, como germinação da semente, dominância apical, desenvolvimento da flor e fruto, senescência foliar e interações planta patógeno (Akhtar *et al.*, 2020). O tipo e atividade das moléculas de citocinina se diferem notavelmente entre diferentes espécies de plantas e tecidos, em diferentes estágios de desenvolvimento e sob várias condições ambientais (Akhtar *et al.*, 2020). Citocininas não são apenas produzidas por plantas, mas também por microrganismos, microalgas e insetos associados a plantas. Da mesma forma que as citocininas produzidas por bactérias, induzem resistência em *Arabidopsis* contra patógenos bacterianos. A citocinina pode preparar também as plantas para resistir ao ataque de

insetos estimulando a expressão gênica induzida por feridas e induzindo o acúmulo de compostos inseticidas (Akhtar *et al.*, 2020).

O etileno desempenha um papel proeminente na fisiologia das plantas e, como a maioria dos outros fitormônios, pode inibir ou promover o crescimento dependendo do tipo de célula e espécie de planta. É requerido para a quebra da dormência de sementes, expansão celular, aumento no número de raízes, indução ao florescimento, abscisão de folhas e frutos e amadurecimento dos frutos, além de estar envolvido em respostas a estresses bióticos e abióticos. Sua produção é normalmente regulada positivamente em resposta a estresses ambientais. Várias cepas bacterianas podem produzir etileno ou reduzir seus níveis (Ibort *et al.*, 2017).

O ácido abscísico (ABA) é bem conhecido por regular as relações hídricas das plantas. Também foi demonstrado que bactérias podem afetar o nível de ABA nas plantas, mas as alterações na concentração desse hormônio são interpretadas principalmente como um mecanismo de controle da condutância estomática, no entanto, esse hormônio pode influenciar muitos outros processos que ocorrem nas plantas desempenhando um papel fundamental nas respostas das plantas a estresses abióticos, como secas, encharcamento, salinidade e baixa temperatura (Arkhipova *et al.*, 2020; Shu *et al.*, 2018).

2.4 O GENÉRO *BACILLUS* / *PRIESTIA*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são em sua maioria gram-positivas, sendo formado por diversas bactérias de grande importância ambiental e em sua maioria não patogênicas. Seu habitat natural é o solo, mas podem ser encontradas também em água, folhas e grãos. A principal característica desse gênero de bactérias é sua capacidade de esporulação quando o ambiente se torna desfavorável, sendo capazes de produzir esporos que apresentam atividades metabólicas basais e são altamente resistentes, permanecendo em dormência até que as condições ambientais se tornem favoráveis novamente (Rabinovitch *et al.*, 2017).

O grupo *Priestia* antes denominado grupo *B. megaterium*, recentemente deixou de pertencer ao gênero *Bacillus*. Novos estudos demonstraram a importância de genes/proteínas como assinaturas conservadas de inserção (ACIs), que são compartilhadas exclusivamente por grupos evolutivos relacionados. As ACIs

demonstraram forte potencial para estudos evolutivos e taxonômicos (Gupta, 2014). Duas assinaturas conservadas de inserção foram encontradas presentes na proteína oligoribonuclease *NrnB*, produzida exclusivamente por um grupo de bactérias. Essas bactérias foram reclassificadas no grupo *Priestia*, que é composto por bactérias que antes pertenciam ao gênero *Bacillus*, como *B. megaterium*, *B. abyssalis*, *B. aryabhatai*, *B. endophyticus*, *B. filamentosus*, *B. flexus*, *B. koreensis*, *B. paraflexus*, *B. qingshengii*, *B. taiwanensis*, *B. pseudoflexus* e *B. zanthoxyli* (Gupta, *et al.*, 2020).

2.5 MECANISMOS DE COLONIZAÇÃO RIZOSFÉRICA DAS BPCPS

A maioria das bactérias associadas às plantas são provenientes do solo e podem migrar para a rizosfera e subsequentemente para o rizoplane de seus hospedeiros antes de serem capazes de promoverem efeitos benéficos para a planta. A compreensão dos processos de colonização é importante para prever melhor como as bactérias interagem com as plantas e se elas têm a probabilidade de se estabelecerem no ambiente da planta após a aplicação em campo como biofertilizantes ou agentes de biocontrole (Compant *et al.*, 2010).

2.5.1 Quimiotaxia e formação de biofilme

Os microrganismos são conhecidos por serem quimio atraídos e se moverem em direção aos exsudatos, permitindo que eles colonizem e se multipliquem tanto na rizosfera quanto no rizoplane. A capacidade de cepas de *Bacillus* em colonizar raízes de plantas depende de vários fatores como a quimiotaxia e formação de biofilme. Os exsudatos das raízes das plantas atraem as estirpes de *Bacillus*, que, por apresentarem quimiotaxia, migram em direção às raízes em resposta a esses estímulos químicos. A quimiotaxia e formação de biofilme são negativamente controladas pelo regulador de transcrição global *AbrB* que é um regulador pleiotrópico da expressão gênica com um papel na mediação da transcrição de um estado quiescente para um de crescimento e divisão celular e a transcrição do crescimento ativo para a fase estacionária (Weng *et al.*, 2013).

2.5.2 Colonização da raiz pelas bactérias

A colonização das raízes pelas bactérias marca o primeiro passo físico ancorando as bactérias no ambiente rico em nutrientes da rizosfera e garantindo uma localização privilegiada para o seu desenvolvimento e subsequente associação mais íntima. A colonização das raízes envolve duas fases, a fixação primária, caracterizada pela ligação reversível da bactéria à superfície da raiz, seguida pela fixação secundária que resulta em sua adesão irreversível (Knights *et al.*, 2021; Wheatley *et al.*, 2018).

2.5.2.1 Colonização primária

A colonização primária envolve ligações fracas, não específicas e reversíveis mediadas por interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre células e moléculas de superfície adjacentes na raiz (Knights *et al.*, 2021; Van Loosdrecht *et al.*, 1987; Kendall e Roberts, 2015). Isso se deve principalmente a repulsão eletrostática que ocorre entre a membrana bacteriana com carga negativa e a raiz da planta com carga positiva. Para superar essas forças de repulsão as bactérias usam flagelos e o pili para se propelirem em direção a superfície da raiz. Após as interações iniciais, as adesinas presentes na superfície celular mediam uma associação mais firme, mas ainda reversível com a raiz. As adesinas bacterianas envolvidas na fixação primária incluem apêndices proteicos (flagelos, pelos, fímbrias), proteínas de superfície e polissacarídeos (exopolissacarídeos e capsulares). O uso dos flagelos e do pili como adesinas permitem que as bactérias não só se movam para a raiz, mas que se fixem e migrem através da superfície da raiz (Berne *et al.*, 2015; Knights *et al.*, 2021; Wheatley *et al.*, 2018).

2.5.2.2 Colonização secundária

A colonização secundária envolve uma forte ligação irreversível da bactéria com a raiz através da síntese de fibrilas de celulose extracelulares e de fatores de fixação secundários específicos de cada espécie. A biossíntese, expressão ou exposição dessas fibrilas geralmente ocorre após uma fixação primária bem-sucedida.

A ligação secundária culmina na formação de micro colônias bacterianas na raiz e garante que as bactérias permaneçam no rizoplane. Para muitas bactérias, isso é essencial para a colonização endofítica subsequente (Matthysse, 1983; Ausmees *et al.*, 1999; Martinez-Gil *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2012; Kandel *et al.*, 2017).

2.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Tecnologias recentes de sequenciamento de DNA como Illumina (Solexa), Ion Torrent, PacBio Biosciences e Oxford Nanopore vêm reduzindo o custo do sequenciamento de genomas completos de microrganismos benéficos, como as BPCPs, possibilitando um melhor conhecimento de tais bactérias, além da caracterização total de genes e de suas estruturas genômicas e fisiológicas (Velloso *et al.*, 2020). A utilização de ferramentas de bioinformática complementa os métodos de sequenciamento para a anotação do genoma, a construção das vias metabólicas juntamente com análises comparativas dos genomas sequenciados e fundamental para o entendimento dos mecanismos de promoção de crescimento em plantas (Ahmed, 2009; Berendsen *et al.*, 2015; Igiehon *et al.*, 2019; Wanhg *et al.*, 2022). Métodos de sequenciamento de nova geração, como as técnicas baseadas em Illumina, baseada em sequenciamento baseado em síntese (SBS) com uma tecnologia de terminação reversível marcada com fluorescência, podem fornecer uma maneira mais direta de detectar táxons microbianos no solo, especialmente as mudanças em espécies de baixa abundância, e explorar a comunidade microbiana total no ambiente (Anothai *et al.*, 2022).

2.7 MÉTODOS UTILIZADOS NO MONITORAMENTO DE BPCPs

Métodos baseados em genes repórteres, reações imunológicas e ácidos nucleicos têm sido aplicados para rastrear ou monitorar BPCP em sementes, solos, ou *in planta* após a inoculação (Rilling *et al.*, 2019).

O gene repórter é um gene que está ligado a uma sequência reguladora de um gene alvo, que pode ser usado para detectar a presença ou expressão deste gene. São comumente identificados visualmente por cor, luminescência ou fluorescência,

mas diversas questões devem ser avaliadas ao utilizar tal método para o monitoramento de BPCPs. Genes repórteres devem ser específicos, estáveis, e previamente testados em bactérias alvo no ambiente. A estabilidade é essencial para garantir a persistência do marcador e prevenir a transferência horizontal de genes da BPCP inoculada para as bactérias nativas (Rilling *et al.*, 2019; Gamalero *et al.*, 2003).

Métodos associados imunologia são também aplicados para rastrear e monitorar BPCPs. Tais métodos são baseados na utilização de anticorpos, que são conjugados com enzimas, isótopos, nanopartículas ou fluorocromos para detectar e/ou quantificar as interações antígeno-anticorpo. O uso destes métodos em habitats complexos como rizosferas deve: i) localizar o determinante antigênico na superfície celular, ii) não apresentar uma reação cruzada, iii) permitir a estabilização do determinante antigênico *in situ*, e iv) possuir alta afinidade pelo antígeno (Schloter *et al.*, 1996; Rilling *et al.*, 2019).

Há ainda os métodos baseados em ácidos nucleicos DNA ou RNA, onde as BPCPs podem ser monitoradas através da detecção de padrões de impressões digitais ou sequências específicas (Podile E Kishore, 2006). Tais abordagens podem ser agrupadas em métodos independentes ou dependentes de PCR. Os métodos independentes de PCR baseiam-se principalmente na clivagem ou hibridação do DNA com sondas que permitem a detecção de cepas alvo. Dentre os métodos independentes de PCR o mais usado é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) que pode detectar cepas de BPCPs *in situ* utilizando microscopia de epifluorescência (Gamalero *et al.*, 2003; Podile e Kishore, 2006; Compant e Mathieu, 2013). De modo geral, BPCPs inoculadas no solo rizosférico são rastreadas com métodos de análise da comunidade, como eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal (T-RFLP), análise de espaçador intergênico ribossômico automatizado (ARISA) e análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA). Variações da técnica de PCR, como PCR de número mais provável (MPN-PCR), competitiva (C-PCR) ou quantitativa (qPCR) também têm sido utilizadas (Gamalero *et al.*, 2003).

2.8 MONITORAMENTO DA PRESENÇA DA BACTÉRIA NA PLANTA POR PCR EM TEMPO REAL

Os métodos baseados em PCR podem detectar DNA/RNA em baixas concentrações, mas sua precisão pode ser comprometida por uma série de fatores incluindo depleção de reagentes, competição de amplicons com oligonucleotídeos e a perda da atividade da DNA polimerase conforme o número de ciclos de amplificação aumenta. Para superar essa deficiência, a técnica conhecida como PCR quantitativo em tempo real é uma modificação da PCR que permite a quantificação precisa de ácidos nucleicos específicos em uma mistura complexa por detecção fluorescente de produtos marcados da PCR. Esta técnica surgiu para a detecção de microrganismos em baixas concentrações, pois monitora a quantidade de produtos da PCR conforme eles são amplificados em tempo real. A partir da alteração da concentração do produto de PCR ao longo dos ciclos de amplificação, a concentração inicial do DNA/RNA alvo pode ser estimada, podendo ser também usada na quantificação dos níveis de expressão gênica e número de cópias de um determinado alvo (Gallagher *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2022).

Trabalhos realizados demonstram a possibilidade da identificação e quantificação de microrganismos promotores de crescimento tanto em experimentos em laboratório quanto em campo. Silke *et al.* (2006) utilizando a cepa *Enterobacter radicincitans* em plantas de *Brassica oleracea* nas folhas e raízes demonstrou aumentos significativos no crescimento da raiz, folha e tubérculo. O número total de células bacterianas foi estimado usando PCR em tempo real, sendo apresentada uma colonização significativa da raiz com uma densidade de 10^7 células g^{-1} de peso fresco da raiz até, pelo menos, 14 dias após a inoculação. Isso é equivalente a uma proporção dos números de cópias do gene *16S rDNA* de *E. radicincitans* em comparação com o total de comunidades bacterianas de cerca de 10-16%.

Estudos realizados por Pedrolo *et al.*, 2022 utilizando *Herbaspirillum seropedica* onde foi desenvolvido um ensaio de PMA-qPCR (qPCR associado ao corante monoazida de propídio) para avaliar células viáveis de *H. seropedicae* em cultura pura e raízes de milho cultivadas in vitro demonstraram que O limite de detecção (LOD) foi de 10^1 cópias do genoma, correspondendo a 60,3 pg de DNA. A enumeração obtida em culturas puras por qPCR, PMA-qPCR e contagem de placas foi de $8,85 \pm 0,16$, $6,51 \pm 0,12$ e $2,25 \pm 0,30$ log UFC.mL⁻¹ após o tratamento térmico, respectivamente. Demonstrando que o PMA-qPCR é uma abordagem poderosa para quantificar células viáveis e viáveis, mas não cultiváveis em inoculantes e plantas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os genomas de três estirpes de bactérias promotoras de crescimento e monitorar o processo de colonização em plantas utilizando marcadores estirpe-específicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes e mecanismos relacionados à promoção de crescimento em plantas de três estirpes de BPCP.
- Desenvolver marcadores específicos para três estirpes de BPCP.
- Monitorar o processo de colonização de três estirpes de BPCP em plântulas de milho.
- Avaliar a promoção de crescimento das estirpes estudadas em plântulas de milho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANOTAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS GENOMAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS B116, B119 E B2084

O sequenciamento dos genomas das estirpes B116 e B119, isoladas da rizosfera, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo foi realizado por Velloso *et al.* (2020), utilizando a plataforma Illumina Hiseq 4000 e a estratégia 150-paired end (Illumina, San Diego, CA, EUA) no Beijing Genomics Institute BGI (Shenzhen, China). A estirpe B2084, isolada da filosfera, foi recentemente sequenciada pela empresa GoGenetic (Brasil) utilizando a plataforma Illumina Hiseq 4000 usando a estratégia *150-paired end* (Illumina, San Diego, CA, EUA). As reads sequenciadas foram montadas usando o software SOAPdenovo v1.05.

As sequências genômicas pré-montadas foram anotadas utilizando o software RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). A anotação funcional foi feita com os softwares Protein ANNotation with Z-scoRE - PANNZER (Conesa *et al.*, 2005) e a anotação manual via BlastP de genes relacionados à produção de ácidos orgânicos, metabolismo de fósforo, fitohormônios, compostos orgânicos voláteis (COVs), produção de metabólitos secundários, fixação de nitrogênio, aquisição e metabolismo de ferro, metabolismo de enxofre, respostas a estresse, dentre outros. Anotações funcionais adicionais com as bases de dados biológicos COG (Cluster of Ortholog Groups) e KO (KEGG Orthology) foram realizadas agrupando os genes em grupos ortólogos e categorias funcionais, utilizando o programa eggNOG e BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2015). Para a criação dos diagramas de Venn correlacionando os genes totais e relacionados a promoção de crescimento foi utilizado o software on-line Jvenn (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/index.html>) (BARDOU *et al.*, 2014)

4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ESTIRPES B116, B119 E B2084

A análise filogenética da estirpe B2084 foi feita de acordo com o descrito por Velloso *et al.* 2020 para as estirpes B116 e B119 e foram realizadas análises adicionais afim de obter mais dados dos genomas. As sequências de vinte e seis genes (Tabela 1) das diferentes estirpes foram concatenadas, o alinhamento realizado usando o programa ClustalW e as árvores filogenéticas construídas usando o software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2018) com o método de máxima verossimilhança baseado na distância (ML), calculada pelo modelo GTR (Gene Time Reversible) com distribuição gama discreta (GD) e 1000 *bootstraps* conforme direcionado pelo software JModel Test (Posada, 2008). Foram utilizados 31 genomas espécie tipo de *Bacillus/Priestia* e utilizado como grupo externo a cepa NCTC6355 de *Paenibacillus macerans* (GenBank: NZ_UGSI00000000.1) (Tabela 2).

Tabela 1. Genes utilizados na análise filogenética das estirpes B116, B119 e B2084.

Gene	Descrição
<i>acsA</i>	Acetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.1)
<i>argS</i>	Arginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.19)
<i>ccpA</i>	Catabolite control protein A
<i>deoD</i>	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1)
<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ
<i>fumC</i>	Fumarate hydratase class II (EC 4.2.1.2)
<i>guaA</i>	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.2)
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3)
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3)
<i>ilvD</i>	Dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9)
<i>leuS</i>	Leucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.4)
<i>lon/lona</i>	ATP-dependent protease La (EC 3.4.21.53) Type I
<i>lonB</i>	ATP-dependent protease La (EC 3.4.21.53) LonB Type I
<i>metG</i>	Methionyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.10)
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein MutL
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein MutS
<i>Nth</i>	Endonuclease III (EC 4.2.99.18)
<i>Pgi</i>	Glucose-6-Phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)
<i>polA</i>	DNA polymerase I (EC 2.7.7.7)
<i>pura</i>	Adenylosuccinate synthetase (EC 6.3.4.4)
<i>pyc/pycA</i>	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1)
<i>pyrE</i>	Orotate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.10)
<i>recA</i>	RecA protein
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta subunit (EC 2.7.7.6)
<i>secA</i>	Protein translocase subunit SecA
<i>trpB</i>	Tryptophan synthase beta chain (EC 4.2.1.20)

Tabela 2. Estirpes bacterianas utilizados na análise filogenética.

Estirpes bacterianas	Número de acesso GenBank
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	FN597644.1
<i>B. amyloliquefaciens</i> IT-45	CP004065.1
<i>B. amyloliquefaciens</i> LL3	CP002634.1
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208	CP002627.1
<i>Bacillus anthracis</i> CZC5	AP018443.1
<i>B. anthracis</i> str. Ames	AE016879.1
<i>B. anthracis</i> str. CDC 684	CP001215.1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	AE016877.1
<i>B. cereus</i> B4264	CP001176.1
<i>B. cereus</i> Q1	CP000227.1
<i>Priestia megaterium</i> DSM 319	CP001982.1
<i>P. megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581	CP009920.1
<i>P. megaterium</i> NCT-2	CP032527.1
<i>P. megaterium</i> YC4-R4	CP026736.1
<i>P. megaterium</i> DE0169	GCA_007678435.1
<i>P. flexa</i> GN22-4	GCA_017303255.1
<i>P. aryabhatai</i> k13	GCA_002688605.1
<i>P. endophytica</i> 3617_2C	GCA_003269955.1
<i>P. koreensis</i> DSM 16467	GCA_001274935.1
<i>P. filamentosa</i> PK5	GCA_003600795.1
<i>P. abyssalis</i> DSM 25875	GCA_002019595.1
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis str. 168	AL009126.3
<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis str. AG1839	CP008698.1
<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis str. BAB-1	CP004405.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt18247	CP015250.1
<i>B. thuringiensis</i> serovar kurstaki str. HD-1	CP004870.1
<i>B. thuringiensis</i> YBT-1518	CP005935.1
<i>Bacillus velezensis</i> AS43.3	CP003838.1
<i>B. velezensis</i> SQR9	CP006890.1
<i>B. velezensis</i> LPL-K103	CP039380.1
<i>Paenibacillus macerans</i> NCTC6355	GCA_900454495.1

4.3 IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MARCADORES ESTIRPE ESPECÍFICOS

4.3.1. Desenvolvimento de marcadores estirpe-específicos

Regiões específicas dos genomas de cada uma das estirpes foram avaliadas através da metodologia KMER (Deorowicz *et al.*, 2019), utilizando o software GenomeTester4 (Kaplinski *et al.*, 2015). Para isso, foi criado um dicionário kmer com

tamanho definido de 21 bases para cada um dos três genomas estudados e para todo banco de nucleotídeos (Nt) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os dicionários foram comparados para a obtenção dos kmers únicos para cada genoma estudado. Após a identificação das regiões específicas e únicas de cada genoma, foi utilizado o software Primer3Plus (Untergasse *et al.*, 2006) para o desenvolvimento de três conjuntos de oligonucleotídeos específicos (Tabela 3) que estivessem presentes na mesma região genômica em cada uma das estirpes para análise por PCR em tempo real, sendo especificidade avaliada *in silico* com a ferramenta Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Tabela 3. Oligonucleotídeos estirpe-específicos desenvolvidos para as estirpes bacterianas B116, B119 e B2084.

Oligonucleotídeo (5'-3')	
B116 P1 F	CATTTGAGGTGTACGCTCCAT
B116 P1 R	ATTCTGGCTCCTCGGTAATGT
B116 P2 F	ATCTCACCAGACCACTTGCAG
B116 P2 R	GAGCTAAAGGAGGCTCCGTTT
B116 P3 F	TGTGGATTCTCTGGAGTTGGC
B116 P3 R	GCAGGAAGGTTACCGACAAGA
B119 P1 F	TACTGAGACGTATGCCCAACC
B119 P1 R	TAGTCCGTGTGAGGCAAGTTT
B119 P2 F	AACTTGAAGTGACGGCTCAA
B119 P2 R	GATAAGCGCATCCACATCATT
B119 P3 F	GGAAGACCGCCTTCTGTTATC
B119 P3 R	AATCCTAAAGGCGGATGAGAA
B2084 P1 F	CTGCGATGGACAATTTGAGAT
B2084 P1 R	ACAAATTTTGCTCCGTCATTG
B2084 P2 F	ACTTGGCTTGTACATCCTCCG
B2084 P2 R	ATGCCAAACTCGGTCATTTGC
B2084 P3 F	AAGCCGATTGACCATACACAG
B2084 P3 R	AGCAGTAAGGGGGTGAATGAT

4.3.2. Crescimento das estirpes bacterianas, extração de dna e validação de marcadores estirpe-específicos.

As duas estirpes de *Bacillus* (B116 e B2084) e a estirpe de *Priestia* (B119) foram inoculadas em meio TSB (Caldo Triptona Soja) e incubadas a 30 °C e 120 rpm por três dias. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10

minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células obtidas usadas na extração de DNA utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) e padronizado para a concentração de 10 ng μL^{-1} . Para testar os oligonucleotídeos específicos para regiões de cópia única identificadas a partir da análise dos genomas, foi realizado o teste de amplificação por meio de ensaios de PCR em tempo real. A reação foi composta por 10 ng de DNA bacteriano, FastSYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 1X e 1 mM de cada oligonucleotídeo. As condições de amplificação foram: 95 °C por 20 segundos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 1 segundo e 60 °C por 20 segundos no equipamento QuantiStudio™ 6 System (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA), seguindo as recomendações do fabricante. Para avaliação da especificidade, todos oligonucleotídeos foram testados nas três estirpes em estudo. A eficiência dos oligonucleotídeos foi realizada a partir de uma curva padrão contendo 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng do DNA alvo. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o cálculo de eficiência das reações com os diferentes oligonucleotídeos foi realizado de acordo com a fórmula proposta por Bradburn (2020):

$$\text{Eficiência (\%)} = (10^{\frac{-1}{\text{slope}}} - 1) * 100$$

4.4 MONITORAMENTO DAS ESTIRPES INOCULADAS EM PLÂNTULAS DE MILHO

Para o preparo do inóculo, as duas estirpes de *Bacillus* (B116 e B2084) e a estirpe de *Priestia* (B119) foram inoculadas em meio TSB (Caldo Triptona Soja) e incubadas a 30 °C e 120 rpm por três dias. A densidade da suspensão bacteriana ajustada à absorbância de aproximadamente 1,0 em comprimento de onda de 540 nm. Foi adicionado 0,11g de Biomafix® a 70 sementes de milho L521236 tratadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por cinco minutos sob agitação de 150 rpm, lavadas com água deionizada. Posteriormente, as células foram ressuspensas em aproximadamente 1 mL de solução salina 0,85% (m/v) em uma

concentração final de 10^8 UFC mL⁻¹ e adicionadas às sementes tratadas com o Biomafix.

Foram realizadas coletas de cinco sementes durante sete dias a cada 24 horas até a etapa onde estavam presentes as raízes e partes aéreas das plântulas. Após sete dias foi realizado o transplante das plântulas para bandejas com a solução nutritiva Hoagland ½ força, foram realizadas coletas de três plantas por tratamento a cada três dias durante 22 dias de realização do experimento.

Para extração do DNA das plantas de milho inoculadas com as estirpes estudadas, as plantas foram divididas em raiz, parte aérea e semente e expostas a luz UV por 5 minutos. Após este período, as plantas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% (v/v) por 3 minutos, em hipoclorito de sódio 1,25% (mv) por 5 minutos e novamente em etanol 70% (v/v) por 30 minutos. Posteriormente foram lavadas em água deionizada estéril, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo CTAB 2% e β-mercaptoetanol 0,2%. O material vegetal colhido foi macerado com o auxílio de nitrogênio líquido e transferido para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de extração CTAB e as amostras incubadas em banho maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 700 µl de clorofórmio-octanol (24:1), e as amostras homogeneizadas por 15 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 14.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo 450 µl de isopropanol gelado (-20°C). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas por uma hora a temperatura de -20°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado 300 µl. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, os precipitados foram secos em centrífuga a vácuo e ressuspensos em aproximadamente 300 µl de água ultrapura contendo 1 µl de RNase (10 mg mL⁻¹) e incubados em banho maria a 37°C por 30 minutos

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), padronizadas para a concentração final de 30 ng µL⁻¹ e submetidas aos ensaios de PCR em tempo real conforme descrito no item 3.3.1.

Curvas-padrão foram preparadas a partir da diluição seriada do DNA genômico das estirpes B116, B119 e B2084 e utilizadas para quantificar as estirpes

nas amostras de sementes e plantas após a inoculação. O número de cópias de DNA bacteriano foi calculado com base no tamanho dos genomas utilizando a constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) e a massa molecular média de um par de base de DNA (660 g mol^{-1}).

4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS COM CEPAS BACTERIANAS B116, B119 e B2084.

Sementes da linhagem de milho L521236 (Embrapa Milho e Sorgo) foram tratadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por cinco minutos sob agitação de 150 rpm, lavadas com água deionizada e germinadas em rolos de papel de germinação. Após três dias, as plântulas foram transplantadas para um sistema composto por bandejas com oito litros de solução nutritiva Hoagland ½força pH 5,65 (LIU *et al.*, 1998) e mantidas em aclimatação por sete dias. Após a aclimatação, as raízes das plântulas foram imersas em suspensão salina com as estirpes bacterianas (10^7 unidades formadoras de colônias mL^{-1}) por 6 h à temperatura ambiente, com agitação manual a cada hora a fim de aumentar o contato das raízes com as bactérias. Para o preparo desse inóculo, as estirpes bacterianas foram crescidas conforme item 4.4 e densidade da suspensão bacteriana foi ajustada à absorbância de aproximadamente 1,0 em comprimento de onda de 540 nm, com a finalidade de obter-se aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1} . Posteriormente, as células foram ressuspendidas em 2,0 L de solução salina 0,85% (m/v) em uma concentração final de 10^7 UFC mL^{-1} , foram feitas as seguintes combinações de estirpes: B119, B2084, B116, B119xB2084, B119xB116, B2084xB116 e B119xB2084xB116.

Após o período de incubação, o excesso de inóculo foi retirado e as plântulas foram recolocadas em solução nutritiva Hoagland meia força, pH 5,65, por mais sete dias, sendo a solução nutritiva trocada a cada três dias. As plantas não inoculadas (controle negativo) foram incubadas em solução salina 0,85% (m/v) e cultivadas como descrito para as plantas inoculadas (de Sousa *et al.*, 2016; de Sousa *et al.*, 2021).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições com quatro plantas cada. O sistema radicular foi fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SRL) e analisado com os softwares Reader 2D e WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec Canadá), sendo quantificadas: (AS) área

de superfície radicular total (cm^2); (AS1) área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1 mm (raízes super finas); (AS2) 1 e 2 mm (raízes finas); (AS3) maior do que 2 mm (raízes grossas); (V) volume radicular total (cm^3); (V1) volume de raízes superfina; (V2) finas e (V 3) grossas (de Sousa *et al.*, 2012).

As raízes e a parte aérea das plantas foram mantidas separadamente em estufa a 65°C até atingirem peso constante, para determinação do (PSR) peso seco de raízes (g) e de (PSPA) parte aérea (g), que compuseram o (PST) peso seco total (g).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GENOMAS ESTUDADOS

Os genomas das estirpes B116, B119 e B2084 sequenciados geraram um total de 7.690.681, 7.682.123 e 1.554.362 reads, respectivamente, com um comprimento médio de 150 pb. Todas as reads foram montadas para um genoma inicial de 4.115.652 pb com cobertura de 89 vezes para a B2084 e um genoma inicial de 6.163.453 pb com cobertura de 182 vezes para a B119, e um genoma inicial de 5.589.230 pb com cobertura de 201 vezes para a B116 usando o SOAPdenovo v1.05. As características dos genomas sequenciados neste estudo estão resumidas na Tabela 4. Os genomas foram depositados no DDBJ/ENA/GenBank sob os números de acesso JABXFF000000000.1 (B119), JAOQAS000000000 (B2084) e JABXFG000000000 (B116).

Tabela 4. Características gerais do genoma de três estirpes bacterianas promotoras de crescimento de plantas. Dados obtidos por meio de análise com os softwares Rast e Quast.

Assembly	B116	B119	B2084
# contigs (>= 0 bp)	32	60	82
# contigs (>= 1000 bp)	31	54	77
Total length (>= 0 bp)	5589230	6163453	4115652
Total length (>= 1000 bp)	5588594	6159196	4111950
# contigs	32*	60*	82
Largest contig	1123168	1192011	438459
Total length	5589230*	6163453*	4115652
GC (%)	35,15*	37,27*	43,43
N50	687735*	708612*	100581
N75	209262	136576	55195
L50	3	4	13
L75	7	9	27
# total reads	7690681	7682123	1554362
# left	3832080	3828875	777181
# right	3832080	3828875	777181
Mapped (%)	98,18	98,22	100,0

[Continua]

			[Continuação]
Properly paired (%)	97,0	96,99	97,87
Avg. coverage depth	201	182	89
Coverage >= 1x (%)	99,98	99,95	100,0
# N's per 100 kbp	22,44	51,84	1,60
*Dados gerados por Velloso <i>et al.</i> , 2020.			[Conclusão]

5.2 ANÁLISE DO GENOMA DAS ESTIRPES B116, B119 E B2084

Após a anotação dos genomas utilizando os softwares PROKKA, RAST e BLAST foi possível observar os genes presentes em cada um dos genomas, sendo possível separá-los em 27 grandes grupos gerais, com destaque para grupos de genes associados à promoção de crescimento vegetal (Figura 1).

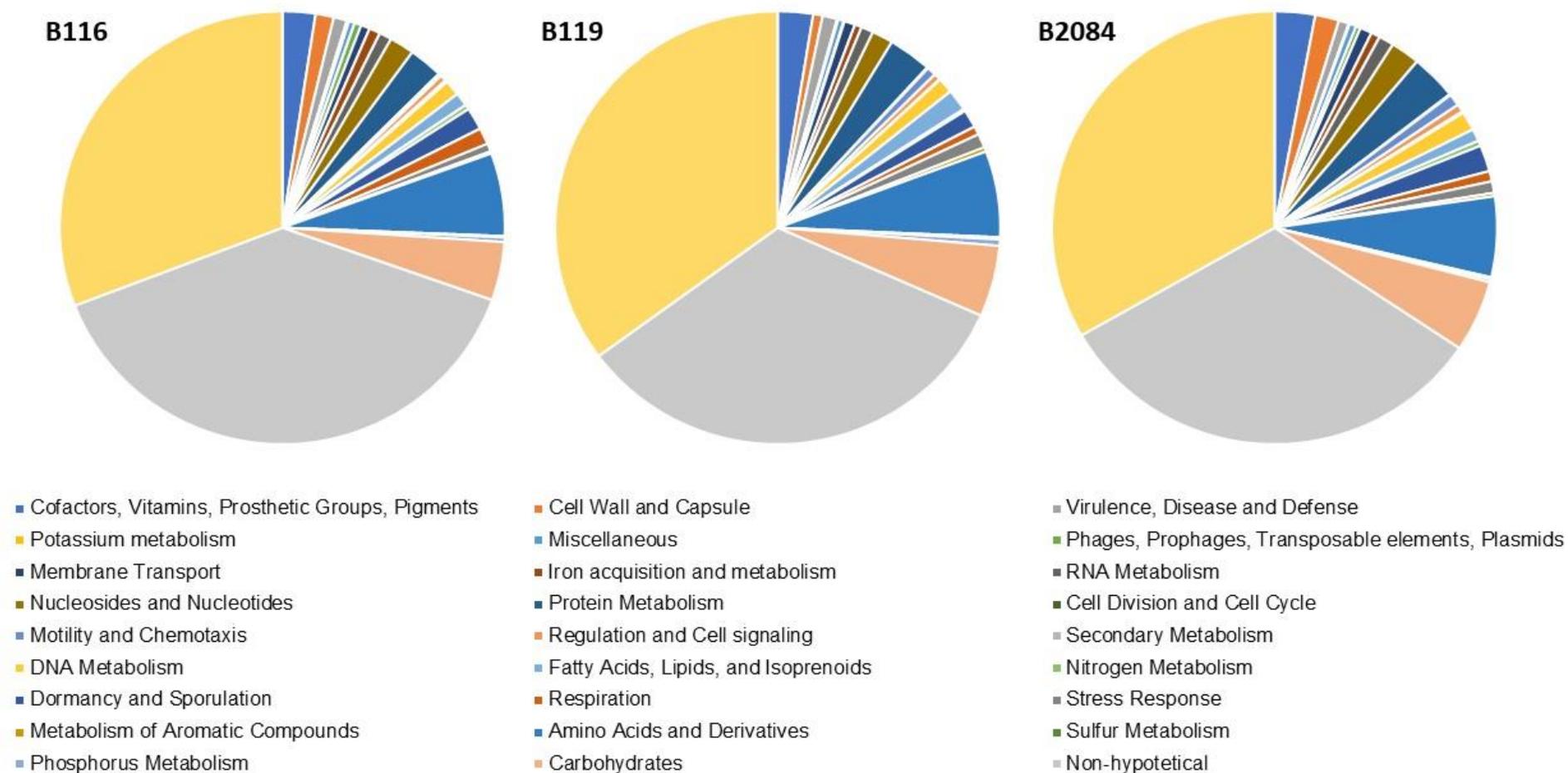


Figura 1. Grupos de genes encontrados nas estirpes estudadas, os grupos funcionais foram separados com base nas anotações estruturais realizadas nos softwares PROKKA, RAST, BUSCO e PANZER.

Com relação a categoria de virulência, doença e defesa, as estirpes não apresentaram genes relacionados à produção de toxinas e superantígenos, apresentando genes responsáveis pela produção de bacteriocinas e peptídeos antibacterianos sintetizados por ribossomos. A estirpe B119 apresenta um maior número de genes, sendo dez ligados à resposta ao estresse por bacitracina, enquanto a estirpe B2084 apresenta sete genes na mesma categoria. A estirpe B116 não apresentou genes para tal categoria. Com relação a resistência a antibióticos e compostos tóxicos, as estirpes apresentam genes que conferem resistência/mobilização de cobre, zinco, cobalto, cádmium, tetraciclina, fosfomicina, fluoroquinolonas, beta-lactamase e bombas de efluxo de resistência a multidrogas. A estirpe B116 apresenta 47 genes, a B119 apresenta 50 genes e a estirpe B2084 19 genes na categoria de invasão e resistência intracelular.

Foram ainda observados genes relacionados à aquisição e metabolismo de fósforo, sendo a estirpe B119 aquela com maior número de genes em tal categoria, possuindo 35 genes, enquanto a estirpe B116 apresentou 22 genes e a B2084 apenas 11 genes. Dentre estes genes, podemos destacar o operon *Pst* que codifica um sistema de transporte específico para fosfato, além de genes do operon *Phn* que são responsáveis por codificar proteínas que atuam na captação e decomposição de fosfonatos.

Genes relacionados a motilidade e quimiotaxia foram observados nas três estirpes, sendo que a estirpe B119 apresenta 50 genes nessa categoria, seguida pela estirpe B2084 com 45 e a B116 apenas 8 genes. Estes genes estão ligados a mobilidade flagelar das estirpes estudadas, sendo encontrados genes dos operons *Fli* e *Flg*. Quanto aos genes relacionados a quimiotaxia foram encontrados os operons *Che* e *Mot*, que estão envolvidos na transmissão de sinais sensoriais dos quimiorreceptores para os motores flagelares (Figura 2).

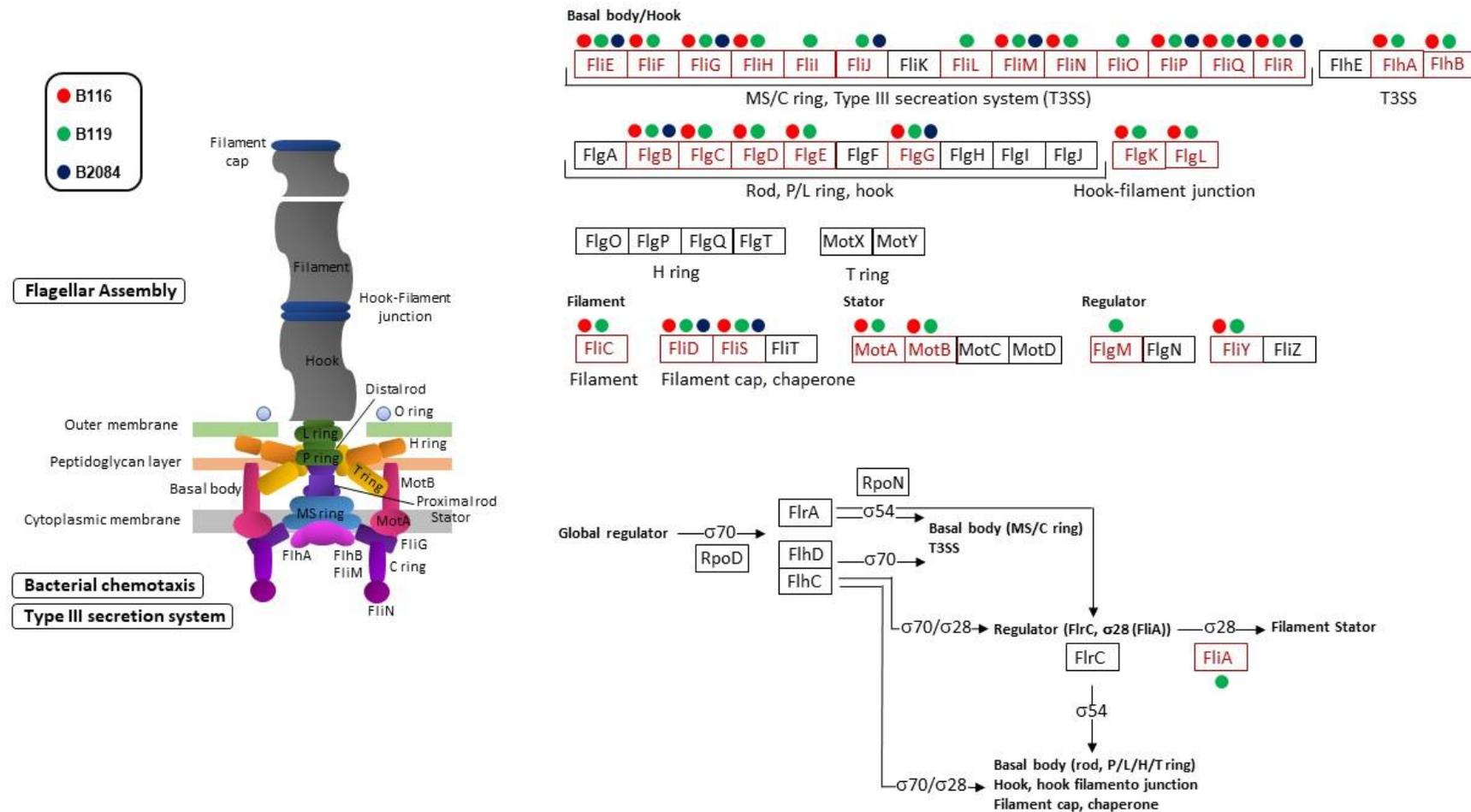


Figura 2. Genes responsáveis pela formação do flagelo identificados nos genomas das estirpes bacterianas B116, B119 e B2084. As vias foram construídas com o auxílio do KEEG pathway database, os genes presentes foram identificados com os softwares PROKKA e RAST.

Com relação ao metabolismo de nitrogênio foi possível observar a presença de genes ligados a redução de nitrito/nitrato pertencentes ao operon *Nar* em todas as estirpes estudadas. Genes *Nif* relacionados à fixação biológica de nitrogênio foram encontrados apenas nos genomas das estirpes B116 e B119.

Na categoria de aquisição e metabolismo de ferro, todos os genomas possuem genes do operon *Fat* que compõem o sistema de captação de ferro mediado por petrobactina, sendo um sideróforo quelante de ferro produzido por espécies de *Bacillus*. Observou-se também a presença de genes do operon *Rhb* responsáveis pela produção do sideróforo rizobactina nas estirpes B116 (genes *Rhb F, C*) e B119 (genes *RhbF, C, E, D*).

A categoria de genes relacionados à produção de aminoácidos e derivados foi a maior categoria de genes encontrados nos genomas estudados, sendo 398 para a estirpe B116, 480 para a B119 e 305 para a B2084. Dentro desta categoria foi possível observar genes responsáveis pela produção de prolina, arginina, alanina, histidina e serina em todos os genomas estudados.

Foi possível observar também genes associados às vias de produção de metabólitos secundários, podendo destacar a presença de genes responsáveis pela biossíntese de auxina nos três genomas, de modo que a estirpe B116 apresenta dez genes, seguida pelas estirpes B2084 e B119 com seis e quatro genes, respectivamente.

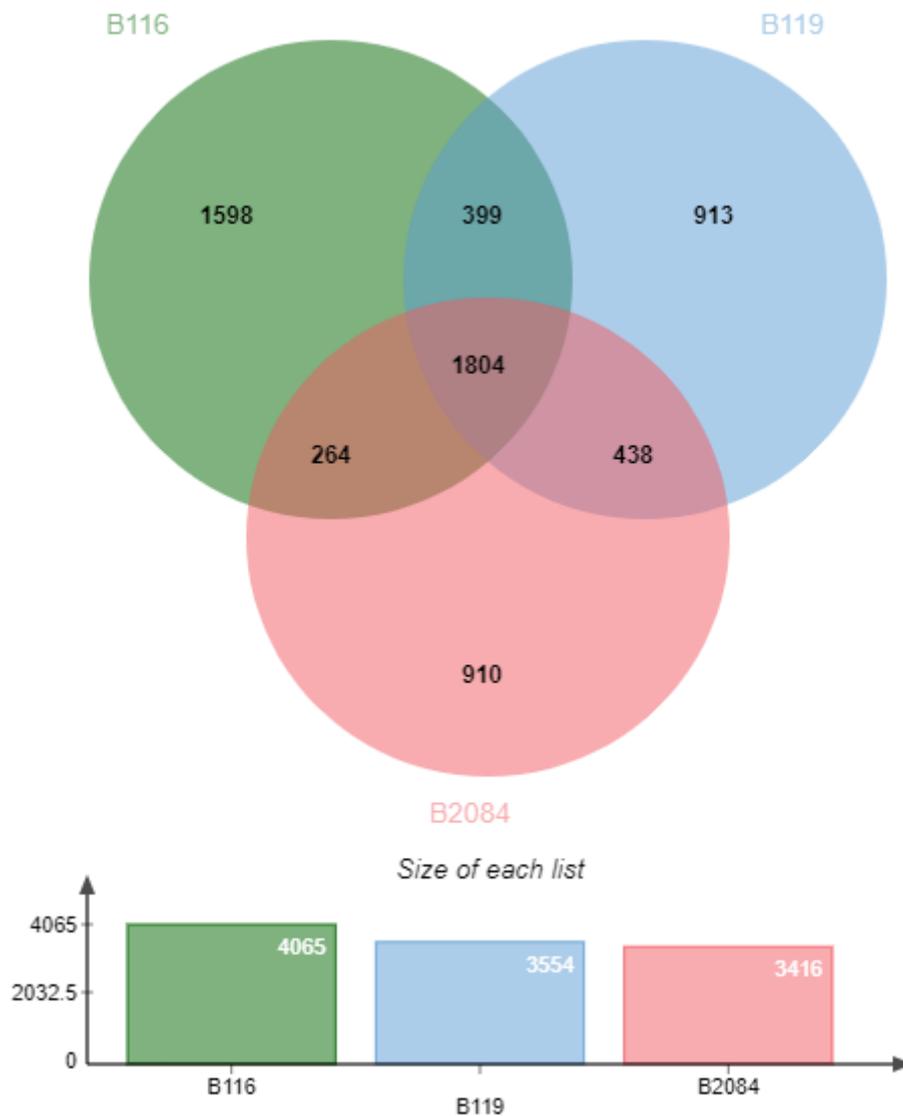


Figura 3. Diagrama de Venn relacionando todos os genes encontrados nas estirpes B116, B119 e B2084. Diagrama montado com o auxílio da anotação estrutural feita pelos softwares Prokka e Rast utilizando a plataforma jVenn (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/index.html>).

Os genomas das três estirpes compartilham diversos genes entre si (Figura 3). Sendo 1804 genes compartilhados entre as estirpes B116, B119 e B208, sendo em sua maioria genes relacionados a funções metabólicas e estruturais, como genes responsáveis pela divisão celular, ou pela formação de flagelo como os operons *Fib*, *Fli* e *Fla*, que são constituídos por genes de interesse para a promoção de crescimento ligados a mobilidade bacteriana. Em diversas espécies bacterianas o flagelo e

importante para que as bactérias alcancem o local ideal em seu hospedeiro promovendo uma colonização mais eficiente (Smith *et al.*, 2020).

As estirpes B116 e B119 compartilham um total de 399 em categorias importantes para promoção de crescimento como os genes dos operons *Pst*, *Phn*, *Pho* e *Ppk*, ligados ao metabolismo de fósforo. Já na categoria de metabolismo de nitrogênio, as estirpes B116 e B119 compartilham genes *Nira/b/d*, e também genes *Nifu/f*. Já para a produção de ácidos orgânicos são compartilhados genes do operon *Gnt* responsáveis pelo transporte de gluconato, além de genes do operon *Lld* responsáveis por produzir a enzima lactato desidrogenase.

Um total de 438 genes de categorias importantes para a promoção de crescimento são comuns entre as estirpes B119 e B2084. Na categoria de metabolismo de nitrogênio compartilham o gene *Nsrr* que controla a expressão de genes possivelmente envolvidos com o estresse nitrosativo (Choi *et al.*, 2021). Com relação a produção de sideróforos, as estirpes compartilham o gene *Efeu* relacionado ao transporte de ferro de alta afinidade. Para a categoria de exopolissacarídeos e formação de biofilme as estirpes B119 e B2084 apresentam diversos genes do operon *Eps* sendo os genes *Epsf/g/h//m/n* envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos durante a formação do biofilme que tem um papel crucial na aderência dessas bactérias na rizosfera da planta (Nagorska *et al.*, 2010; Santoyo *et al.*, 2021). As estirpes B119 e B2084 compartilham também genes *Ched/w/b/br* do operon *Che*, na categoria motilidade e quimiotaxia, genes estes essenciais para a formação e motilidade do flagelo (Fheler *et al.*, 2022).

Um total de 264 genes são comuns entre as estirpes B116 e B2084. Por exemplo, genes como *Pat* e *Bar* responsáveis pela produção da enzima fosfinotricina acetiltransferase, que é uma intermediária da via de metabolismo do fosfanato e fosfinato, são comuns entre as duas estirpes. São compartilhados entre as estirpes B116 e B119 os genes do operon *Nar* sendo eles *Narg/z/h/y* e os genes do operon *Nxr Nxra/b*, responsáveis pela produção da enzima nitrito reductase, na categoria de metabolismo de nitrogênio. Com relação a produção de exopolissacarídeos e biofilme as estirpes compartilham genes do operon *Glg* sendo os genes *Glgc/p/a* responsável pela produção do polissacarídeo glicogênio.

Foi possível observar que as estirpes B116, B119 e B2084 tem 109 genes comuns distribuídos em todas as categorias relacionadas a promoção de crescimento.

Entre as estirpes B116 e B119 são 95 genes, B116 e B2084 27 genes, as entre as estirpes B119 e B2084 31 genes (Figura 4).

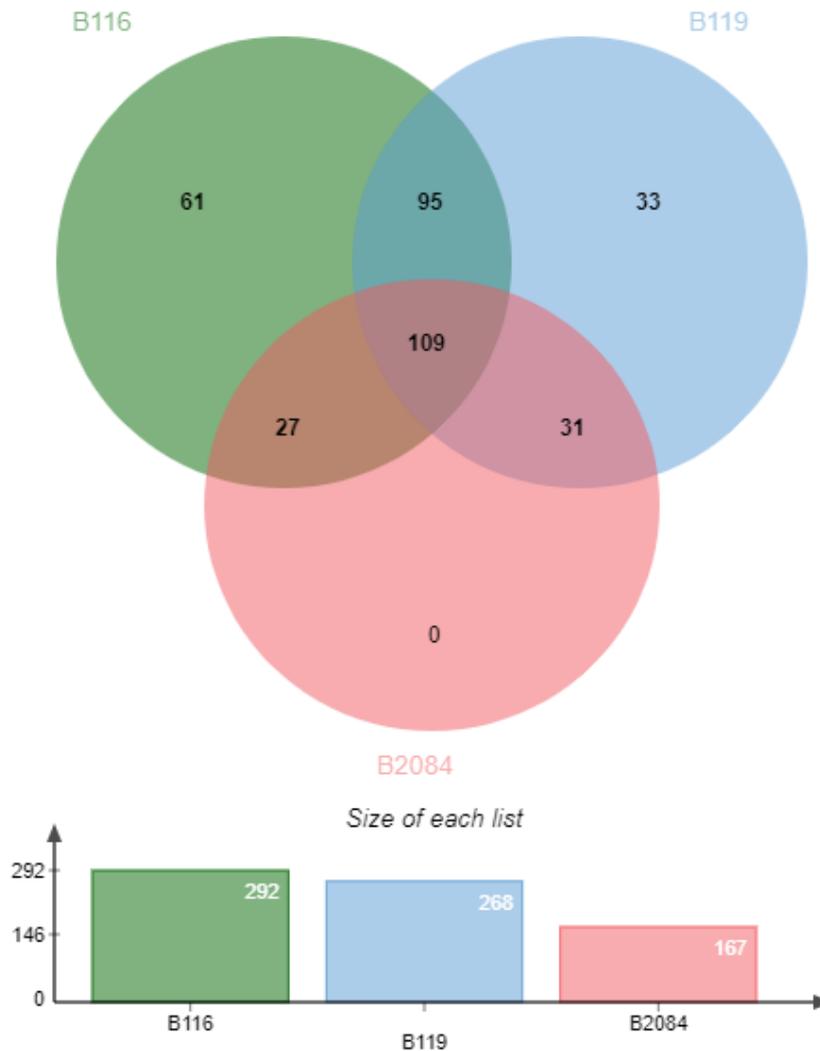


Figura 4. Diagrama de Venn de todos os genes relacionados à promoção de crescimento de plantas presentes nas estirpes B116, B119 e B2084. Diagrama montado com o auxílio da anotação estrutural feita pelos softwares Prokka e Rast utilizando a plataforma jVenn (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr/app/index.html>).

A estirpe B116 possui 61 genes exclusivos com funções relacionadas a promoção de crescimento, sendo a única estirpe a apresentar sete genes exclusivos na categoria de produção de toxinas bacterianas (Tabela 5). Já a estirpe B119 possui um total de 33 genes exclusivos relacionados a promoção de crescimento, sendo a única estirpe a apresentar genes exclusivos nas categorias de secreção tipo II e tipo IV-A com um gene em cada uma das categorias (Tabela 5).

Embora apresente 167 genes relacionados a promoção de crescimento em seu genoma a estirpe B2084 não apresentou genes exclusivos em nenhuma categoria relacionada a promoção de crescimento, tendo todos os genes comuns com as estirpes B116 e B119.

Tabela 5. Número de genes exclusivos relacionados a promoção de crescimento presentes nas estirpes B116, B119 e B2084.

	B116	B119	B2084
Produção de fitormônios	5	1	0
Metabolismo de nitrogênio	9	3	0
Resposta ao estresse	2	2	0
Toxinas bacterianas	7	0	0
Produção de ácidos orgânicos	2	2	0
Sideróforos	9	6	0
Metabolismo de fosforo	9	2	0
Resistencia a antibióticos	7	2	0
Motilidade e quimiotaxia	3	6	0
Estresse a drogas	2	2	0
Compostos orgânicos voláteis	3	1	0
Exopolissacarídeos e formação de biofilme	2	3	0
Estresse oxidativo	1	1	0
Sistema de secreção tipo II	0	1	0
Sistema de secreção tipo IV-A	0	1	0

5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética molecular baseada nos vinte e seis genes concatenados conservados revelou que a estirpe B116 alinhou com as espécies de *Bacillus thuringiensis*, a estirpe B119 com espécies de *Prestia megaterium*, enquanto a estirpe B2084 agrupou com as espécies de *Bacillus subtilis* (Figura 5).

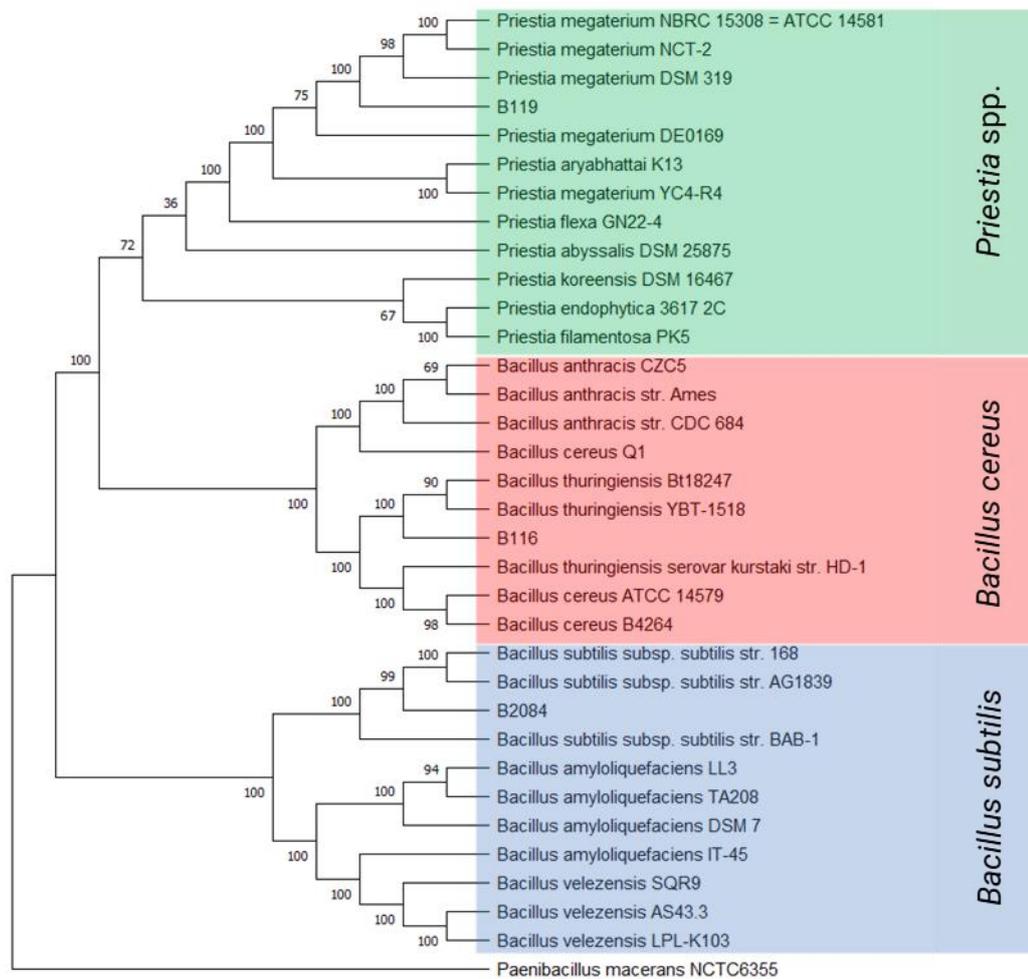


Figura 5. Árvore filogenética baseada em sequências concatenadas de vinte e seis genes (*AcsA*, *ArgS*, *CcpA*, *DeoD*, *DnaJ*, *FumC*, *GuaA*, *GyrA*, *GyrB*, *IlvD*, *LeuS*, *LonA*, *LonB*, *MetG*, *MutL*, *MutS*, *Nth*, *Pgi*, *PoIA*, *Pura*, *Pyc*, *PyrE*, *RecA*, *RpoB*, *SecA* e *TrpB*), mostrando a relação filogenética entre membros do gênero *Bacillus* e *Priestia*. Esta árvore foi gerada com o software MEGA 11 (1000 bootstraps) sob o modelo GTR selecionado por jModelTest e com distribuição GD. A estirpe PAO1 de *Paenibacillus macerans* foi usada como grupo externo.

5.4 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO, ESPECIFICIDADE E EFICIÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESTIRPE-ESPECÍFICOS

Com base na análise dos genomas foram desenvolvidos três pares de nucleotídeos para cada estirpe. Após a realização dos ensaios de qPCR foi possível

notar a amplificação dos oligonucleotídeos desenvolvidos com valores de Ct entre 10,52 e 21,20 para a estirpe B116, de 20,23 a 13,74 para a estirpe B119 e de 10,07 a 16,01 para a estirpe B2084. As curvas de dissociação mostraram picos únicos e bem definidos (Figura 6, Figura 7), indicando especificidade da amplificação.

Na sequência, foi realizado um teste de especificidade, no qual os oligonucleotídeos foram testados nas estirpes-alvo e nas demais estirpes estudadas, confirmando a especificidade para as bactérias alvo (Figura 8). A eficiência para os oligonucleotídeos da estirpe B116 foi entre 99,29% e 205,79%, para B119 foi de 43,94% a 133,24% e para B2084 de 79,47% a 93,58%.

Para a etapa de monitoramento foram selecionados os oligonucleotídeos com eficiência na faixa de 80 a 100%, que estão dentro da faixa ideal (Bradburn 2020; Bustin e Huggett 2017) (Tabela 6).

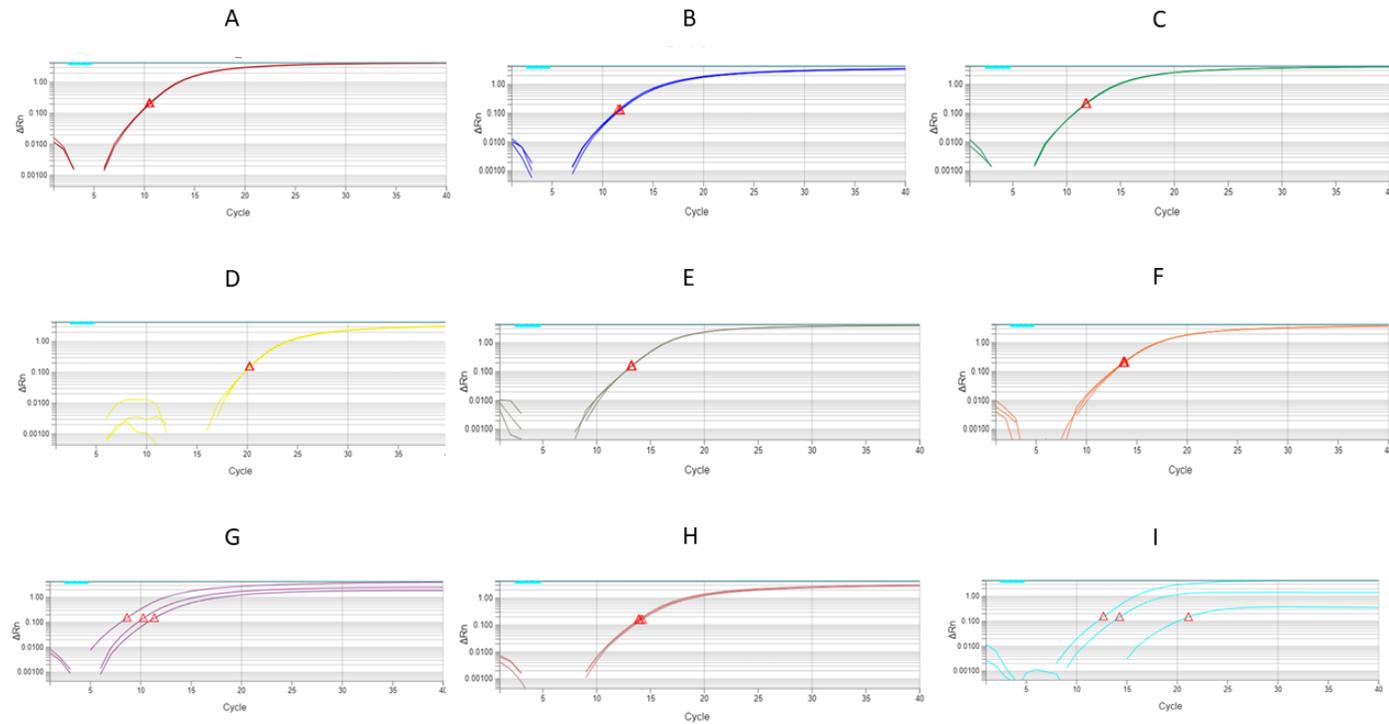


Figura 6. Curvas de amplificação obtidas nos testes de amplificação com os oligonucleotídeos desenvolvidos para as estirpes B116, B19 e B2084. **A:** B116_P1 Ct: 10,529; **B:** B116_P2 Ct: 11,661; **C:** B116_P3 Ct: 21,204; **D:** B119_P1 Ct: 20,236; **E:** B119_P2 Ct: 13,219; **F:** B119_P3 Ct: 13,742; **G:** B2084_P1 Ct: 10,078; **H:** B2084_P2 Ct: 14,036; **I:** B2084_P3 Ct: 16,013. O Ct descrito se refere ao valor médio para as três repetições.

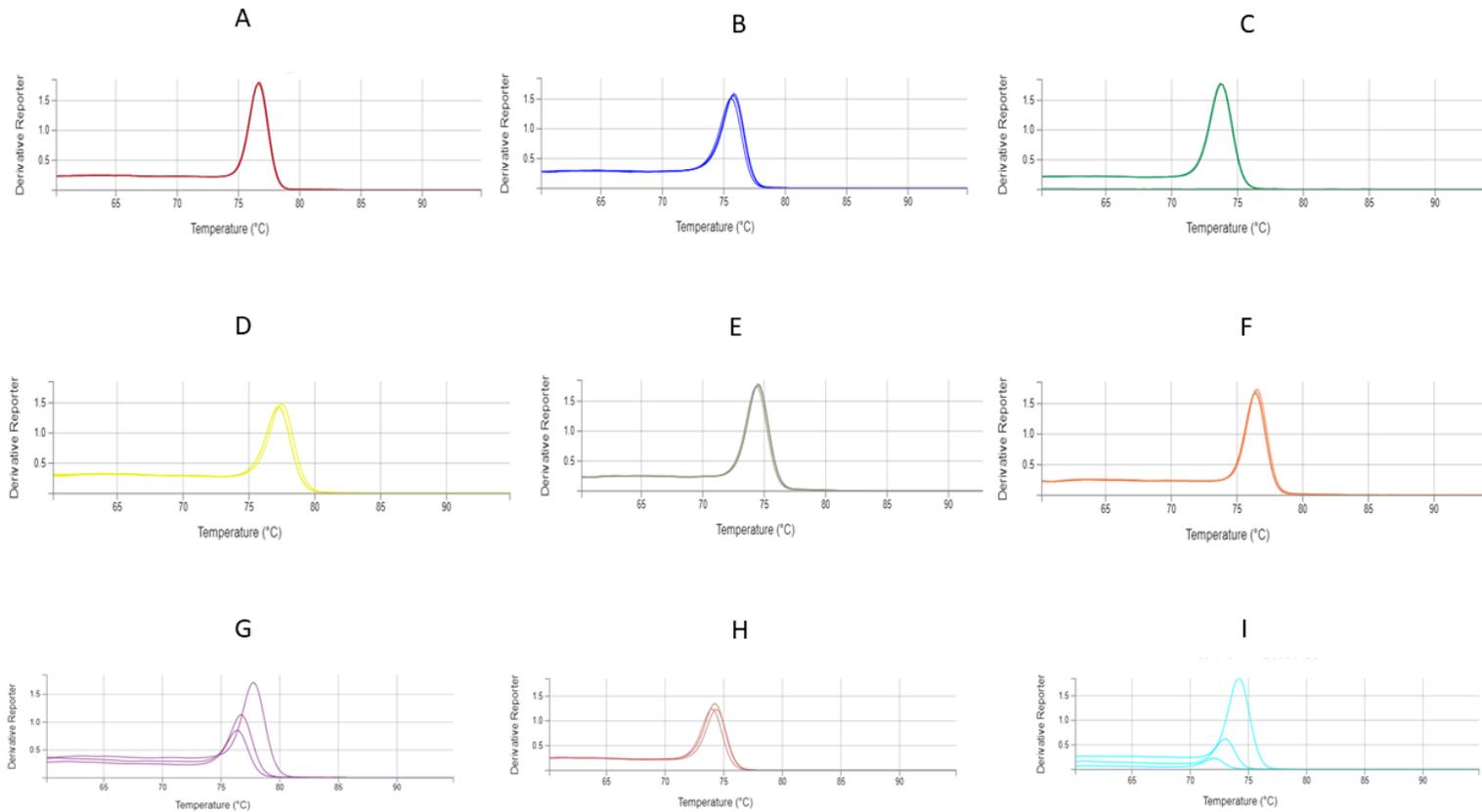


Figura 7. Curvas de dissociação obtidas no teste de amplificação para as estirpes B116, B118 e B2084 para os oligonucleotídeos **(A)** B116_P1; **(B)** B116_P2; **(C)** B116_P3; **(D)** B119_P1; **(E)** B119_P2; **(F)** B119_P3; **(G)** B2084_P1; **(H)** B2084_P2, **(I)** B2084_P3.

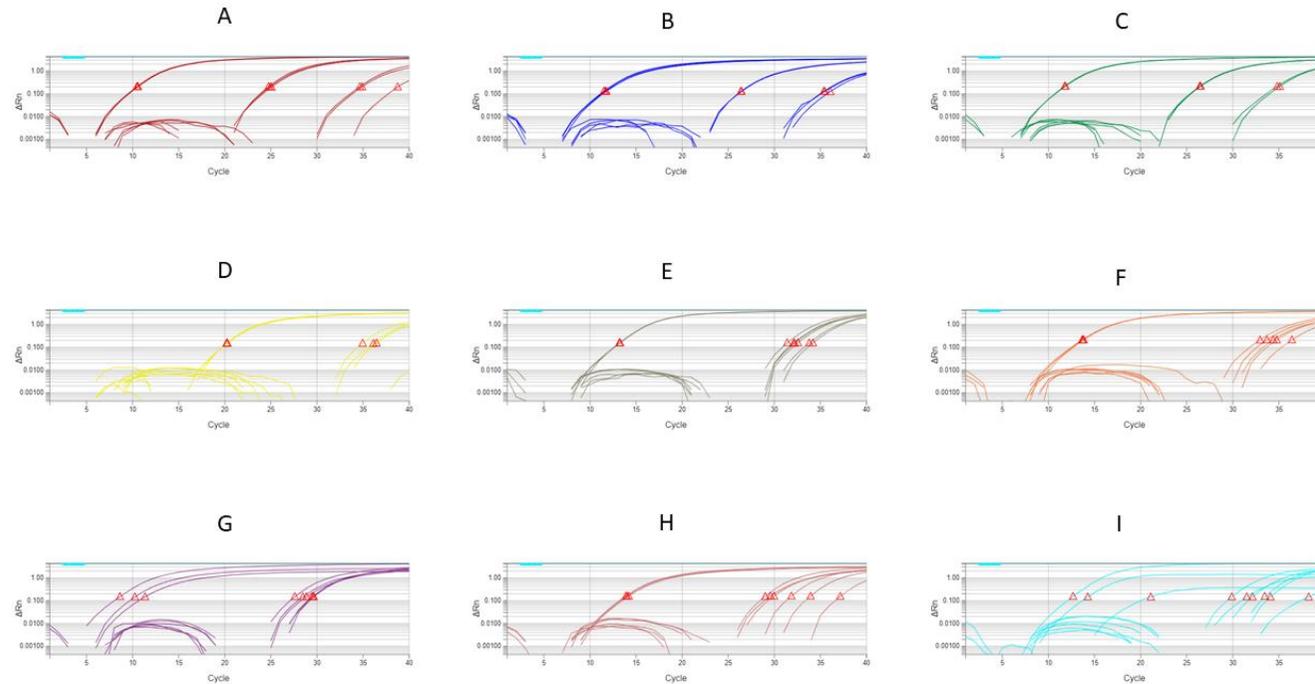


Figura 8. Curvas de amplificação dos oligonucleotídeos específicos testados na estirpe alvo e nas outras estirpes estudadas. (A) Oligonucleotídeo B116_P1 nas estirpes B119 e B2084; (B) Oligonucleotídeo B116_P2 nas estirpes B119 e B2084; (C) Oligonucleotídeo B116_P3 nas estirpes B119 e B2084; (D) Oligonucleotídeo B119_P1 nas estirpes B116 e B2084; (E) Oligonucleotídeo B119_P2 nas estirpes B116 e B2084; (F) Oligonucleotídeo B119_P3 nas estirpes B116 e B2084; (G) Oligonucleotídeo B2084_P1 nas estirpes B116 e B119; (H) Oligonucleotídeo B2084_P2 nas estirpes B116 e B119; (I) Oligonucleotídeo B2084_P3 nas estirpes B116 e B119.

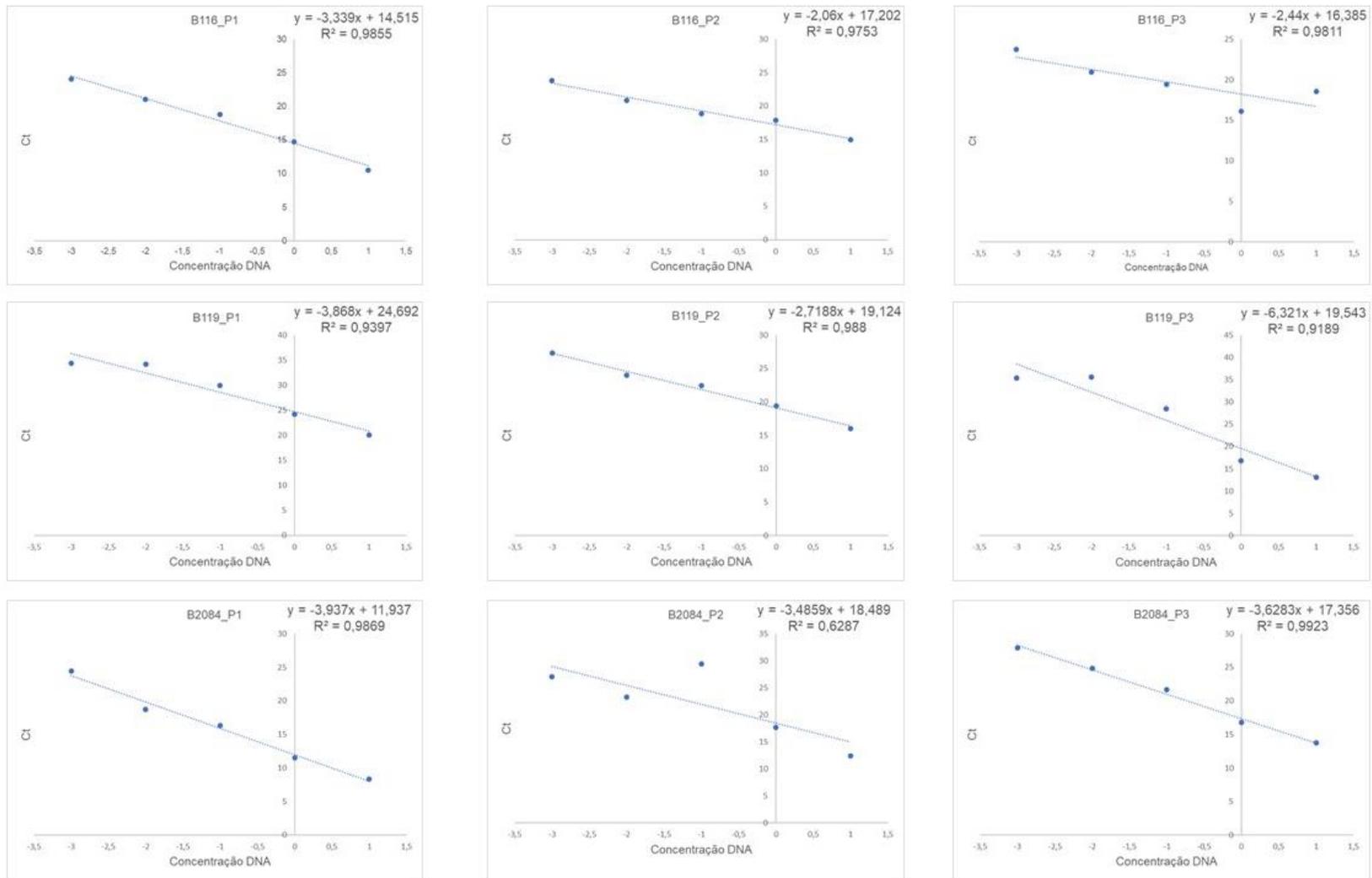


Figura 9. Curva padrão obtida através da amplificação do DNA alvo em diferentes diluições para os oligonucleotídeos desenvolvidos para as estirpes B116, B119 e B2084

Tabela 6: Eficiência dos oligonucleotídeos desenvolvidos (%).

Estirpe	Primer P1	Primer P2	Primer P3
B116	99,29	205,79	156,94
B119	81,35	133,24	43,94
B2084	79,47	93,58	88,63

5.5 MONITORAMENTO DAS ESTIRPES INOCULADAS EM PLÂNTULAS DE MILHO

Foi possível observar a presença das estirpes inoculadas nas plântulas de milho desde as fases iniciais de seu desenvolvimento e durante todo o período do experimento (Figura 10). A estirpe B119 foi encontrada no interior das sementes nas primeiras 24 horas após a inoculação, permanecendo presente até o último dia do experimento na parte aérea e raiz das plantas inoculadas após 22 dias de inoculação. A estirpe B2084 foi detectada no interior da semente após o terceiro dia da inoculação, sendo possível observar também sua presença na raiz no quarto dia, e na parte aérea no sétimo dia, permanecendo no tecido das plantas até o final do experimento, estando presente em maior quantidade na parte aérea das plantas. A estirpe B116 teve sua presença detectada na semente a partir do terceiro dia de inoculação, estando presente em todos os tecidos das plantas a partir do sétimo dia de experimento. No final do experimento, essa estirpe foi detectada apenas na semente.

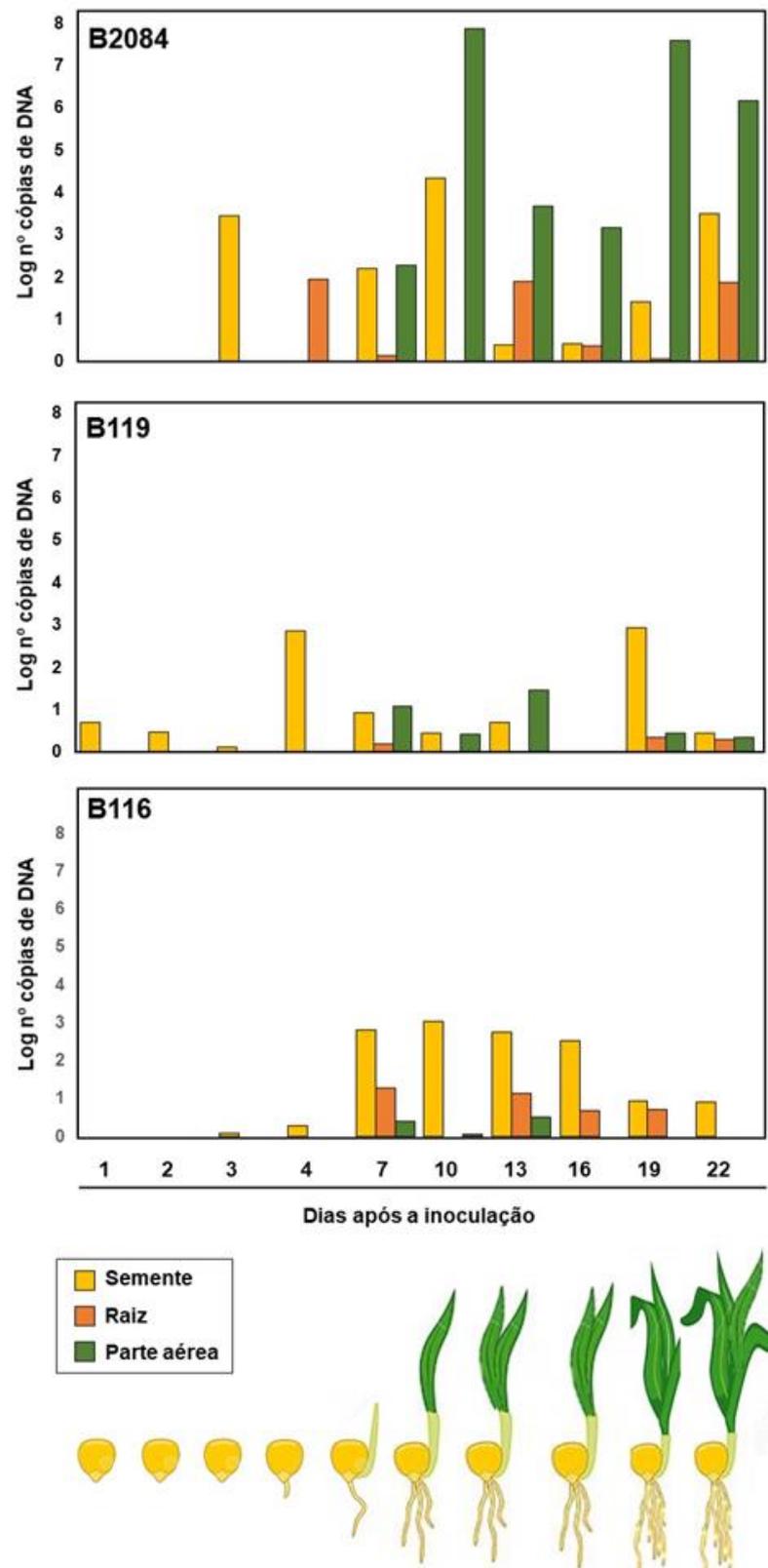


Figura 10. Monitoramento das estirpes B116, B119 e B2084 inoculadas no genótipo CMSM036 de milho. As coletas foram realizadas a cada 24 horas até o surgimento de raiz e parte aérea nas sementes, e após este período as coletas foram realizadas a cada 3 dias.

5.6 AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Foram inoculadas as estirpes isoladas e em combinação em plântulas de milho. A análise de variância indicou diferença significativa a 5% para todas as características radiculares e de peso avaliadas, com exceção da área de superfície de raízes com diâmetro superior a 2 mm (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância para características radiculares e peso seco do genótipo de milho inoculado com as estirpes B116, B119 e B2084.

FV	G L	Quadrado Médio									
		C	AS	D	VR	AS1	AS2	AS3	PSPA	PSR	PST
Estirpe	7	43916,33**	2314,06**	0,00*	0,77***	748,00**	273,49*	8,47 ^{ns}	0,03*	0,00**	0,02*
Erro	24	12802,38	723,12	0,00	0,15	245,41	96,55	3,71	0,01	0,00	0,00
Total	31										
Média		514,32	134,40	0,85	2,81	62,05	43,29	13,63	0,50	0,41	0,92
CV (%)		22,00	20,01	4,14	13,61	25,25	22,70	14,14	20,89	13,20	9,54

^{ns} não significativo, * 5%, ** 1% e *** 0,01% de probabilidade pelo teste F. (FV) Fator de variação, (GL) grau de liberdade, (CV) coeficiente de variação, (C) comprimento radicular total (cm). (AS) área de superfície radicular total (cm²); (D) diâmetro médio da raiz (mm); (VR) volume da raiz (cm³); (AS1) área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1 mm; (AS2) 1 e 2 mm e (AS3) maior do que 2 mm, (PSPA) peso seco da parte aérea, (PSR) peso seco da raiz e (PST) peso seco total.

Os tratamentos B119xB2084, B119xB116 e a mistura tripla B119xB208xB116 apresentaram maior comprimento radicular total do que o controle negativo não inoculado e os demais tratamentos (Tabela 8). Os tratamentos B119xB2084 e B119xB116 apresentaram maior área de superfície total, volume radicular total e área de superfície com diâmetro entre 0 e 1 mm comparado aos outros tratamentos. O diâmetro radicular médio do tratamento B2084xB116 foi significativamente superior do que os demais tratamentos. A área de superfície de raízes com diâmetro entre 1 e 2 mm foi significativamente maior em plântulas inoculadas com B119, B119xB2084, B119xB116 e B119xB2084xB116. A área de superfície de raízes com diâmetro maior do que 2 mm foi maior em plântulas inoculadas com B116, B119xB2084, B119xB116

e B119xB2084xB116. Quanto ao peso seco da parte aérea, as plântulas inoculadas com B116, B119xB2084, B119xB116 e B119xB2084xB116 apresentaram valores significativamente superiores, enquanto plântulas inoculadas com B116 e B119xB116 foram superiores no peso seco (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo das análises de variância para características radiculares e peso seco de plântulas de milho inoculadas com as estirpes promotoras de crescimento (B116, B119 e B2084).

	C-	B119	B2084	B116	B119xB2084	B119xB116	B2084xB116	B119xB2084xB116
C	402,74 cd	501,14 abcd	445,35 bcd	549,34 abc	623,88 a	655,17 a	363,13 d	573,85 ab
AS	105,15 c	129,57 abc	117,67 bc	141,89 abc	159,58 a	165,69 a	104 c	151,67 ab
D	0,85 b	0,84 b	0,86 b	0,83 b	0,83 b	0,82 b	0,92 a	0,84 b
VR	2,19 c	2,68 abc	2,5 abc	2,93 abc	3,26 ab	3,35 a	2,38 bc	3,21 ab
AS1	51,47 bc	57,9 abc	52,3 bc	69,94 ab	76,6 a	79,81 a	40,56 c	67,83 ab
AS2	28,05 b	46,56 a	38,48 ab	39,62 ab	50,4 a	50,97 a	40,08 ab	52,19 a
AS3	12,61 ab	10,94 b	13,21 ab	15,1 a	14,41 a	15,24 a	13,07 ab	14,48 a
PSPA	0,38 c	0,48 bc	0,45 bc	0,64 a	0,57 ab	0,56 ab	0,41 c	0,58 ab
PSR	0,46 ab	0,41 abc	0,38 bc	0,4 abc	0,36 c	0,43 abc	0,47 a	0,39 abc
PST	0,84 cd	0,89 bcd	0,83 d	1,04 a	0,93 abcd	0,99 ab	0,87 bcd	0,97 abc

(C-) Controle negativo; (C) comprimento radicular total (cm), (AS) área de superfície radicular total (cm²); (D) diâmetro médio da raiz (mm); (VR) volume da raiz (cm³); (AS1) área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1 mm; (AS2) 1 e 2 mm e (AS3) maior do que 2 mm, (PSPA) peso seco da parte aérea, (PSR) peso seco da raiz e (PST) peso seco total.

6. DISCUSSÃO

Estirpes de *Bacillus* e *Prestia* são amplamente utilizadas em trabalhos relacionados à promoção de crescimento vegetal, por apresentarem diversos mecanismos diretos e indiretos importantes para sua sobrevivência na endosfera e filosfera da planta bem como de beneficiar esse parceiro, tais como resistência sistêmica induzida contra agentes bióticos, produção de compostos antimicrobianos e aumento da tolerância a estresses ambientais, pela síntese de metabólitos secundários, hormônios, enzimas da parede celular e antioxidantes (Blake *et al.*, 2021; Hashem *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2020).

As bactérias usadas para esse fim devem sobreviver na rizosfera e quando na endosfera, superar as defesas das plantas contra patógenos microbianos, virais e fúngicos, como a produção de espécies reativas de oxigênio na forma de peróxido de hidrogênio, radicais hidroperoxila, hidroxila, superóxido, óxido nítrico e fitoalexinas (Apel e Hirt, 2004; Taiz e Zeiger, 2013; Camejo *et al.*, 2016). Diversos mecanismos de defesa de maneira orquestrada, sendo a presença de respostas de defesas rápidas, intensas e específicas um dos pré-requisitos para a sobrevivência dentro de um ambiente rizosférico oxidativo (Doornbos *et al.*, 2012). As estirpes B116, B119 e B2084 apresentam genes que codificam enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase, peroxidase, catalase e hidroperoxido redutase (Tabela S1) importantes para a sobrevivência em ambientes sob condições de estresse oxidativo, como a endosfera da planta

Os genomas das estirpes estudadas apresentaram uma série de genes relacionados a sua resistência e transporte, genes envolvidos na resistência/mobilização de metais, e, para a estirpe B116, foram encontrados também genes relacionados a compostos metabólicos com atividade antifúngica, como o operon *HcnABC* e relacionados à produção de quitinase (Tabela S1).

As raízes das plantas secretam uma série de compostos incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, ácidos graxos, esterol, vitaminas, enzimas, bem como compostos inorgânicos que são conhecidos como exsudatos radiculares. A quimiotaxia é a capacidade das bactérias de perceberem tais exsudatos e coordenarem seu movimento em direção a esse estímulo (Chagas *et al.*, 2018; Ray *et al.*, 2018; Santoyo *et al.*, 2021). Uma vez inoculadas, as

BPCPs necessitam atingir a superfície das raízes, seja de maneira passiva por fluxos de água ou de maneira ativa através da utilização de flagelos. As estirpes B116 e B119 possuem em seu genoma genes relacionados à formação de flagelos, como os operons *MotAB*, semelhante ao encontrado na maioria das espécies de *Bacillus*, por exemplo nas cepas FZB42 de *B. amyloliquefaciens* (Chen *et al.*, 2007), XF-1 de *B. subtilis* (Guo *et al.*, 2015), CC09 de *B. velezensis* (Cai *et al.*, 2016), AR156 de *B. cereus* (Jiang *et al.*, 2017) e AB211 de *B. aryabhatai* (Bhattacharyya *et al.*, 2017). A estirpe B2084 possui o operon *Fli* responsável pela formação dos flagelos, enquanto que B116 e B119 apresentam genes do operon *Flg*, responsável pelo sistema de secreção tipo III (T3SSs), que forma o núcleo do flagelo bacteriano (Tabela S1) (Horna *et al.*, 2021). A ativação dos genes para o movimento flagelar é necessária para garantir a mobilidade celular e quimiotaxia em resposta aos exsudatos radiculares (Allard-Massicotte *et al.*, 2016; Chagas *et al.*, 2018; Lemanceau *et al.*, 2018).

Para garantir uma melhor aderência e conseqüentemente uma melhor colonização das BPCP nas raízes da planta hospedeira, uma característica de extrema importância é a formação de biofilme, que são matrizes extracelulares compostas por exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e microrganismos (Merritt *et al.*, 2007; Zboralski *et al.*, 2020). As estirpes B116, B119 e B2084 já foram caracterizadas por meio de ensaios *in vitro* como produtoras de EPS e formadoras de biofilmes em placas de poliestireno (Velloso *et al.*, 2020). Nesse estudo, foram detectados nessas estirpes genes para a formação de biofilme e de EPS. Os EPS são carboidratos de alto peso molecular ligados à superfície externa das bactérias, importantes para a fixação das células bacterianas em superfícies, incluindo raízes de plantas e partículas do solo bem como integrar a matriz dos biofilmes (Vu *et al.*, 2009; Nocker *et al.*, 2012). Como os EPS são compostos hidratados apresentando cerca de 97% de água em uma matriz polimérica, eles podem contribuir para a manter a umidade na rizosfera, aumentar a sobrevivência de plantas em condições de estresse hídrico (Vu *et al.*, 2009; Nocker *et al.*, 2012).

Com relação a produção de fitormônios, as três estirpes apresentaram genes do operon *Trp* relacionados a via de síntese do triptofano (Tabela S1), mas apenas a estirpe B119 apresentou o gene *YedL* responsável pela produção da AIA acetiltransferase, enzima chave da via de produção de hormônio AIA dependente de triptofano em bactérias (Putrie *et al.*, 2020). Um estudo demonstrou elevada produção de AIA pelas estirpes, com destaque para a estirpe B119 (De Sousa *et al.*, 2020). Esse

fato pode explicar os efeitos positivos significativos no crescimento das raízes nas plântulas de milho inoculadas com ela (Tabela 8). Esse efeito já foi demonstrado em diversas espécies de plantas (Mohite, 2013; Farhaoui et al., 2022, Kim et al., 2017; Bahadir et al., 2018; Robles Montoya et al., 2019).

Outro achado interessante foi a produção da enzima ACC desaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase), que é responsável conversão de ACC um precursor do etileno em α -cetobutirato e amônio pela estirpe B116. Essa enzima é importante por diminuir o nível do etileno em condições estressantes e auxiliar no crescimento vegetal (Singh et al., 2016).

Os genes responsáveis por produzir COVs estão presentes nos genomas das três estirpes estudadas (Eirini et al., 2023). Indicando que elas podem promover o crescimento vegetal através deste mecanismo. Alguns COVs funcionam como moléculas de sinalização química podem apresentar propriedades antimicrobianas, como dimetilsulfito. Isso foi demonstrado por Rojas-Solis et al., 2018, que observou que duas estirpes de *Bacillus* produziram compostos voláteis com atividades sinérgicas para promover o crescimento das plantas de tomate e antagonizar patógenos em potencial, como *Botrytis cinerea*. Um dos compostos voláteis foi o dissulfeto de dimetila (DMDS), que, quando adicionado em sua forma pura, foi capaz de inibir o crescimento micelial de *B. cinerea*.

Outra característica importante compartilhada pelas BPCP é a capacidade de solubilizar o fósforo, que é um macronutriente que em baixa concentração limita severamente o desenvolvimento e a produtividade das plantas (Fasusi et al., 2021; Santoyo et al., 2021). Todas as estirpes estudadas são capazes de produzir fitases e fosfatases (Velloso et al., 2020) e apresentaram genes responsáveis pelo metabolismo e solubilização de P, e pela produção de fosfatases além de sistemas de alta afinidade envolvidos no transporte ativo de P como os genes do operon *Pst*, presentes em todas as estirpes estudadas (Tabela S1). As fosfatases são enzimas liberadas por plantas e microrganismos, desempenhando um papel fundamental na clivagem do P orgânico, tornando-o disponível para a solução do solo e, por consequência, para as plantas (Oliverio et al., 2020, Neal et al., 2021). A fosfatase alcalina, em particular, é principalmente atribuída aos microrganismos presentes no solo (Wei et al., 2019). No contexto brasileiro, onde aproximadamente 80% do fósforo encontrado em solos agrícolas é de natureza orgânica (Novais et al., 2007), representando um importante reservatório desse nutriente, o papel das fosfatases

assume grande relevância. Isso ocorre porque a forma orgânica do fósforo não está prontamente disponível para as culturas agrícolas. Nesse sentido, a atividade das fosfatases no solo pode servir como um indicador valioso do potencial de mineralização do fósforo orgânico e da atividade biológica do solo (Chen, 2003). O fenótipo associado a esses genes foi descrito por De Sousa *et al* (2020), que mostraram que plantas de milho cultivadas sob P0 e inoculadas com as cepas B116 e B2084, apresentaram aumento significativo na produtividade (36 e 12%, respectivamente) e que a inoculação com B116 e B119 melhorou o acúmulo de P nos grãos (58 e 21%, respectivamente) comparando com o controle não inoculado. Incrementos significativos na produtividade de aproximadamente 18 e 26% foram observados nas plantas de milho inoculadas com B116 e B119, respectivamente, e adubadas com trifosfato (TSP). Além disso, as plantas inoculadas com a cepa B119 apresentaram um aumento de 24% no teor de P nos grãos em comparação com o controle não inoculado.

Outra característica analisada foi a produção de sideróforos. como a petrobactina, que é um sideroforo para transporte de ferro tipo III altamente específico que contribui para a absorção microbiana do ferro presente no ambiente que está presente nas estirpes estudadas (Manck *et al.*, 2022) (Tabela S1). Além disso, B116 apresentou os genes dos operon *Afu* e *Fbp*, responsáveis pelo sistema de transporte de ferro tipo III. Além de contribuir no crescimento das plantas de forma direta, diretamente, fornecendo ferro, os sideróforos podem contribuir indiretamente, limitando o acesso do ferro aos patógenos residentes na rizosfera (Santos-Vilalobos *et al.*, 2012).

Genes do metabolismo do nitrogênio também foram detectados nas estirpes, como *Nifu* e *f*, associados a fixação de nitrogênio, detectados em B116 e B119. genes *Nar*, associados a síntese das enzimas nitrito/nitrato redutase importantes para a oxidação da amônia, presentes em B2084 e B116. Estirpes capazes de promover a fixação de nitrogênio podem ajudar no aumento do rendimento de diversas culturas de interesse como já demonstrado na co-inoculação de plantas de trigo com cepas específicas de *Azotobacter* e *Pseudomonas* que aumentou o rendimento de grãos, o teor de proteínas e o índice de colheita quando comparado a plantas não inoculadas, resultando na em reduções de 25-50% nas doses de fertilizantes químicos no campo (Zaidi *et al.*, 2017). A co-inoculação de sementes de soja com estirpes de *Bacillus velezensis* S141 e *Bradyrhizobium* USDA110 resultou em aumentos significativos na

atividade de fixação de nitrogênio, nódulo, raiz e peso seco total da planta (Sibponkrung *et al.*, 2020).

Outro objetivo do estudo foi avaliar a eficiência da técnica de PCR em tempo de real na detecção de BPCP após eventos de inoculação. O PCR em tempo de real tem sido utilizado para validar a detecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (Boa Sorte *et al.*, 2014; Couillerot *et al.*, 2010b; Faleiro *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2021, da Silva *et al.*, 2023). No entanto, oligonucleotídeos para monitoramento de bactérias do gênero *Bacillus* são de difícil obtenção, devido a similaridade entre os membros da espécie. Neste estudo, desenhamos oligonucleotídeos com alta especificidade para as estirpes de *Bacillus* em estudo, os quais permitiram avaliar a colonização e permanência das estirpes, desde o momento da inoculação das sementes e nas plantas com até 22 dias de crescimento em condições de hidroponia. A estirpe B116 esteve presente na parte aérea apenas por um curto período de tempo demonstrando uma maior afinidade de colonização da estirpe apenas para as sementes e raízes das plantas inoculadas. A estirpe B119 foi capaz de adentrar o interior das sementes inoculadas após um dia de inoculação permanecendo presente durante os 22 dias de ocorrência do experimento, demonstrando uma maior afinidade da estirpe para a colonização das sementes quando comparada as estirpes B116 e B2084.

Foram observados mais genes relacionados a motilidade e quimiotaxia na estirpe B119 do que na B2084 e B116. Foi observada uma maior quantidade de DNA das estirpes B119 e B116 na semente do que em outros tecidos, durante o experimento. Já a estirpe B2084 foi detectada nas sementes após o terceiro dia da inoculação, sendo detectada na raiz a partir do quarto dia, e na parte aérea a partir do sétimo dia de experimento se mantendo em ambos os tecidos até o vigésimo segundo dia do experimento. É interessante notar que esta estirpe foi isolada da folha, enquanto as outras duas foram isoladas da rizosfera do genótipo de milho L3 eficiente em P, sob estresse de P (Oliveira *et al.*, 2009). Foi possível observar uma maior afinidade da estirpe B2084 para a colonização da parte aérea das plantas inoculadas onde esteve em maior quantidade desde o sétimo até o último dia do experimento, demonstrando então uma melhor colonização da parte aérea das plantas inoculadas quando comparada as estirpes B119 e B116.

A inoculação de plântulas de milho com as três estirpes estudadas resultou no aumento de superfície radicular e peso seco avaliadas (Tabela 8), corroborando

resultados prévios obtidos por de Sousa *et al.*, (2020) e Velloso *et al.*, (2020). As plantas inoculadas com as cepas B2084, B119 e B116 apresentaram maior sistema radicular e aumento na biomassa total (Tabela 8). Entretanto, as plantas inoculadas com B116 apresentaram sistema radicular mais fino (< 1 mm), enquanto as plantas inoculadas com B2084 e B119 apresentaram raízes um pouco mais espessas (< 2 mm) quando comparadas ao controle não inoculado. O crescimento de uma superfície radicular mais ampla está intimamente ligado à capacidade das plantas de adquirirem eficazmente nutrientes e água do solo. Raízes finas, com um diâmetro inferior a 2 mm, desempenham um papel de grande importância na reciclagem de água, nutrientes e carbono, constituindo um investimento significativo em termos de fotossintatos e recursos vegetais. Além disso, as raízes finas desempenham um papel crucial na interação com o ambiente circundante do solo por meio da liberação de compostos de carbono, que estimulam a atividade microbiana. Isso influencia a dinâmica de reservas de nutrientes no solo a curto e longo prazo e facilita a simbiose com fungos micorrízicos (McCormack *et al.*, 2015). Especialmente para nutrientes de baixa mobilidade, como o fósforo (P), as raízes finas são a principal via de absorção, o que se traduz em maior biomassa e maior tolerância ao estresse nas fases subsequentes do desenvolvimento da planta.

A co-inoculação de plântulas de milho com as estirpes B116 e B119 foi capaz de aumentar o diâmetro das raízes, a área de superfície radicular total, área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1 mm, entre 1 e 2 mm e maior do que 2 mm (Tabela 8). O tratamento com a estirpe B116 e B2084 foi capaz de aumentar o diâmetro total e o peso seco das raízes, enquanto que a co-inoculação com as três estirpes combinadas resultou em uma maior área de superfície das raízes finas com diâmetro entre 1 e 2 mm e superior a 2 mm (Tabela 8). No entanto, tal tratamento foi estatisticamente igual ao tratamento com a combinação das estirpes B119xB2084 e B116xB119 e para raízes com diâmetro entre 1 e 2 mm quando inoculadas apenas com a estirpe B119 (Tabela 8). Tais resultados demonstram que a inoculação com um consórcio de bactérias é uma alternativa promissora devido aos mecanismos combinados de cada estirpe (Souza *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2022).

7. CONCLUSÃO

As análises genômicas classificaram a estirpe B116 como *B. thuringiensis*, B119 como *P. megaterium* e B2084 como *B. subtilis* e demonstraram a presença de diferentes genes relacionados à promoção de crescimento em plantas. Foi possível observar que as estirpes possuíam genes em comum relacionados a promoção de crescimento, as estirpes B116 e B119 possuem genes exclusivos relacionados a promoção de crescimento enquanto a estirpe B2084 não possuía nenhum gene exclusivo em categorias de promoção de crescimento em seu genoma, compartilhando todos os seus genes com as estirpes B116 e B119.

O desenvolvimento dos oligonucleotídeos cepa-específicos possibilitou o entendimento do processo de colonização dessas estirpes em plantas de milho, onde foi possível observar não só o tempo de permanência como a entrada das estirpes no tecido vegetal. A estirpe B2084 isolada da folha de milho foi capaz de colonizar todos os tecidos vegetais, mas demonstrou uma maior afinidade para a colonização da parte aérea das plantas inoculadas, já a estirpe B119 isolada da rizosfera de milho demonstrou uma maior afinidade com as sementes sendo detectada desde as primeiras 24 horas de inoculação, sendo encontrada também em todos os tecidos vegetais. Enquanto a estirpe B116 também isolada da rizosfera de milho foi capaz de colonizar todos os tecidos vegetais, mas permaneceu apenas na semente durante todo período do experimento.

A inoculação das estirpes em milho levou a um aumento significativo na biomassa das plantas, onde as estirpes foram capazes de aumentar tanto o peso seco total das plantas como as raízes grossas e finas. A co-inoculação de plantas de milho com um consórcio das bactérias estudadas demonstrou ser benéfica onde promoveu o aumento da biomassa total das plantas, aumentando também o seu peso seco total e o volume de raízes grossas e finas.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, E.; Holmström, S.J.M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7: 196-208. doi: 10.1111/17517915.12117
- Ajjah, N.; Fiodor, A.; Pandey, A.K.; Rana, A.; Pranaw, K. (2023). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. *Diversity*, 15:112. <https://doi.org/10.3390/d15010112>
- Allard-Massicotte, R.; Tessier, L.; Lécuyer, F.; Lakshmanan, V.; Lucier, J. F.; Garneau, D., et al. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio*, 7:e01664-16. doi: 10.1128/mBio.01664-16
- Almeida, E.P.C; Zaroni, M.J; Santos, H.G. Solos Tropicais. Agência Embrapa de informação tecnológica. disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONTAG01_1_2_212200611535.html acessado em: 28/01/20
- Anothai, J.; Chairin, T. (2022). Analysis of rhizobacterial community associated with the occurrence of Ganoderma basal stem rot disease in oil palm by Illumina next-generation sequencing. *Arch Microbiol* 204:31. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02670-3>
- Zboralski, A.; Filion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp.. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18:3539-3554. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.025>
- Akhtar, S. S; Mekureyaw, M. F; Pandey, C.; Roitsch, T. (2020). Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01777>
- Akinrinlola, R. J; Yuen. G. Y; Drijber, R. A; Adesemoye A. O. (2018). Evaluation of Bacillus strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by in vitro Physiological Traits. *International Journal of Microbiology*, Article ID 5686874.
- Apel, K.; Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Arkipova, T.; Martynenko, E.; Sharipova, G.; Kuzmina, L.; Ivanov, I.; Garipova, M.; Kudoyarova, G. (2020). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on the content of abscisic acid and salt resistance of wheat plants. *Plants* 9:1429. <https://doi.org/10.3390/plants9111429>
- Arruda, O. G. et Al. (2011). Comparação de custos de implantação de eucalipto com resíduo celulósico em substituição ao fertilizante mineral. *Rev. Ceres, Viçosa*, 58(5): 576-583.
- Ausmees, N; Jonsson, H; Höglund, S; Ljunggren, H; And Lindberg, M. (1999). Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* 145: 1253–1262.

- Balsanelli, E.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Faoro, H.; Pankievicz, V.C.; De Baura, V.A.; Pedrosa, F.O.; De Souza, E.M.; Dixon, R.; Monteiro, R.A. (2016). *H. seropedicae* transcript profiles in maize rhizosphere. *Environ Microbiol*, 18:2343-2356. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12887>
- Bahadir, P. S.; Liaqat, F.; Eltem, R. (2018). Plant growth promoting properties of solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean region of Turkey. *Turk J Bot*. 42:183-196. doi:10.3906/bot-1706-51
- Bardou, P; Mariette, J; Escudié, F; Djemiel, C; Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*. 15:293 doi:10.1186/1471-2105-15-293
- Batista, B. D., Taniguti, L. M., Almeida, J. R., Azevedo, J. L., and Quecine, M. C. (2016). Draft genome sequence of multitrait plant growth-promoting *Bacillus* sp. strain RZ2MS9. *Genome Announc*. 4:e01402-16. doi: 10.1128/genomeA.0140216
- Berne, C; Ducret, A; Hardy, G.G; Brun, Y.V. (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0018-2015>.
- Bilal, L; Asaf, S; Hamayun, M. et al. (2018). Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis* 76:117–127. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0545-4>
- Bittencourt, P.P.; Alves, A.F.; Ferreira, M.B.; Da Silva Irineu, L.E.S.; Pinto, V.B.; Olivares, F.L. (2023). Mechanisms and applications of bacterial inoculants in plant drought stress tolerance. *microorganisms*. 11:502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020502>
- 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. *Front Microbiol*. 21(8):411. doi: 10.3389/fmicb.2017.00411.
- Blake, C; Christensen, M. N; Ákos T. (2021). Kovács Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis* *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 34(1):15-25.
- Boa Sorte, P. M. F; Simões-Araújo, J. L; de Melo, L. H. V; P. de S. Galisa, L. L; Baldani, J. I; Baldani, V. L. D. (2014). Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions *Afr. J. Microbiol. Res.*, 8: 2937-2946, 10.5897/ajmr2014.6779
- Bodenhause, N; Horton, M. W; Bergelson, J. (2013). Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8(2): e56329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>
- Bosoki, R; et al. (2017). Otimização econômica na seleção de fertilizantes em propriedades rurais. *Gl. Sci Technol*. 10(2):1-12.
- Bustin, S; Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 14:19-28, <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>

- Cai, X.; Kang, X.; Xi, H.; Liu, C.; Xue, Y. (2016). Complete genome sequence of the endophytic biocontrol strain *Bacillus velezensis* CC09. *Genome Announc.* 4:e01048-16. doi: 10.1128/genomeA.01048-16
- Camejo, D.; Guzmán-Cedeño, Á.; Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Biochem.* 103:10-23. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.02.035
- Carroll, C.S; Moore, M.M. (2018). Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 53:4, 356-381, doi: 10.1080/10409238.2018.1476449
- Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N. et al. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biol Fertil Soils* 47, 495–506. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0556-2>
- Chagas, F. O; Pessotti, R. C; Caraballo-Rodríguez, A. M; Pupo, M. T. (2018). Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem. Soc. Rev.* 47:1652-1704. doi: 10.1039/C7CS00343A
- Cerozi, B; Fitzsimmons, K. (2016). Use of *Bacillus* spp. to enhance phosphorus availability and serve as a plant growth promoter in aquaponics systems. *Scientia Horticulturae.* 211:277-282. 10.1016/j.scienta.2016.09.005.
- Couillerot, O; Bouffaud, M. L; Baudoin, E; Muller, D; Caballero-Mellado, J; Moënne-Loccoz, Y. (2010). Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings, *Soil Biology and Biochemistry,* 42(12): 2298-2305, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.003>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
- Compant, D.; Mathieu, F. (2013). Use of DOPE-FISH tool to better visualize colonization of plants by beneficial bacteria? An example with *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 colonizing grapevine plants. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere.* 929-931.
- Conceição, P. M. et al. (2009). Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciência Rural,* 39(6).
- Conesa, A.; Götz, S.; Gómez, J.M.G.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics. *research, Bioinformatics.* 21(18):3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Chai, Y.N.; Futrell, S.; Schachtman, D.P. (2022). Assessment of Bacterial Inoculant Delivery Methods for Cereal Crops. *Frontiers in Microbiology,* 13. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2022.791110>
- Chagas, F.O.; Pessotti, R.C.; Caraballo-Rodríguez, A.M.; Pupo, M.T. (2018). Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem. Soc. Rev.* 47:1652-1704. doi: 10.1039/C7CS00343A

- Chen, H. (2003). Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. *Forest Ecology and Management*, 178(3): 301-310. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00478-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00478-4)
- Chen, X. H.; Koumoutsis, A.; Scholz, R.; Eisenreich, A.; Schneider, K.; Heinemeyer, I.; et al. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* 25: 1007-10014. doi: 10.1038/nbt1325
- Choi, G.; Dukyun, K.; Hanhyeok, I.; Sang, Ho, C. (2021). A nitric oxide-responsive transcriptional regulator nsrr cooperates with lrp and crp to tightly control the hmpa gene in *Vibrio vulnificus*. *Frontiers in Microbiology*. 12. doi=10.3389/fmicb.2021.681196
- Christopher, B; Mathilde, N. C; And Akos T. Kovacs†. (2021). Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. *MPMI* 34(1):15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Crowley, D.A. (2006). Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. L.L. Barton, and J. Abadía (eds). Netherlands: Springer, pp. 169– 189.
- Cruz, A.M; Pereira, F.S; Figueiredo. V.S. (2017). Fertilizantes organominerais de resíduos do agronegócio: avaliação do potencial econômico brasileiro. *Indústria química | BNDES Setorial* 45:137-187.
- Deorowicz, S; Gudyś, A; Długosz, M; Kokot, M; Danek, A. (2019). Kmer-db: instant evolutionary distance estimation, *Bioinformatics*. 35(1):133–136. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty610>
- da Silva Hermenegildo, P., de Freitas, R.G., de Souza Cascardo, R. et al. (2023). Sensitive detection, quantification, and monitoring of *Erwinia psidii* colonization of guava plants using intercalating dye-based real-time PCR. *Trop. Plant Pathol.* 48, 375–383. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00542-9>
- de Almeida, J.R; Bonatelli, M.L; Batista, B.D; Teixeira-Silva, N.S; Mondin, M; Dos Santos, R.C; Bento, J.M.S; De Almeida Hayashibara, C.A; Azevedo, J.L. Quecine, M.C. (2021). *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. *Environmental Microbiology Reports*, 13:812-821. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13004>
- de los Santos-Villalobos, S.; Barrera-Galicia, G.C.; Miranda-Salcedo, M.A.; Peña-Cabriales, J.J. (2012). *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:2615–2623.
- de Sousa, S.M.; Oliveira, C.A.; Andrade, D.L.; Carvalho, C.G.; Ribeiro, V.P.; Pastina, M.M. et al. (2021). Tropical *Bacillus* Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. *J Plant Growth Regul.* 40:867–877. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>
- de Bruijn, F.J. (2014). Biological Nitrogen Fixation. *Principles of Plant-Microbe Interactions*, 215–224. doi:10.1007/978-3-319-08575-3_23

- Diaz, P.A.E. (2018). *Bacillus* spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2018vii, 46p.
- Dilfuza, E; Wirth, S. J; Alqarawi, A. A; Abd, A. E. F; Hashem, A. (2017). Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*. 8:2104. doi=10.3389/fmicb.2017.02104
- Zaid, D.S.; Cai, S.; Hu, C.; Li, Z.; Li, Y. (2022). Comparative Genome Analysis Reveals Phylogenetic Identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and Genomic Insights into Its Plant Growth Promotion and Biocontrol Effects. *Microbiol Spectr*.10(1):e0216921. doi: 10.1128/spectrum.02169-21.
- Doornbos, R.F.; Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron Sustain Dev* 32, 227-243. doi: 10.1007/s13593-011-0028-y
- Poulaki E.G.; Tjamos, S.E. (2023) *Bacillus* species: factories of plant protective volatile organic compounds, *Journal of Applied Microbiology*. 134(3): lxad037, <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad037>
- Estrada-Bonilla, G. A.; Durrer, A; Cardoso, E.J.B.N. (2021). Use of compost and phosphate-solubilizing bacteria affect sugarcane mineral nutrition, phosphorus availability, and the soil bacterial community. *Applied Soil Ecology*. 157, 103760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103760>
- Etesami, H; Jeong, Br., Glick, Br. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. *Front. Plant Sci*. 12:699618. doi: 10.3389/fpls.2021.699618
- Faleiro, A.C.; Pereira, T.P.; Espindula, E.; et al. (2013). Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. *Symbiosis*. 61:125–133 <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0262-y>
- Farhaoui, A.; Adadi, A.; Tahiri, A.; Alami, N.E; Khayi, S.; Mentag, R.; Ezrari, S.; Radouane, N.; Mokri, F.; Belabess, Z.; Lahlali, R. (2022). Biocontrol potential of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) against *Sclerotium rolfsii* diseases on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 119:101829. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101829>.
- Fasusi, O.A.; Cruz, C.; Babalola, O.O. (2021). Agricultural sustainability: microbial biofertilizers in rhizosphere management. *Agriculture*. 1:163. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020163>
- Fehler, A.O.; Kallehauge, T.B.; Geissler, A.S. et al. (2022). Flagella disruption in *Bacillus subtilis* increases amylase production yield. *Microb Cell Fact*. 21:131. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01861-x>
- Gamalero, E; Lingua, G; Berta, G; Lemanceau, P. (2003). Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie*. 23:407-418
- Gong, H; Sun, L; Chen, B. et al. (2016). Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Sci Rep* 6:38513. <https://doi.org/10.1038/srep38513>

- Guo, S.; Li, X.; He, P.; Ho, H.; Wu, Y.; He, Y. (2015). Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. *J Ind Microbiol Biotechnol.*42(6):925-37. doi: 10.1007/s10295-015-1612-y
- Gupta et al. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *Syst. Evol. Microbiol.* 70:5753–5798.
- Gallagher, S; Wiley, E. (2008). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* || Real-Time PCR. doi:10.1002/9780470089941.et1003s00
- Glick, B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications.* Scientifica, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Granada, C.E; Passaglia, L.M.P; De Souza, E.M; Sperotto, R.A. (2018). Is Phosphate Solubilization the Forgotten Child of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria? *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02054>
- Hashem, A.; Tabassum, B.; Allah, E.F.A. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 26(6):291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hiltner, L. (1904). Über nevere Erfahrungen und Probleme a Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Beurchsichtigung der Grundung und Broche. Arbeit. Deut. Landw. Ges. Berlin. 9:59-78.
- Horna, G.; Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiological Research*, 246:126719. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>
- Hu, T.; Chitnis, N.; Monos, D.; Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11):801–811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Ibort, P; Molina, S; Núñez, R; Zamarreño, Á. M; García-Mina, J. M; Ruiz-Lozano, J. M; Orozco-Mosqueda, M. Del C; Glick, B. R; Aroca, R. (2017). Tomato ethylene sensitivity determines interaction with plant growth-promoting bacteria. *Annals of Botany*, 120(1): 101–122. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx052>
- Igiehon, N.O; Babalola, O.O.; Aremu, B.R. (2019). Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought stress. *BMC Microbiol* 19:159. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1536-1>
- Jaiswar, A; Varshney, D; Kaushik, V; Sharma, N; Bedi, A. (2023). Plant-Associated Bacteria in Ecosystems Functioning and Sustainability. In: Bhat, R.A., Butnariu, M., Dar, G.H., Hakeem, K.R. (eds) *Microbial Bioremediation.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-18017-0_15
- Jiang, C.H.; Chen, Y.; Yan, F.; Fan, Z.H.; Guo, J.H. (2017) Whole-genome sequence of *Bacillus cereus* AR156, a potential biocontrol agent with high soilborne disease biocontrol efficacy and plant growth promotion. *Genome Announc.* 5(35):e00886-17. doi: 10.1128/genomeA.00886-17

- Kanehisa, M.; Sato, Y.; Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol.* 428(4):726-731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Kandel, S; Joubert, P; And Doty, S. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5:77.
- Kaplinski, L; Lepamets, M; Remm, M. (2015). GenomeTester4: a toolkit for performing basic set operations - union, intersection and complement on k-mer lists. *Gigascience.* 4:58. doi: 10.1186/s13742-015-0097-y.
- Kendall, K.; Roberts, A.D. (2015). Van der Waals forces influencing adhesion of cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370: 20140078–20140078.
- Keswani, C; Singh, S.P; Cueto, L. et al. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104:8549–8565. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10890-8>
- Kim, S.Y.; Song, H.; Sang, M.K.; Weon, H.Y.; Song, J. (2017). The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid. *J. Biotechnol.* 259:221-227. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1206
- Knights, H.E; Jorrin, B; Haskett, T.L.; Poole, P.S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13: 428-444. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Kranth, I;R.K.; Usha, R.S.; Erravelli, B.; Indrama, D.; Biswanath, B.; Onkar N.T. (2018). Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: A critical review. *Carbohydrate Polymers.* 199:353-364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.037>.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lemanceau, P.; Barret, M.; Blouin, M.; Mazurier, S.; Pivato, B. (2018). Plant Microorganism Interactions in the Rhizosphere. *Soils as a Key Component of the Critical Zone 6. Ecology* 6, 57-81. doi: 10.1002/9781119438274.ch4
- Liu, C; Muchhal, U.S; Uthappa, M; Kononowicz, A.K; Raghothama, K. G. (1998). Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology* 116, 91-99. doi: 10.1104/pp.116.1.91
- Lopes, C.M.; Silva, A.M.M.; Estrada-Bonilla, G.A.; Ferraz-Almeida, R.; Vieira, J.L.V.; Otto, R., Vitti, G. C.; Cardoso, E.J.B.N. (2021). Improving the fertilizer value of sugarcane wastes through phosphate rock amendment and phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Journal of Cleaner Production*, 298, 126821. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126821>
- Ma, Y.; Oliveira, R.S.; Wu, L.; Luo, Y.; Rajkumar, M.; Rocha, I.; Freitas, H. (2015). Inoculation with Metal-Mobilizing Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus* sp. SC2b and Its Role in Rhizoremediation. *J. Toxicol Environ Health A.* 78 (13-14):931-44. doi: 10.1080/15287394.2015.1051205

- Marchetti, M.M; Barp, E. A. (2015). Rhizosphere Effect: The Importance of Bacteria Nitrogen-Fixing for solo / Plan – review, Ignis Caçador. 4(1):61-71.
- Martinez-Gil, M; Yousef-Coronado, F; EspinosaUurgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol Microbiol.* 77: 549–561.
- Manck, L.E.; Park, J.; Tully, B.J. et al. (2022). Petrobactin, a siderophore produced by *Alteromonas*, mediates community iron acquisition in the global ocean. *ISME J.* 16, 358–369. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01065-y>
- Masalha, J.; Kosegarten, H.; Elmaci, Ömer; Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils.* 30. 433-439. 10.1007/s003740050021
- Matthysse, A.G. (1983). Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infecção. *J. Bacteriol.* 154: 906 - 915.
- Mazzuchelli, R.C.L.; Sossai, B.F.; Araujo, F.F. (2014). Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Colloquium Agrariae.* 10(2).
- McCormack, M.L.; Dickie, I.A.; Eissenstat, D.M.; Fahey, T.J.; Fernandez, C.W.; Guo, D.; Helmisaari, H.-S.; Hobbie, E.A.; Iversen, C.M.; Jackson, R.B.; Leppälammikujansuu, J.; Norby, R.J.; Phillips, R.P.; Pregitzer, K.S.; Pritchard, S.G.; Rewald, B.; Zadworny, M. (2015). Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytol.* 207: 505-518. <https://doi.org/10.1111/nph.13363>
- Meneses, C.H.S.G.; Rouws, L.F.M.; Simões-Araújo, J.L.; Vidal, M.S.; Baldani, J.I. (2011). Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011, 24, 1448–1458.
- Mengel, K. (1994). Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil* 165, 275–283. <https://doi.org/10.1007/BF00008070>
- Merritt, P.M.; Danhorn, T.; Fuqua, C. (2007) Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. *J. Bacteriol.* Nov;189(22):8005-14. doi: 10.1128/JB.00566-07
- Mohammed, A.F. (2018). Effectiveness of exopolysaccharides and biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance of faba bean (*Vicia faba* L.). *African Journal of Microbiology Research*, 12(17), 399-404.
- Monteiro, R.A; Balsanelli, E; Tuleski, T; Faoro, H; Cruz, L.M; Wasseem, R., et al. (2012) Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 80: 441–451.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 13, 638-649. doi: 10.4067/S0718-95162013005000051
- Mus, F; Crook, M. B; Garcia, K; Costas, A. G; Geddes, B. A; Kouri, E. D. et al. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:3698-3710. doi: 10.1128/AEM.0105516

- Nascimento, F.X.; Hernández, A.G.; Glick, B.R.; Rossi, M.J. (2020). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*. 25:e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
- Nagorska, K.; Ostrowski, A.; Hinc, K., Holland, I.B.; Obuchowski, M. (2010). Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *J Appl Genet*. 51(3):369-81. doi: 10.1007/BF03208867. PMID: 20720312
- Neal, A. L; McLaren, T; Campolino, M. L; Hughes, D; Coelho, A. M; Lana, U. G. P; Gomes, E. A; de Sousa, S. M. Crop type exerts greater influence upon rhizosphere phosphohydrolase gene abundance and phylogenetic diversity than phosphorus fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*. 97(4): fiab033. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab033>
- Nocker, A.; Fernández, P.S.; Montijn, R.; Schuren, F. (2012). Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment. *J. Microbiol. Methods* 90:86-95. doi: 10.1016/j.mimet.2012.04.015
- Novais, R.F. *et al.* (2007) Fósforo. In: *Fertilidade do solo*. Viçosa: Viçosa, p.472-537.
- Olanrewaju, O.S; Glick, B.R.; Babalola, O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33:197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Oliveira, C.A.; Cota, L.V.; Marriel, I.E.; Gomes, E.A.; Sousa, S.M.; Lana, U.G.P.; Santos, F.C.; Junior, A.S.P.; Alves, V.M.C. Viabilidade Técnica e Econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas Culturas de Milho e Soja Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1126348>
- Oliveira, C.A.; Alves V.M.C.; Marriel, I.E.; Gomes E.A.; Scotti M.R.; Carneiro N.P; Sa N.M.H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol Biochem* 41:1782-1787. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.01.012
- Oliverio, A. M.; Bissett, A.; McGuire, K.; Saltonstall, K.; Turnere, B.L.; Fierer, N. (2020). The Role of Phosphorus Limitation in Shaping Soil Bacterial Communities and Their Metabolic Capabilities. *Ecological and Evolutionary Science* 11(5): 10.1128/mbio.01718-20 <https://doi.org/10.1128/mbio.01718-20>
- Paulucci, N.S.; Gallarato, L.A.; Reguera, Y.B.; Vicario, J.C.; Cesari, A.B.; De Lema, M.B.G.; Dardanelli, M.S. (2015). *Arachis hypogaea* PGPR isolated from argentine soil modifies its lipids components in response to temperature and salinity. *Microbiol. Res*. 173:1–9.
- Parnell, J. J; Berka, R; Young, H. A; Sturino, J. M; Kang, Y; Barnhart, D. M; Dileo, M. V. (2016). From the Lab to the Farm: an industrial perspective of plant beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01110>
- Podile, A.R.; G.K. Kishore, (2006). Plant growth promoting rhizobacteria. in: *plant-associated bacteria*, Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Springer, The Netherlands, ISBN-10: 978-1-4020-4538-7, pp: 195-230.

- Pedrolo, A.; Cunha, T.; Gnecco, E.; Ana, N.A. (2022). Enumeration of plant-growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* viable cells by a new propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR) assay. 10.21203/rs.3.rs-2347370/v1
- Pereira, T. P.; Amaral, F.P.; Dall'asta, P.; Brod, F.C.A; Arisi, A.C.M. (2014). Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. *Molecular Biotechnology*, 56(7):660–670. doi:10.1007/s12033-014-9742-4
- Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007.
- Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 25(7):1253-6. doi: 10.1093/molbev/msn083.
- Putrie, R.F. W *et al* (2021). The structure characteristic of IAA n-acetyl-transferase enzyme produced by two species of bacteria (*Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*). IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 762 012054. doi:10.1088/1755-1315/762/1/012054.
- Rabinovitch, L. et al. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In: Fiuza, L., Polanczyk, R., Crickmore, N. (eds) *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_1
- Rilling, J. I.; Acuña, J.J.; Nannipieri, P; Cassan, F.; Maruyama, F.; Jorquera, M.A. (2019). Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria, *Soil Biology and Biochemistry*.130: 205-219. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>
- Robles Montoya, R.I.; Parra Cota, F.I.; de los Santos Villalobos, S. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9, 201. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1726-4>
- Rojas-Solís, D.; Zetter-Salmón, E.; Contreras-Pérez, M.; Rocha-Granados, M.D.C.; Macías-Rodríguez, L.; Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13.
- Santoyo, G.; Urtis-Flores, C.A.; Loeza-Lara, P.D.; Orozco-Mosqueda, M.D.C.; Glick, B.R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*. 10:475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
- Sasse, J.; Martinoia, E.; Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 23:25-41. doi: 10.1016/j.tplants.2017.09.003.
- Schlöter, M; Hartmann, A. (1996). Production and characterization of strain-specific monoclonal antibodies against outer membrane components of *Azospirillum brasilense* Sp245 Hybridoma, *15:225-232*.

Shu, K; Zhou, W; Chen, F; Luo, X; Yang, W. (2018). Abscisic Acid and Gibberellins Antagonistically Mediate Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00416>.

Sibponkrung, S.; Kondo, T.; Tanaka, K.; Tittabutr, P.; Boonkerd, N.; Yoshida, K.-I.; Teaumroong, N. (2020). Co-Inoculation of *Bacillus velezensis* Strain S141 and *Bradyrhizobium* Strains Promotes Nodule Growth and Nitrogen Fixation. *Microorganisms*. 8:678. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050678>

Silveira, E. L: Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. 2008. xiii, 83 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103886>>.

Silke, R.; Jörg, R.; Wolfgang, M. (2006). Quantification and Localization of Bacteria in Plant Tissues Using Quantitative Real-Time PCR and Online Emission Fingerprinting. *Plant and Soil*. 286(1-2):21–35. doi:10.1007/s11104-006-9023-5

Smith, V.; Malin, J.; Toril, L.; Ida K., H; Sarah, F; et al. (2020). *MogR* is a ubiquitous transcriptional repressor affecting motility, biofilm formation and virulence in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 11.doi=10.3389/fmicb.2020.610650

Soares, I. C.; Pacheco, R. S.; da Silva, C. G. N. et al. (2021). Real-time PCR method to quantify Sp245 strain of *Azospirillum baldaniorum* on Brachiaria grasses under field conditions. *Plant and Soil* .468:525–538. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05137-y>

Souza, R.D.; Ambrosini, A.; Passaglia, L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* 38:401-419. doi:10.1590/S1415-475738420150053.

Stothard, P.; Wishart, D. (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*, 21(4):537–539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti054>.

Shao, J; Zhang N. X; Shen, Q; Zhang, R. (2015). Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biol Fertil Soils* 51:321–330 DOI 10.1007/s00374-014-0978

Songqiang, D; Tan K; Longtai Li; Shenwen, C; Yuyue, Z; Yue Liu; Limin Guo; Lanzhou Chen; Dayi Zhang. (2018). Impacts of environmental factors on the whole microbial communities in the rhizosphere of a metal-tolerant plant: *Elsholtzia haichowensis* Sun, *Environmental Pollution*. 237:1088-1097. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.037-8>, 2015.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2013). *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed.

Trivedi, P.; Leach, J.E.; Tringe, S.G. et al. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol*. 18:607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research. 35:W71-W74; doi:10.1093/nar/gkm306

Van Loosdrecht, M.C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.E.; Zehnder, A.J. (1987). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53: 1893 -1897.

- Velloso, C.C.V. (2019). Caracterização de cepas de *Bacillus* e avaliação do seu potencial de promoção de crescimento em genótipos de milho. Tese doutorado. Universidade Federal de São João del-Rei.
- Vikram, A.; Nam, S.; Soding, J.; Lupas, A. N. (2016). The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic Acids Researc.* 44. doi: 10.1093/nar/gkw348.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van De Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 23:4407-4414.
- Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R.J.; Ivanova, E. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14:2535-2554. doi: 10.3390/molecules14072535
- Walker, V.; Couillerot, O.; Von Felten, A.; et al. (2012). Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus consortium* under field conditions. *Plant Soil* 356:151–163. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0960-2>.
- Wang, J.; Sidharth, S.; Zeng, S.; Jiang, Y; Chan, Y.O.; Lyu, Z. et Al. (2022). Bioinformatics for plant and agricultural discoveries in the age of multiomics: A review and case study of maize nodal root growth under water deficit. *Physiologia Plantarum.* 174(2): e13672. <https://doi.org/10.1111/ppl.13672>
- Weng, J.; Wang, Y.; Li, J. et al. (2013). Enhanced root colonization and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by *abrB* gene disruption. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:8823–8830. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4572-4>
- Wei, X.; Zheng, L.; Tian, Y.; Wang, H.; Su, Y.; Feng, G.; Wang, C.; Lu, Z. (2022). Tyrosine phosphatase SHP2 in ovarian granulosa cells balances follicular development by inhibiting PI3K/AKT signaling. *J Mol Cell Biol.* 14(7):mjac048. doi: 10.1093/jmcb/mjac048
- Wheatley, R.M.; Poole, P.S. (2018). Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiol Rev* 42: 448–461.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13:134.
- Zaidi, A.; Khan, M.S.; Saif, S.; Rizvi, A.; Ahmed, B.; Shahid, M. (2017). Role of nitrogen-fixing plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. In *Microbial Strategies for Vegetable Production*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 49–79.
- Zhang, T.; Fang, H. H. (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 281–289. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0333-6>
- Zhang, Y., Gao, X., Wang, S. et al. (2018). Application of *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 enhanced plant growth associated with efficient rhizospheric colonization monitored by qPCR with primers designed from the whole genome sequence. *Curr Microbiol* 75:1574–1583. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1563-4>

Zhu, M.; Wu, X.; Wang, Y.; Dai, Y. (2020). Role of Biofilm Formation by *Bacillus pumilus* HR10 in Biocontrol against Pine Seedling Damping-Off Disease Caused by *Rhizoctonia solani*. *Forests*. 11:652.

ANEXO I

Tabela S1. Genes relacionados a promoção de crescimento encontrados nas estirpes B116, B119 e B2084.

B116 gene ID	B119 gene ID	B2084 gene ID	Function [EC No.]	KO	Gene
Phosphorus metabolism					
GFFKBBAP_00567, GFFKBBAP_04518	PLGCOHOI_00970	-	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS [TC 3.A.1.7.1]	K02040	<i>pstS</i>
GFFKBBAP_04519, GFFKBBAP_00566	PLGCOHOI_00969	-	phosphate transport system permease protein PstC [TC 3.A.1.7.1]	K02037	<i>pstC</i>
GFFKBBAP_00565, GFFKBBAP_04520	PLGCOHOI_00968	IMMNMPHA_03004	phosphate transport system permease protein PstA [TC 3.A.1.7.1]	K02038	<i>pstA</i>
GFFKBBAP_00564	PLGCOHOI_00860	IMMNMPHA_03002	phosphate transport ATP-binding protein PstB [TC 3.A.1.7.1] [EC:7.3.2.1]	K02036	<i>pstB</i>
GFFKBBAP_03221, GFFKBBAP_03805	PLGCOHOI_02476	-	Alkylphosphonate utilization operon protein PhnA [EC:3.11.1.2]	K06193	<i>phnA</i>
GFFKBBAP_00942, GFFKBBAP_03440	PLGCOHOI_02763, PLGCOHOI_06337	-	PhnB protein 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	K04750	<i>phnB</i>
GFFKBBAP_03527	-	-	phosphonate transport system ATP- binding protein [EC:7.3.2.2]	K02041	<i>phnC</i>
GFFKBBAP_03528	-	-	phosphonate transport system substrate-binding protein	K02044	<i>phnD</i>
GFFKBBAP_03525, GFFKBBAP_03526	-	-	phosphonate transport system permease protein	K02042	<i>phnE</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00082, GFFKBBAP_00347, GFFKBBAP_01150	PLGCOHOI_00479, PL GCOHOI_01555, PLGCOHOI_01887	-	HTH-type transcriptional repressor YvoA	K03710	<i>phnF</i>
GFFKBBAP_01372	-	-	(aminoalkyl)phosphonate N- acetyltransferase [EC:2.3.1.280]	K09994	<i>phnO</i>
GFFKBBAP_00518	-	-	GntR family transcriptional regulator	K07979	<i>phnR</i>
GFFKBBAP_02405, GFFKBBAP_01586	PLGCOHOI_02389, PLGCOHOI_03757	-	2-aminoethylphosphonate-pyruvate transaminase [EC:2.6.1.37]	K03430	<i>phnW</i>
GFFKBBAP_02404	PLGCOHOI_02390	-	phosphonoacetaldehyde hydrolase [EC:3.11.1.1]	K05306	<i>phnX</i>
GFFKBBAP_00886	PLGCOHOI_01111, PLGCOHOI_02094	-	phosphate regulon sensor histidine kinase PhoR [EC:2.7.13.3]	K07636	<i>phoR</i>
GFFKBBAP_00640, GFFKBBAP_02178	PLGCOHOI_01550, PLGCOHOI_01840	IMMNMPHA_01822, IMMNMPHA_03196	alkaline phosphatase [EC:3.1.3.1]	K01077	<i>phoA</i> , <i>phoB</i>
GFFKBBAP_00887	PLGCOHOI_01112	IMMNMPHA_00169	alkaline phosphatase synthesis response regulator PhoP	K07658	<i>phoB1</i> , <i>phoP</i>
-	PLGCOHOI_04114,	IMMNMPHA_03538	alkaline phosphatase D [EC:3.1.3.1]	K01113	<i>phoD</i>
GFFKBBAP_00226	-	-	putative phosphoglycerate mutase	K15640	<i>phoE</i>
GFFKBBAP_00243	PLGCOHOI_01698	-	PhoH-like ATPase	K07175	<i>phoH2</i>
GFFKBBAP_00598	PLGCOHOI_00900	-	phosphate starvation-inducible protein PhoH and related proteins	K06217	<i>phoH</i> , <i>phoL</i>
GFFKBBAP_00563, GFFKBBAP_00563	PLGCOHOI_00859	-	phosphate transport system regulatory protein PhoU	K02039	<i>phoU</i>
GFFKBBAP_02529	PLGCOHOI_01055	-	inorganic phosphate transporter, PiT family	K03306	<i>pitA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_02012	PLGCOHOI_04565	IMMNMPHA_00671	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase [EC:3.6.1.1]	K15986	<i>ppaC</i>
GFFKBBAP_01993	-	IMMNMPHA_01235	phosphinothricin acetyltransferase [EC:2.3.1.183]	K03823	<i>pat,bar</i>
-	PLGCOHOI_03759	-	phosphoenolpyruvate phosphomutase [EC:5.4.2.9]	K01841	<i>pepM</i>
-	PLGCOHOI_03758	-	phosphonopyruvate decarboxylase [EC:4.1.1.82]	K09459	<i>ppd</i>
GFFKBBAP_03614	PLGCOHOI_04135	IMMNMPHA_00187	pyrophosphatase PpaX [EC:3.6.1.1]	K06019	<i>ppaX</i>
GFFKBBAP_00287	PLGCOHOI_01745, PLGCOHOI_01745	-	polyphosphate kinase [EC 2.7.4.1]	K00937	<i>ppk</i>
GFFKBBAP_02835	-	-	polyphosphate kinase [EC 2.7.4.1]	K22468	<i>ppk2</i>
GFFKBBAP_04909	-	-	Sodium-dependent phosphate transporter	K03324	<i>yjbB</i>
Nitrogen metabolism					
GFFKBBAP_01303	PLGCOHOI_03764	IMMNMPHA_03611	MFS transporter, NNP family, nitrate/nitrite transporter	K02575	<i>narK, nrtP, nasA</i>
GFFKBBAP_02445	PLGCOHOI_04711, PLGCOHOI_05095	-	nitronate monooxygenase [EC:1.13.12.16]	K00459	<i>ncd2, npd</i>
GFFKBBAP_02565	PLGCOHOI_04786, PLGCOHOI_00701, PLGCOHOI_02848	IMMNMPHA_02297,IMM NMPHA_02595	glutamate dehydrogenase [EC:1.4.1.2]	K00260	<i>gudB, rocG</i>
GFFKBBAP_04532	PLGCOHOI_03251	IMMNMPHA_01500	glutamate synthase (NADPH) large chain [EC:1.4.1.13]	K00265	<i>gltB</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_03250	-	glutamate synthase (NADPH) small chain [EC:1.4.1.13]	K00266	<i>gltD</i>
GFFKBBAP_03020, GFFKBBAP_03665, GFFKBBAP_01104	PLGCOHOI_04476, PLGCOHOI_01219	-	carbonic anhydrase [EC:4.2.1.1]	K01673	<i>cynT</i> , <i>can</i>
GFFKBBAP_02501	-	-	ferredoxin-nitrite reductase [EC:1.7.7.1]	K00366	<i>nirA</i>
GFFKBBAP_01310	PLGCOHOI_01906, PLGCOHOI_03766	-	nitrite reductase (NADH) large subunit [EC:1.7.1.15]	K00362	<i>nirB</i>
GFFKBBAP_01309	PLGCOHOI_01905,	-	nitrite reductase (NADH) small subunit [EC:1.7.1.15]	K00363	<i>nirD</i>
-	PLGCOHOI_01323	-	glutamate dehydrogenase (NADP+) [EC:1.4.1.4]	K00262	<i>gdhA</i>
GFFKBBAP_03260	PLGCOHOI_00446	IMMNMPHA_01233	glutamine synthetase [EC:6.3.1.2]	K01915	<i>glnA</i> , <i>gluL</i>
GFFKBBAP_02453, GFFKBBAP_03769	PLGCOHOI_04221, PLGCOHOI_05984	-	nitrogen fixation protein NifU and related proteins	K04488	<i>iscU</i> , <i>nifU</i>
GFFKBBAP_02453	PLGCOHOI_01225		flavodoxin I	K03839	<i>fldA</i> , <i>nifF</i> , <i>isiB</i>
GFFKBBAP_03886	PLGCOHOI_02114, PLGCOHOI_04446	-	ammonium transporter, Amt family	K03320	<i>amt</i>
GFFKBBAP_01293	-	IMMNMPHA_02645	nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]	K00370	<i>narG</i> , <i>narZ</i> , <i>nxrA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_01294	-	IMMNMPHA_02646	nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, beta subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]	K00371	<i>narH, narY, nxrB</i>
GFFKBBAP_01296	-	-	nitrate reductase gamma subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]	K00374	<i>narI, narV;</i>
GFFKBBAP_01295	-	-	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone NarJ/NarW	K00373	<i>narJ, narW</i>
-	PLGCOHOI_02423	-	two-component system, NarL family, nitrate/nitrite sensor [EC:2.7.13.3] histidine kinase NarQ	K07674	<i>narQ</i>
-	PLGCOHOI_04652	IMMNMPHA_01819	Rrf2 family transcriptional regulator, nitric oxide-sensitive transcriptional repressor	K13771	<i>nsrR</i>
GFFKBBAP_03260	-	-	hydroxylamine reductase [EC:1.7.99.1]	K05601	<i>hcp</i>
GFFKBBAP_03664	-	-	cyanate lyase [EC:4.2.1.104]	K01725	<i>cynS</i>
GFFKBBAP_04634	-	-	carbamate kinase [EC:2.7.2.2]	K00926	<i>arc</i>
GFFKBBAP_00231	-	IMMNMPHA_01806	formamidase [E3.5.1.49]	K01455	<i>amiF</i>
GFFKBBAP_04426	-	-	nitric oxide reductase activation protein NorD	K02448	<i>norD</i>
GFFKBBAP_04427	-	-	nitric oxide reductase activation protein NorQ	K04748	<i>norQ</i>
GFFKBBAP_04189	PLGCOHOI_04654	IMMNMPHA_04039	nitric-oxide synthase, bacterial [EC:1.14.14.47]	K00491	<i>nos</i>

[Continua]

[Continuação]

Organic acids production					
GFFKBBAP_01414; GFFKBBAP_03210	PLGCOHOI_01728; PLGCOHOI_02432; PLGCOHOI_03996; PLGCOHOI_03792	IMMNMPHA_04414, IMMNMPHA_00727	6-phosphogluconate dehydrogenase [EC:1.1.1.44, 1.1.1.343]	K00033	<i>gndA</i> , <i>gntZ</i>
-	PLGCOHOI_01369; PLGCOHOI_02027	IMMNMPHA_02214	2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5- dehydrogenase [EC:1.1.1.127]	K00065	<i>kduD</i>
GFFKBBAP_01149, GFFKBBAP_01413	PLGCOHOI_01554, PLGCOHOI_01910, PLGCOHOI_03789	-	gluconate:H ⁺ symporter, GntP family	K03299	<i>gntP</i>
-	PLGCOHOI_02029	IMMNMPHA_00730	GntR family transcriptional regulator, gluconate operon transcriptional repressor	K11476	<i>gntR</i>
GFFKBBAP_01179, GFFKBBAP_02929, GFFKBBAP_03753	PLGCOHOI_04922;	-	L-lactate dehydrogenase [EC:1.1.1.27]	K00016	<i>ldh</i>
GFFKBBAP_02321	PLGCOHOI_02069	IMMNMPHA_03587	lactate permease	K03303	<i>lctP</i>
GFFKBBAP_00416; GFFKBBAP_02790; GFFKBBAP_04669	PLGCOHOI_01796; PLGCOHOI_03303	IMMNMPHA_01848	Na ⁺ :H ⁺ antiporter, NhaC family	K03315	<i>nhaC</i>
-	PLGCOHOI_01123	-	L-lactate dehydrogenase operon regulator	K14348	<i>lldR</i>
GFFKBBAP_02384	PLGCOHOI_01820	-	L-lactate dehydrogenase complex protein LldG	K00782	<i>lldG</i>
GFFKBBAP_02383	PLGCOHOI_01821	-	L-lactate dehydrogenase complex protein LldF	K18929	<i>lldF</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_02382	PLGCOHOI_01822	-	L-lactate dehydrogenase complex protein LldE	K18928	<i>lldE</i>
GFFKBBAP_04179	PLGCOHOI_02144	-	PqqA peptide cyclase [EC:1.21.98.4]	K06139	<i>pqqE</i>
-	PLGCOHOI_03117, PLGCOHOI_03123	-	PqqD family protein		<i>pqqD</i>
GFFKBBAP_03849	-	IMMNMPHA_01691	glyoxylate/hydroxypyruvate/2-ketogluconate reductase [EC:1.1.1.79, 1.1.1.81, 1.1.1.215]	K00090	<i>ghrB</i>
GFFKBBAP_04006	-	IMMNMPHA_01527	oxalate decarboxylase [EC:4.1.1.2]	K01569	<i>oxdD</i>
GFFKBBAP_01479	-	-	methylisocitrate lyase [EC 4.1.3.30]	K03417	<i>prpB</i>
GFFKBBAP_01478	-	-	2-methylcitrate dehydratase [EC 4.2.1.79]	K01720	<i>prpD</i>
GFFKBBAP_03459	PLGCOHOI_04518	IMMNMPHA_01450	aconitate hydratase [EC 4.2.1.3]	K01681	<i>acnA,</i> <i>citB</i>
GFFKBBAP_01477	PLGCOHOI_01116, PLGCOHOI_02243	IMMNMPHA_01501, IMMNMPHA_01825	citrate synthase [EC:2.3.3.1]	K01647	<i>gltA,</i> <i>citA,</i> <i>citZ</i>
		-			
Phytohormone production genes					
GFFKBBAP_02319	PLGCOHOI_00666	IMMNMPHA_02262	tryptophan synthase alpha chain [EC:4.2.1.20]	K01695	<i>trpA</i>
GFFKBBAP_02318	PLGCOHOI_00667	IMMNMPHA_02263	tryptophan synthase beta chain [EC:4.2.1.20]	K01696	<i>trpB</i>
GFFKBBAP_02316	PLGCOHOI_00669	IMMNMPHA_02265	indole-3-glycerol phosphate synthase [EC:4.1.1.48]	K01609	<i>trpC</i>
GFFKBBAP_02315	PLGCOHOI_00670	IMMNMPHA_02266	anthranilate phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.18]	K00766	<i>trpD</i>

[continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_02313	PLGCOHOI_00671	IMMNMPHA_02267	anthranilate synthase component I [EC:4.1.3.27]	K01657	<i>trpE</i>
GFFKBBAP_02317	PLGCOHOI_00668	IMMNMPHA_02264	phosphoribosylanthranilate isomerase [EC:5.3.1.24]	K01817	<i>trpF</i>
GFFKBBAP_02314	PLGCOHOI_05910	-	anthranilate synthase component II [EC:4.1.3.27]	K01658	<i>trpG</i>
GFFKBBAP_01430, GFFKBBAP_03399, GFFKBBAP_02018	PLGCOHOI_03054	-	aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]	K00128	<i>aldH</i>
GFFKBBAP_01200, GFFKBBAP_01772, GFFKBBAP_02927, GFFKBBAP_05331, GFFKBBAP_02364	PLGCOHOI_03511, PLGCOHOI_04722	IMMNMPHA_02493	amidase [EC:3.5.1.4]	K01426	<i>amiE</i>
-	PLGCOHOI_03193	-	IAA acetyltransferase [EC:2.3.1.-]	K03829	<i>yedL</i>
GFFKBBAP_01915	-	-	Aromatic-L-amino-acid/L-tryptophan decarboxylase [EC:4.1.1.28]	K01593	<i>ddc, tdc</i>
GFFKBBAP_05108	-	-	L-amino-acid oxidase YobN [EC:1.4.3.2]	K03334	<i>yobN</i>
GFFKBBAP_02930, GFFKBBAP_05108	-	-	monoamine oxidase [EC:1.4.3.4]	K00274	<i>aofH</i>
GFFKBBAP_01620	-	-	indolepyruvate decarboxylase [EC:4.1.1.74]	K04103	<i>ipdC</i>
GFFKBBAP_03086	-	-	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase [EC:3.5.99.7]	K01505	<i>acdS</i>

Siderophores and iron acquisition

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00025, GFFKBBAP_04252, GFFKBBAP_04421	PLGCOHOI_01536, PLGCOHOI_02130, PLGCOHOI_02369, PLGCOHOI_03174, PLGCOHOI_04201	-	iron complex transport system ATP-binding protein [EC:7.2.2.-]	K02013	-
GFFKBBAP_00026, GFFKBBAP_00027, GFFKBBAP_00842, GFFKBBAP_03289, GFFKBBAP_03290, GFFKBBAP_04250, GFFKBBAP_04251, GFFKBBAP_04419, GFFKBBAP_04420, GFFKBBAP_04659, GFFKBBAP_04660	PLGCOHOI_01538, PLGCOHOI_01539, PLGCOHOI_02131, PLGCOHOI_02370, PLGCOHOI_03669, PLGCOHOI_03670, PLGCOHOI_04199, PLGCOHOI_04200	-	iron complex transport system permease protein	K02015	-
GFFKBBAP_00028, GFFKBBAP_00661, GFFKBBAP_00713, GFFKBBAP_00843, GFFKBBAP_01397, GFFKBBAP_03288, GFFKBBAP_04253, GFFKBBAP_04418, GFFKBBAP_04658	PLGCOHOI_02834, PLGCOHOI_03359, PLGCOHOI_04198, PLGCOHOI_05382	-	iron complex transport system substrate-binding protein	K02016	-

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_03770	-	-	Fe-S cluster assembly protein SufB	K09014	<i>sufB</i>
GFFKBBAP_03767	PLGCOHOI_04219	-	Fe-S cluster assembly protein SufD	K09015	<i>sufD</i>
GFFKBBAP_01163	PLGCOHOI_01236	-	menaquinone-specific isochorismate synthase [EC:5.4.4.2]	K02552	<i>menF</i>
GFFKBBAP_00825	PLGCOHOI_01538	-	ferric hydroxamate transport system permease protein	K23228	<i>fhuB</i>
-	PLGCOHOI_01536	-	ferric hydroxamate transport system ATP-binding protein [EC:7.2.2.16]	K10829	<i>fhuC</i>
GFFKBBAP_00824	PLGCOHOI_01537	IMMNMPHA_02819	ferric hydroxamate transport system substrate-binding protein	K23227	<i>fhuD</i>
GFFKBBAP_01494, GFFKBBAP_05696	-	IMMNMPHA_01156	isochorismate synthase [EC:5.4.4.2]	K02361	<i>entC</i> , <i>dhbC</i>
GFFKBBAP_01496	-	IMMNMPHA_01154, IMMNMPHA_04063	bifunctional isochorismate lyase / aryl carrier protein [EC:3.3.2.1 6.3.2.14]	K01252	<i>entB</i> , <i>dhbB</i> , <i>vibB</i> , <i>mxoF</i>
GFFKBBAP_01493	-	IMMNMPHA_01157	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase [EC:1.3.1.28]	K00216	<i>entA</i> , <i>dhbA</i>
GFFKBBAP_01495	-	IMMNMPHA_01155,	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [EC:6.3.2.14, 2.7.7.58]	K02363	<i>entE</i> , <i>dhbE</i> , <i>vibE</i> , <i>mxoE</i>
GFFKBBAP_02164	-	-	Enterobactin exporter EntS		<i>entS</i>
GFFKBBAP_00841	-	-	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC		<i>fepC</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_02401, GFFKBBAP_02763, GFFKBBAP_05028	-	-	iron (III) transport system substrate-binding protein	K02012	<i>afuA</i> , <i>fbpA</i>
GFFKBBAP_02403, GFFKBBAP_02764	-	-	iron (III) transport system permease protein	K02011	<i>afuB</i> , <i>fbpB</i>
GFFKBBAP_02402, GFFKBBAP_02762	-	-	iron (III) transport system ATP-binding protein [EC:7.2.2.7]	K02010	<i>afuC</i> , <i>fbpC</i>
GFFKBBAP_01497	-	IMMNMPHA_01153	nonribosomal peptide synthetase DhbF	K04780	<i>dhbF</i>
GFFKBBAP_01881	-	-	enterochelin esterase and related enzymes	K07214	<i>fes</i>
GFFKBBAP_05143	PLGCOHOI_00409	-	rhizobactin siderophore biosynthesis protein RhbF		<i>rhbF</i>
GFFKBBAP_05144	PLGCOHOI_00413	-	rhizobactin siderophore biosynthesis protein RhbC		<i>rhbC</i>
-	PLGCOHOI_00411, PLGCOHOI_04650	-	rhizobactin siderophore biosynthesis protein RhbE	K03897	<i>rhbE</i>
-	PLGCOHOI_00412	-	rhizobactin siderophore biosynthesis protein RhbD		<i>rhbD</i>
GFFKBBAP_00024	-	IMMNMPHA_01158	Ferri-bacillibactin esterase BesA	K07017	<i>besA</i>
GFFKBBAP_05137	PLGCOHOI_01595, PLGCOHOI_00871	IMMNMPHA_01280	bacillibactin exporter	K08161	<i>ymfD</i>
GFFKBBAP_05142	-	IMMNMPHA_01904	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase associated with anthrachelin biosynthesis [EC:6.2.1.-]	K00666	<i>lcfA</i> , <i>lcfB</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_05140	PLGCOHOI_03197	-	Petrobactin biosynthesis protein AsbE	K24112	<i>asbE</i>
GFFKBBAP_00660	-	-	Petrobactin import system permease protein FpuB		<i>fpuB</i>
GFFKBBAP_00659	-	-	Petrobactin import ATP-binding protein FpuC		<i>fpuC</i>
GFFKBBAP_01531	PLGCOHOI_01364	-	Apo-petrobactin exporter		<i>apeX</i>
GFFKBBAP_03658	PLGCOHOI_02368	IMMNMPHA_02038	Petrobactin-binding protein YclQ		<i>yclQ</i>
GFFKBBAP_03659	PLGCOHOI_02371	-	Petrobactin import system permease protein FatD		<i>fatD</i>
GFFKBBAP_03661	PLGCOHOI_02369	-	Petrobactin import ATP-binding protein FatE		<i>fatE</i>
GFFKBBAP_03660	PLGCOHOI_02370	-	Petrobactin import system permease protein FatC		<i>fatC</i>
-	PLGCOHOI_04187	IMMNMPHA_03051	high-affinity iron transporter	K07243	<i>efeU</i>
-	PLGCOHOI_00415	IMMNMPHA_01847	diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase [EC:2.6.1.76]	K00836	<i>ectB, dat</i>
-	PLGCOHOI_00414	-	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase [EC:4.1.1.86]	K13745	<i>ddc</i>
-	PLGCOHOI_03671	-	ferric citrate transport system substrate-binding protein	K23181	<i>fecB</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_03959	-	two-component response regulator colocalized with HrtAB transporter	K02483	-
Exopolysaccharides production and biofilm formation					
GFFKBBAP_00003, GFFKBBAP_02701, GFFKBBAP_04768	-	IMMNMPHA_01245	host factor-I protein	K03666	<i>hfq</i>
GFFKBBAP_03571	PLGCOHOI_04050, PLGCOHOI_05315	-	UDP-N-acetylglucosamine 2- epimerase (non-hydrolysing) [EC:5.1.3.14]	K01791	<i>wecB</i>
-	PLGCOHOI_04079	-	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase [EC:1.1.1.336]	K02472	<i>wecC</i>
GFFKBBAP_05049	PLGCOHOI_01931	-	polysaccharide biosynthesis protein EpsC	K19421	<i>epsC</i>
GFFKBBAP_04557	PLGCOHOI_03146	IMMNMPHA_01724	glycosyltransferase EpsD	K19422	<i>epsD</i>
-	PLGCOHOI_03134	IMMNMPHA_01726	glycosyltransferase EpsF	K19424	<i>epsF</i>
-	PLGCOHOI_03143	IMMNMPHA_01727	transmembrane protein EpsG	K19419	<i>epsG</i>
-	PLGCOHOI_01924	IMMNMPHA_01728	glycosyltransferase EpsH	K19425	<i>epsH</i>
-	PLGCOHOI_03140, PLGCOHOI_01927	IMMNMPHA_01732	sugar transferase EpsL	K19428	<i>epsL</i>
-	PLGCOHOI_03139	IMMNMPHA_01733	acetyltransferase EpsM	K19429	<i>epsM</i>
-	PLGCOHOI_03138	IMMNMPHA_01734	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase EpsN	K19430	<i>epsN</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_03167, GFFKBBAP_04592, GFFKBBAP_05051	PLGCOHOI_01916, PLGCOHOI_01917, PLGCOHOI_01918,	-	protein-tyrosine phosphatase [EC:3.1.3.48]	K01104	<i>epsP</i>
-	PLGCOHOI_02179	IMMNMPHA_01992	poly-gamma-glutamate hydrolase family protein		<i>pgdS</i>
-	PLGCOHOI_03548	-	poly-gamma-glutamate synthase PgsB	K01932	<i>pgsB</i>
-	PLGCOHOI_03547	-	poly-gamma-glutamate biosynthesis protein PgsC	K22116	<i>pgsC</i>
-	PLGCOHOI_00170, PLGCOHOI_05469		gamma-DL-glutamyl hydrolase		
GFFKBBAP_05375	PLGCOHOI_05595	IMMNMPHA_02727	serine O-acetyltransferase [EC:2.3.1.30]	K00640	<i>cysE</i>
GFFKBBAP_02056, GFFKBBAP_04214	PLGCOHOI_04080	IMMNMPHA_03889	N- acetylglucosaminyldiphosphoundecapr enol N-acetyl-beta-D- mannosaminyltransferase [EC:2.4.1.187]	K05946	<i>tagA</i> , <i>tarA</i>
GFFKBBAP_04308	-	IMMNMPHA_02222	PTS system, sugar-specific IIA component [EC:2.7.1.-]	K02777	<i>crr</i> , <i>ptsN</i>
GFFKBBAP_03640	-	IMMNMPHA_01737	RNA polymerase sigma-54 factor	K03092	<i>rpoN</i>
GFFKBBAP_01102	-	IMMNMPHA_01589	S-ribosylhomocysteine lyase [EC:4.4.1.21]	K07173	<i>luxS</i>
GFFKBBAP_02526	-	-	CRP/FNR family transcriptional regulator, cyclic AMP receptor protein	K10914	<i>crp</i>
GFFKBBAP_02157	-	-	lsr operon transcriptional repressor	K11531	<i>lsrR</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_01174, GFFKBBAP_01175	-	IMMNMPHA_01560	glucose-1-phosphate adenylyltransferase [EC:2.7.7.27]	K00975	<i>glgC</i>
GFFKBBAP_01172	-	IMMNMPHA_01929	glycogen [EC:2.4.1.1]	K00688	<i>glgP</i>
GFFKBBAP_01173	-	IMMNMPHA_01562	starch synthase [EC:2.4.1.21]	K00703	<i>glgA</i>

Volatile organic compounds and volatile inorganic compounds production

GFFKBBAP_02475, GFFKBBAP_02858	PLGCOHOI_01045,	IMMNMPHA_00344	acetolactate synthase I/III small subunit [EC:2.2.1.6]	K01653	<i>ilvH, ilvN</i>
GFFKBBAP_02474, GFFKBBAP_02857, GFFKBBAP_04991	PLGCOHOI_01046, PLGCOHOI_01339, PLGCOHOI_03593, PLGCOHOI_03754, PLGCOHOI_05638	IMMNMPHA_00343	acetolactate synthase I/II/III large subunit [EC:2.2.1.6]	K01652	<i>ilvB, ilvG, ilvI</i>
GFFKBBAP_04992	PLGCOHOI_03755	IMMNMPHA_01978	acetolactate decarboxylase [EC:4.1.1.5]	K01575	<i>alsD, budA, aldC</i>
GFFKBBAP_04476	PLGCOHOI_03430	-	(R,R)-butanediol dehydrogenase / meso-butanediol dehydrogenase / diacetyl reductase [EC:1.1.1.4, 1.1.1.-, 1.1.1.303]	K00004	<i>butB, bdh</i>
GFFKBBAP_01964	PLGCOHOI_03435	IMMNMPHA_03781	acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase subunit alpha [EC:1.1.1.-]	K21416	<i>acoA</i>
GFFKBBAP_01963	PLGCOHOI_03434	IMMNMPHA_03780	acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase subunit beta [EC:1.1.1.-]	K21417	<i>acoB</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_03433	-	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of acetoin cleaving system	K00627	<i>acoC</i>
GFFKBBAP_00971	PLGCOHOI_01158	IMMNMPHA_00108	acetoin utilization protein AcuA [EC:2.3.1.-]	K04766	<i>acuA</i>
GFFKBBAP_00972	PLGCOHOI_01159		acetoin utilization protein AcuB	K04767	<i>acuB</i>
GFFKBBAP_00973	PLGCOHOI_01160	IMMNMPHA_00106	acetoin utilization protein AcuC	K04768	<i>acuC</i>
GFFKBBAP_01951	PLGCOHOI_03431	IMMNMPHA_03777	sigma-54 dependent transcriptional regulator, acetoin dehydrogenase operon transcriptional activator AcoR	K21405	<i>acoR</i>
GFFKBBAP_02022	-	-	hydrogen cyanide synthase HcnC [EC:1.4.99.5]	K10816	<i>hcnC</i>
GFFKBBAP_02025	-	-	hydrogen cyanide synthase HcnA [EC:1.4.99.5]	K10814	<i>hcnA</i>
GFFKBBAP_02026	-	-	hydrogen cyanide synthase HcnB [EC:1.4.99.5]	K10815	<i>hcnB</i>
Motility and chemotaxis					
GFFKBBAP_02732	PLGCOHOI_01749	-	two-component system, chemotaxis family, chemotaxis protein CheV	K03415	<i>cheV</i>
GFFKBBAP_02706, GFFKBBAP_04034	PLGCOHOI_00517, PLGCOHOI_01520	IMMNMPHA_01320	two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA [EC:2.7.13.3]	K03407	<i>cheA</i>
GFFKBBAP_02705	PLGCOHOI_00527	IMMNMPHA_01330	two-component system, chemotaxis family, chemotaxis protein CheY	K03413	<i>cheY</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_00515	IMMNMPHA_01317	chemotaxis protein CheD [EC:3.5.1.44]	K03411	<i>cheD</i>
-	PLGCOHOI_00516	IMMNMPHA_01319	purine-binding chemotaxis protein CheW	K03408	<i>cheW</i>
-	PLGCOHOI_00518	IMMNMPHA_01321	two-component system, chemotaxis family, protein-glutamate methylesterase/glutaminase [EC:3.1.1.61, 3.5.1.44]	K03412	<i>cheB</i>
-	PLGCOHOI_03029		two-component system, chemotaxis family, CheB/CheR fusion protein [EC:2.1.1.80, 3.1.1.61]	K13924	<i>cheBR</i>
GFFKBBAP_02716	PLGCOHOI_04107	IMMNMPHA_03846	flagellar hook-associated protein 2	K02407	<i>fliD</i>
GFFKBBAP_02734, GFFKBBAP_02735	PLGCOHOI_01945, PLGCOHOI_01946, PLGCOHOI_02860		Flagellin	K02406	<i>fliC</i>
GFFKBBAP_04555	-	-	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	K05790	<i>wzzE</i>
GFFKBBAP_02715	PLGCOHOI_04098	-	flagellar hook-associated protein 3 FlgL	K02397	<i>flgL</i>
GFFKBBAP_02714	PLGCOHOI_04097	-	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	K02396	<i>flgK</i>
GFFKBBAP_02729	PLGCOHOI_00532	-	flagellar hook protein FlgE	K02390	<i>flgE</i>
GFFKBBAP_02728	PLGCOHOI_00533	-	flagellar basal-body rod modification protein FlgD	K02389	<i>flgD</i>
GFFKBBAP_02747	PLGCOHOI_04069, PLGCOHOI_04070	IMMNMPHA_00075	flagellar basal-body rod protein FlgG	K02392	<i>flgG</i>
GFFKBBAP_02721	PLGCOHOI_00541	IMMNMPHA_01343	flagellar hook-basal body complex protein FliE	K02408	<i>fliE</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_02719	PLGCOHOI_00543	IMMNMPHA_01345	flagellar basal-body rod protein FlgB	K02387	<i>flgB</i>
GFFKBBAP_02720	PLGCOHOI_00542	-	flagellar basal-body rod protein FlgC	K02388	<i>flgC</i>
GFFKBBAP_02722	PLGCOHOI_00540	-	flagellar M-ring protein FliF	K02409	<i>fliF</i>
GFFKBBAP_02738	PLGCOHOI_00529	IMMNMPHA_01332	flagellar motor switch protein FliM	K02416	<i>fliM</i>
GFFKBBAP_02723	PLGCOHOI_00539	IMMNMPHA_01341	flagellar motor switch protein FliG	K02410	<i>fliG</i>
GFFKBBAP_02707, GFFKBBAP_02739	PLGCOHOI_00528	-	flagellar motor switch protein FliN/FliY	K02417	<i>fliNY</i> , <i>fliN</i>
GFFKBBAP_02745	PLGCOHOI_00521	-	flagellar biosynthesis protein FlhA	K02400	<i>flhA</i>
GFFKBBAP_02744	PLGCOHOI_00522	-	flagellar biosynthetic protein FlhB	K02401	<i>flhB</i>
-	PLGCOHOI_00538	-	flagellar assembly protein FliH	K02411	<i>fliH</i>
GFFKBBAP_02725	PLGCOHOI_00537	-	flagellum-specific ATP synthase [EC:7.4.2.8]	K02412	<i>fliI</i>
-	PLGCOHOI_00526	-	flagellar protein FliO/FliZ	K02418	<i>fliOZ</i> , <i>fliO</i>
GFFKBBAP_02742	PLGCOHOI_00524	IMMNMPHA_01327	flagellar biosynthetic protein FliQ	K02420	<i>fliQ</i>
GFFKBBAP_02741	PLGCOHOI_00525	IMMNMPHA_01328	flagellar biosynthetic protein FliP	K02419	<i>fliP</i>
GFFKBBAP_02743	PLGCOHOI_00523	IMMNMPHA_01326	flagellar biosynthetic protein FliR	K02421	<i>fliR</i>
-	PLGCOHOI_00536	IMMNMPHA_01338	flagellar FliJ protein	K02413	<i>fliJ</i>
-	PLGCOHOI_04095	-	negative regulator of flagellin synthesis FlgM	K02398	<i>flgM</i>
GFFKBBAP_02717	PLGCOHOI_04089, PLGCOHOI_04108	IMMNMPHA_03845	flagellar protein FliS	K02422	<i>fliS</i>
-	PLGCOHOI_04099	IMMNMPHA_03850	flagellar assembly factor FliW	K13626	<i>fliW</i>
GFFKBBAP_04210	PLGCOHOI_00245	IMMNMPHA_01915	hem-based aerotactic transducer	K06595	<i>hemAT</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_00514	-	RNA polymerase sigma factor for flagellar operon FliA	K02405	<i>fliA</i>
GFFKBBAP_00809, GFFKBBAP_02703	PLGCOHOI_01162, PLGCOHOI_03309	-	chemotaxis protein MotA	K02556	<i>motA</i>
GFFKBBAP_00808, GFFKBBAP_02704	PLGCOHOI_01161, PLGCOHOI_03308	-	chemotaxis protein MotB	K02557	<i>motB</i>
GFFKBBAP_04470	PLGCOHOI_03619	IMMNMPHA_01982	ribose transport system substrate-binding protein	K10439	<i>rbsB</i>
-	PLGCOHOI_00530	-	flagellar FliL protein	K02415	<i>fliL</i>
-	PLGCOHOI_00531	-	flagellar protein FliD	K02385	<i>fliD</i>
-	PLGCOHOI_00520	IMMNMPHA_01323	flagellar biosynthesis protein FliH	K02404	<i>fliH</i>
GFFKBBAP_04980	PLGCOHOI_04944	IMMNMPHA_02063	L-cystine transport system substrate-binding protein	K02424	<i>fliY</i> , <i>tcyA</i>
-	PLGCOHOI_00519		flagellar biosynthesis protein FliG	K04562	<i>fliG</i> , <i>fliN</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_03053, GFFKBBAP_03353, GFFKBBAP_03680, GFFKBBAP_03712, GFFKBBAP_03713, GFFKBBAP_03738, GFFKBBAP_03917, GFFKBBAP_04360, GFFKBBAP_04378, GFFKBBAP_04486, GFFKBBAP_04622, GFFKBBAP_04639, GFFKBBAP_05117	PLGCOHOI_02808, PLGCOHOI_04924, PLGCOHOI_05711	IMMNMPHA_00612	methyl-accepting chemotaxis protein	K03406	<i>mcp</i>
GFFKBBAP_04681	-	-	pilus assembly protein CpaF [EC:7.4.2.8]	K02283	<i>cpaF</i> , <i>tadA</i>
GFFKBBAP_04679	-	-	pilus assembly protein CpaB	K02279	<i>cpaB</i> , <i>rcpC</i>
GFFKBBAP_00081	-	IMMNMPHA_01113	basic membrane protein A and related proteins	K07335	<i>bmpA</i> , <i>bmpB</i> , <i>tmpC</i>
Oxidative stress					
GFFKBBAP_03845	PLGCOHOI_03213, PLGCOHOI_04263	-	superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]	K04565	<i>sod</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00570, GFFKBBAP_02543, GFFKBBAP_04188	PLGCOHOI_00863, PLGCOHOI_04348	-	superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]	K04564	<i>sod</i>
GFFKBBAP_02196, GFFKBBAP_03887, GFFKBBAP_04973	PLGCOHOI_00287, PLGCOHOI_02205, PLGCOHOI_03966	IMMNMPHA_00824	catalase [EC:1.11.1.6]	K03781	<i>katE</i> , <i>catB</i> , <i>srpA</i>
GFFKBBAP_02990	-	IMMNMPHA_00956	Mn-containing catalase	K07217	<i>ydbD</i>
GFFKBBAP_03702, GFFKBBAP_05113	PLGCOHOI_01217, PLGCOHOI_02182	IMMNMPHA_01592	starvation-inducible DNA-binding protein	K04047	<i>dps</i>
GFFKBBAP_05679	PLGCOHOI_06208	IMMNMPHA_04307	redox-sensing transcriptional repressor	K01926	<i>rex</i>
GFFKBBAP_00386	PLGCOHOI_00745	IMMNMPHA_03364, IMMNMPHA_03016,	Fur family transcriptional regulator, ferric uptake regulator	K03711	<i>fur</i> , <i>zur</i> , <i>furB</i>
GFFKBBAP_00575	PLGCOHOI_00876	-	Fur family transcriptional regulator, zinc uptake regulator	K02076	<i>zurR</i> , <i>zur</i>
GFFKBBAP_04665	-	IMMNMPHA_00726	peroxiredoxin (alkyl hydroperoxide reductase subunit C) [EC:1.11.1.15]	K03386	<i>ahpC</i>
GFFKBBAP_04666	-	IMMNMPHA_00725	alkyl hydroperoxide reductase subunit F [EC:1.6.4.-]	K03387	<i>ahpF</i>
GFFKBBAP_04525	PLGCOHOI_04600	IMMNMPHA_04365	Fur family transcriptional regulator, peroxide stress response regulator	K09825	<i>perR</i>
GFFKBBAP_00757	PLGCOHOI_03039, PLGCOHOI_04690	-	lipoyl-dependent peroxidase	K04063	<i>osmC</i> , <i>ohr</i>
-	PLGCOHOI_02438, PLGCOHOI_02534, PLGCOHOI_04282	IMMNMPHA_03060	lactoylglutathione lyase [EC:4.4.1.5]	K01759	<i>gloA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00556, GFFKBBAP_03336	PLGCOHOI_00846	IMMNMPHA_00588	hydroxyacylglutathione hydrolase [EC:3.1.2.6]	K01069	<i>gloB</i> , <i>gloC</i>
GFFKBBAP_03757	PLGCOHOI_04209	IMMNMPHA_02178	arsenate reductase (glutaredoxin) [EC:1.20.4.1]	K00537	<i>arsC1</i> , <i>arsC</i>
GFFKBBAP_03034	PLGCOHOI_03401, PLGCOHOI_05137, PLGCOHOI_05164, PLGCOHOI_05714, PLGCOHOI_01247, PLGCOHOI_01248	IMMNMPHA_02175, IMMNMPHA_02519	ArsR family transcriptional regulator, arsenate/arsenite/antimonite- responsive transcriptional repressor	K03892	<i>arsR</i>
GFFKBBAP_04398	PLGCOHOI_02320	-	ArsR family transcriptional regulator, lead/cadmium/zinc/bismuth-responsive transcriptional repressor	K21903	<i>cadC</i> , <i>smtB</i>
GFFKBBAP_02781	PLGCOHOI_04638	-	cobalt-zinc-cadmium efflux system protein	K16264	<i>czcD</i> , <i>zitB</i>
GFFKBBAP_03031	PLGCOHOI_01250, PLGCOHOI_01298	IMMNMPHA_03240, IMMNMPHA_02178	arsenate reductase (thioredoxin) [EC:1.20.4.4]	K03741	<i>arsC2</i> , <i>arsC</i>
GFFKBBAP_02431	PLGCOHOI_00826, PLGCOHOI_00828, PLGCOHOI_01230	-	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain [EC:1.17.4.1]	K00525	<i>nrdA</i> , <i>nrdE</i>
GFFKBBAP_03933	PLGCOHOI_03223	-	sulfate/thiosulfate transport system ATP-binding protein [EC:7.3.2.3]	K02045	<i>cysA</i>
GFFKBBAP_02608	PLGCOHOI_01678	IMMNMPHA_02247	methylglyoxal synthase [EC:4.2.3.3]	K01734	<i>mgsA</i>
GFFKBBAP_00020	PLGCOHOI_03410	IMMNMPHA_02800, IMMNMPHA_01069	P-type Cu ⁺ transporter [EC:7.2.2.8]	K17686	<i>copA</i> , <i>ctpA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00021	PLGCOHOI_03411	IMMNMPHA_02799	copper resistance protein CopZ	K07213	<i>copZ</i>
GFFKBBAP_00022	PLGCOHOI_03412, PLGCOHOI_00230	IMMNMPHA_00585	copper-sensing transcriptional repressor CsoR	K21600	<i>csoR</i>
GFFKBBAP_01850	-	-	HTH-type transcriptional regulator HmrR		<i>hmrR</i>
GFFKBBAP_02255	PLGCOHOI_03781, PLGCOHOI_00416	-	copper homeostasis protein CutC	K06201	<i>cutC</i>
-	PLGCOHOI_02177	-	copper resistance protein C	K07156	<i>copC</i> , <i>pcoC</i>
-	PLGCOHOI_02176	-	copper resistance protein D	K07245	<i>pcoD</i>
GFFKBBAP_02919	PLGCOHOI_06130	IMMNMPHA_02026	copper transport protein	K14166	<i>ycnJ</i>
GFFKBBAP_01087, GFFKBBAP_02908	PLGCOHOI_02117	-	copper oxidase/copper amine oxidase		<i>aco</i>
-	PLGCOHOI_04652	IMMNMPHA_01819	Rrf2 family transcriptional regulator, nitric oxide-sensitive transcriptional repressor	K13771	<i>nsrR</i>
GFFKBBAP_01289	PLGCOHOI_03368	-	glutathione peroxidase [EC:1.11.1.9]	K00432	<i>gpx</i>
Drought stress					
GFFKBBAP_04003	PLGCOHOI_04931	IMMNMPHA_01809	glycerol uptake facilitator protein	K02440	<i>glpF</i>
-	PLGCOHOI_02552	-	tyrosinase [EC:1.14.18.1]	K00505	<i>tyr</i>
-	PLGCOHOI_03054, PLGCOHOI_03680, PLGCOHOI_04103	IMMNMPHA_02745	betaine-aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.8]	K00130	<i>betB</i> , <i>gbsA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_04356, GFFKBBAP_05007	PLGCOHOI_01712, PLGCOHOI_01713	IMMNMPHA_03730	glycine betaine transporter	K05020	<i>opuD</i> , <i>betL</i>
GFFKBBAP_01976	PLGCOHOI_01523, PLGCOHOI_03683	-	glycine betaine/proline transport system ATP-binding protein [EC:7.6.2.9]	K02000	<i>proV</i>
GFFKBBAP_01421	PLGCOHOI_00277	IMMNMPHA_03578	osmoprotectant transport system ATP-binding protein [EC:7.6.2.9]	K05847	<i>opuA</i>
GFFKBBAP_01975	PLGCOHOI_01522, PLGCOHOI_03684	-	glycine betaine/proline transport system permease protein	K02001	<i>proW</i>
GFFKBBAP_01977	PLGCOHOI_01521, PLGCOHOI_03682	-	glycine betaine/proline transport system substrate-binding protein	K02002	<i>proX</i>
GFFKBBAP_01422	PLGCOHOI_00276	IMMNMPHA_02778	osmoprotectant transport system permease protein	K05846	<i>opuBD</i>
GFFKBBAP_01422	PLGCOHOI_00276	-	osmoprotectant transport system substrate-binding protein	K05845	<i>opuC</i>
-	PLGCOHOI_04102	IMMNMPHA_02744	choline dehydrogenase [EC:1.1.1.1]	K11440	<i>gbsB</i>
GFFKBBAP_02026	PLGCOHOI_01525	-	sarcosine oxidase [EC:1.5.3.1]	K00301	<i>sox</i>
GFFKBBAP_04434	PLGCOHOI_03589		trehalose-6-phosphate hydrolase [EC:3.2.1.93]	K01226	<i>treC</i>
GFFKBBAP_04432, GFFKBBAP_04433	PLGCOHOI_03588	IMMNMPHA_04026	GntR family transcriptional regulator, trehalose operon transcriptional repressor	K03486	<i>treR2</i> , <i>treR</i>
GFFKBBAP_04433	PLGCOHOI_03590	-	PTS system, trehalose-specific IIB component [EC:2.7.1.201]	K02818	<i>treB</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_01524	-	glycine betaine catabolism A	K00479	<i>gbcA</i>
GFFKBBAP_00803	-	-	aquaporin Z	K06188	<i>aqpZ</i>
GFFKBBAP_02866	-	-	4,5-DOPA dioxygenase extradiol [EC:1.13.11.-]	K15777	<i>dodA</i>
Stress response					
GFFKBBAP_04038	PLGCOHOI_05895	IMMNMPHA_02163	RNA polymerase sigma-B factor	K03090	<i>sigB</i>
GFFKBBAP_04039	PLGCOHOI_05894	IMMNMPHA_02162	serine/threonine-protein kinase RsbW [EC:2.7.11.1]	K04757	<i>rsbW</i>
GFFKBBAP_04036	PLGCOHOI_01518, PLGCOHOI_05892	IMMNMPHA_02160	phosphoserine phosphatase RsbU/P [EC:3.1.3.3]	K07315	<i>rsbU_P</i>
GFFKBBAP_05657	PLGCOHOI_05888	IMMNMPHA_02156	mRNA interferase MazF [EC:3.1.-.-]	K07171	<i>mazF</i> , <i>ndoA</i> , <i>chpA</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_00002, PLGCOHOI_00003, PLGCOHOI_01251, PLGCOHOI_01253, PLGCOHOI_01254, PLGCOHOI_01257, PLGCOHOI_01357, PLGCOHOI_02087, PLGCOHOI_02124, PLGCOHOI_02250, PLGCOHOI_02256, PLGCOHOI_02641, PLGCOHOI_02648, PLGCOHOI_02996, PLGCOHOI_03237, PLGCOHOI_04674, PLGCOHOI_04762, PLGCOHOI_05070, PLGCOHOI_05380, PLGCOHOI_05452, PLGCOHOI_05720, PLGCOHOI_05776, PLGCOHOI_05889, PLGCOHOI_05989, PLGCOHOI_06136, PLGCOHOI_06137	-	rsbT co-antagonist protein RsbR	K17763	<i>rsbR</i>
---	---	---	---------------------------------	--------	-------------

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_05890		rsbT antagonist protein RsbS	K17762	<i>rsbS</i>
-	PLGCOHOI_01318, PLGCOHOI_05891		serine/threonine-protein kinase RsbT [EC:2.7.11.1]	K17752	<i>rsbT</i>
GFFKBBAP_04040	PLGCOHOI_05893	IMMNMPHA_02161	anti-sigma B factor antagonista	K04749	<i>rsbV</i>
-	PLGCOHOI_05896	IMMNMPHA_02164	phosphoserine phosphatase RsbX [EC:3.1.3.3]	K05518	<i>rsbX</i>
GFFKBBAP_00587	PLGCOHOI_00888	-	RNA polymerase primary sigma factor	K03086	<i>rpoD</i>
GFFKBBAP_00966, GFFKBBAP_01284, GFFKBBAP_01572, GFFKBBAP_01706, GFFKBBAP_01979, GFFKBBAP_02147, GFFKBBAP_02778, GFFKBBAP_02812, GFFKBBAP_03435, GFFKBBAP_03927, GFFKBBAP_03996, GFFKBBAP_04269, GFFKBBAP_04447	PLGCOHOI_00168, PLGCOHOI_00248, PLGCOHOI_02079, PLGCOHOI_02606, PLGCOHOI_02697, PLGCOHOI_03042, PLGCOHOI_03183, PLGCOHOI_03338, PLGCOHOI_05853	IMMNMPHA_02657	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	K03088	<i>rpoE</i>
GFFKBBAP_02278	PLGCOHOI_02890, PLGCOHOI_03822	-	Hemoglobina	K06886	<i>glbN</i>
GFFKBBAP_00003, GFFKBBAP_02701, GFFKBBAP_04768	PLGCOHOI_00452	IMMNMPHA_01245	host factor-I protein	K03666	<i>hfq</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_05148		multiple antibiotic resistance protein	K05595	<i>marC</i>
GFFKBBAP_02841, GFFKBBAP_03539	PLGCOHOI_00449	IMMNMPHA_01236	GTPase	K03665	<i>hflX</i>
GFFKBBAP_04217	PLGCOHOI_03967	IMMNMPHA_00207	carbon starvation protein	K06200	<i>cstA</i>
-	PLGCOHOI_02861, PLGCOHOI_04100	IMMNMPHA_03849	carbon storage regulator	K03563	<i>csrA</i>
GFFKBBAP_03303	PLGCOHOI_03963, PLGCOHOI_02792	-	alpha-amylase [EC:3.2.1.1]	K01176	<i>amyA</i> , <i>malS</i>
-	PLGCOHOI_04660	-	beta-amylase [EC:3.2.1.2]	K01177	<i>bamM</i>
GFFKBBAP_00109	PLGCOHOI_00505	-	regulator of sigma E protease [EC:3.4.24.-]	K11749	<i>rseP</i>
GFFKBBAP_03445, GFFKBBAP_04175	PLGCOHOI_00262, PLGCOHOI_03952	IMMNMPHA_00695	serine protease Do [EC:3.4.21.107]	K04771	<i>degP</i> , <i>htrA</i>
GFFKBBAP_00307	-	-	cyclomaltodextrinase/maltogenic alpha-amylase/neopullulanase [EC:3.2.1.54, 3.2.1.133, 3.2.1.135]	K01208	<i>npIT</i>
GFFKBBAP_04615	-	-	chitinase [E3.2.1.14]	K01183	<i>chi</i>
Antibiotic resistance					
GFFKBBAP_02967	-	IMMNMPHA_00562	aminoglycoside 6-adenyltransferase [EC:2.7.7.-]	K05593	<i>aadK</i>
GFFKBBAP_02113	PLGCOHOI_02275	-	aminoglycoside 3-N-acetyltransferase [EC:2.3.1.81]	K00662	<i>aacC</i>
GFFKBBAP_02140	-	-	aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase [EC:2.3.1.82]	K00663	<i>aacA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_03363	PLGCOHOI_03487	-	lincosamide and streptogramin A transport system ATP-binding/permease protein	K19350	<i>lsa</i>
GFFKBBAP_03674	-	-	MFS transporter, DHA3 family, macrolide efflux protein	K08217	<i>mef</i>
GFFKBBAP_02995, GFFKBBAP_03070	PLGCOHOI_02591	-	erythromycin esterase [EC:3.1.1.-]	K06880	<i>ereA_B</i>
GFFKBBAP_03951	-	-	bla regulator protein blaR1	K02172	<i>blaR1</i>
GFFKBBAP_03952	-	-	Blal family transcriptional regulator, penicillinase repressor	K02171	<i>blal</i>
GFFKBBAP_01636, GFFKBBAP_03077, GFFKBBAP_04107	PLGCOHOI_01584, PLGCOHOI_02528	-	beta-lactamase class A [EC:3.5.2.6]	K17836	<i>penP</i>
GFFKBBAP_01907, GFFKBBAP_03719	-	-	two-component system, OmpR family, response regulator VanR	K18344	<i>vanRB,</i> <i>vanR,</i> <i>vanRD</i>
GFFKBBAP_01908	-	-	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase VanS [EC:2.7.13.3]	K18345	<i>vanSB,</i> <i>vanS,</i> <i>vanSD</i>
GFFKBBAP_00810, GFFKBBAP_01155, GFFKBBAP_03117, GFFKBBAP_01198, GFFKBBAP_03368	PLGCOHOI_04878	-	zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase [EC:3.4.17.14]	K07260	<i>vanY</i>
GFFKBBAP_02177	-	-	vancomycin resistance protein VanW	K18346	<i>vanW</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_05135	PLGCOHOI_04317, PLGCOHOI_03158	-	GntR family transcriptional regulator, regulator for abcA and norABC	K18907	<i>norG</i>
GFFKBBAP_02961, GFFKBBAP_05316	PLGCOHOI_02174	IMMNMPHA_01676	ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial AbcA/BmrA [EC:7.6.2.2]	K18104	<i>abcA</i> , <i>bmrA</i>
GFFKBBAP_01589	PLGCOHOI_01284	IMMNMPHA_00581	MFS transporter, DHA1 family, tetracycline resistance protein	K08151	<i>tetA</i>
GFFKBBAP_00793	-	-	MFS transporter, DHA2 family, metal- tetracycline-proton antiporter	K08168	<i>tetB</i>
GFFKBBAP_02205	-	-	ribosomal protection tetracycline resistance protein	K18220	<i>tetM</i> , <i>tetO</i>
GFFKBBAP_01777	PLGCOHOI_04317	IMMNMPHA_04232, IMMNMPHA_03209	macrolide transport system ATP- binding/permease protein	K18231	<i>msrA</i> , <i>vmrR</i>
GFFKBBAP_01801	-	-	virginiamycin A acetyltransferase [EC:2.3.1.-]	K18234	<i>vat</i>
GFFKBBAP_02449	-	IMMNMPHA_00829	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1 [EC:6.1.1.13]	K03367	<i>dltA</i>
GFFKBBAP_02448	-	-	membrane protein involved in D- alanine export	K03739	<i>dltB</i>
GFFKBBAP_02447	-	IMMNMPHA_00831	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2 [EC:6.1.1.13]	K14188	<i>dltC</i>
GFFKBBAP_02034, GFFKBBAP_02446	-	-	D-alanine transfer protein	K03740	<i>dltD</i>
GFFKBBAP_02540	PLGCOHOI_05018	IMMNMPHA_03749	phosphatidylglycerol lysyltransferase [EC:2.3.2.3]	K14205	<i>mprF</i> , <i>fmtC</i>
GFFKBBAP_01533	PLGCOHOI_05055	-	chloramphenicol O-acetyltransferase type A [EC:2.3.1.28]	K19271	<i>catA</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_01636		-	chloramphenicol O-acetyltransferase type B [EC:2.3.1.28]	K00638	<i>catB</i>
GFFKBBAP_02974	PLGCOHOI_03475	-	rifampicin phosphotransferase [EC:2.7.9.6]	K22579	<i>rph</i>
-	PLGCOHOI_05135	-	virginiamycin B lyase [EC:4.2.99.-]	K18235	<i>vgb</i>
-	PLGCOHOI_04409	-	streptomycin 6-kinase [EC:2.7.1.72]	K04343	<i>strB</i>
Bacterial toxins					
GFFKBBAP_03662	PLGCOHOI_03583	-	thiol-activated cytolysin	K11031	<i>slo</i>
GFFKBBAP_03365	-	-	hemolysin II	K11032	<i>hlyII</i>
GFFKBBAP_02886	-	-	non-hemolytic enterotoxin A	K11033	<i>nheA</i>
GFFKBBAP_02887	-	-	non-hemolytic enterotoxin B/C	K11034	<i>nheBC</i>
GFFKBBAP_04184, GFFKBBAP_01385	-	-	hemolysin III	K11068	<i>hlyIII</i>
GFFKBBAP_01662, GFFKBBAP_01663	-	-	hemolysin BL binding component	K11035	<i>hblAB</i>
GFFKBBAP_01660	-	-	hemolysin BL lytic component L2	K11036	<i>hblC</i>
GFFKBBAP_02197, GFFKBBAP_03374, GFFKBBAP_04357	-	-	microbial collagenase [EC:3.4.24.3]	K01387	<i>colA</i>
Type II Secretion System					
GFFKBBAP_04681	-	-	pilus assembly protein CpaF [EC:7.4.2.8]	K02283	<i>cpaF</i> , <i>tadA</i>
GFFKBBAP_04679	-	-	pilus assembly protein CpaB	K02279	<i>cpaB</i> , <i>rcpC</i>
GFFKBBAP_03577	PLGCOHOI_04092	IMMNMPHA_03859	competence protein ComFA	K02240	<i>comFA</i>

[Continua]

[Continuação]

-	PLGCOHOI_04093	-	competence protein ComFC	K02242	<i>comFC</i>
GFFKBBAP_03907, GFFKBBAP_03907	-	IMMNMPHA_01919	competence protein ComK	K02250	<i>comK</i>
GFFKBBAP_03869	PLGCOHOI_03853	-	competence protein ComZ	K02254	<i>comZ</i>
Type III Secretion System					
GFFKBBAP_02745	PLGCOHOI_00521	IMMNMPHA_01324	flagellar biosynthesis protein FlhA	K02400	<i>flhA</i>
GFFKBBAP_02744	PLGCOHOI_00522	IMMNMPHA_01325	flagellar biosynthetic protein FlhB	K02401	<i>flhB</i>
GFFKBBAP_02722	PLGCOHOI_00540	-	flagellar M-ring protein FliF	K02409	<i>fliF</i>
GFFKBBAP_02725	PLGCOHOI_00537	-	flagellum-specific ATP synthase [EC:7.4.2.8]	K02412	<i>fliI</i>
GFFKBBAP_02707, GFFKBBAP_02739	PLGCOHOI_00528	-	flagellar motor switch protein FliN/FliY	K02417	<i>fliNY</i> , <i>fliN</i>
GFFKBBAP_02742	PLGCOHOI_00524	IMMNMPHA_01327	flagellar biosynthetic protein FliQ	K02420	<i>fliQ</i>
GFFKBBAP_02741	PLGCOHOI_00525	IMMNMPHA_01328	flagellar biosynthetic protein FliP	K02419	<i>fliP</i>
GFFKBBAP_02743	PLGCOHOI_00523	IMMNMPHA_01326	flagellar biosynthetic protein FliR	K02421	<i>fliR</i>
-	PLGCOHOI_00538	-	flagellar assembly protein FliH	K02411	<i>fliH</i>
-	PLGCOHOI_00526	-	flagellar protein FliO/FliZ	K02418	<i>fliOZ</i> , <i>fliO</i>
Type IV-A secretion system					
GFFKBBAP_00190	PLGCOHOI_00612	-	YggT family protein	K02221	<i>yggT</i>
GFFKBBAP_00621	PLGCOHOI_00924	IMMNMPHA_03393	competence protein ComEA	K02237	<i>comEA</i>
GFFKBBAP_00619	PLGCOHOI_00922	IMMNMPHA_03395	competence protein ComEC	K02238	<i>comEC</i>
GFFKBBAP_00622	PLGCOHOI_00925	-	competence protein ComER	K02239	<i>comER</i>
GFFKBBAP_00538	PLGCOHOI_00843	IMMNMPHA_02978	competence protein ComGA	K02243	<i>comGA</i>
GFFKBBAP_00537	PLGCOHOI_00842	-	competence protein ComGB	K02244	<i>comGB</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00620	PLGCOHOI_00923	-	dCMP deaminase [EC:3.5.4.12]	K01493	<i>comEB</i>
GFFKBBAP_00536	PLGCOHOI_00841	IMMNMPHA_02976	competence protein ComGC	K02245	<i>comGC</i>
GFFKBBAP_02385	PLGCOHOI_01020	IMMNMPHA_00368	leader peptidase (prepilin peptidase) / N-methyltransferase [EC:3.4.23.43, 2.1.1.-]	K02236	<i>comC</i>
-	PLGCOHOI_00838	-	competence protein ComGF	K02248	<i>comGF</i>
-	PLGCOHOI_01909	IMMNMPHA_01919	competence protein ComK	K02250	<i>comK</i>
Twin-arginine translocation system					
GFFKBBAP_01386	PLGCOHOI_03422, PLGCOHOI_03553, PLGCOHOI_04115, PLGCOHOI_06207	-	sec-independent protein translocase protein TatA	K03116	<i>tatA</i>
GFFKBBAP_01387	PLGCOHOI_04116, PLGCOHOI_06206	IMMNMPHA_03540	sec-independent protein translocase protein TatC	K03118	<i>tatC</i>
Bacterial secretion system (Sec)					
GFFKBBAP_03588	PLGCOHOI_04112	IMMNMPHA_01633	preprotein translocase subunit SecA [EC:7.4.2.8]	K03070	<i>secA</i>
GFFKBBAP_05381	PLGCOHOI_05588	IMMNMPHA_02721	preprotein translocase subunit SecE	K03073	<i>secE</i>
GFFKBBAP_03651	PLGCOHOI_04163	IMMNMPHA_02786	preprotein translocase subunit SecG	K03075	<i>secG</i>
GFFKBBAP_01923, GFFKBBAP_05416	PLGCOHOI_05553, PLGCOHOI_06031	IMMNMPHA_02685	preprotein translocase subunit SecY	K03076	<i>secY</i>
GFFKBBAP_00702	PLGCOHOI_00981	IMMNMPHA_00470	SecD/SecF fusion protein	K12257	<i>secDF</i>
GFFKBBAP_00134	PLGCOHOI_00562	IMMNMPHA_01365	signal recognition particle subunit SRP54 [EC:3.6.5.4]	K03106	<i>ffh</i>

[Continua]

[Continuação]

GFFKBBAP_00136	PLGCOHOI_00564	IMMNMPHA_01368	fused signal recognition particle receptor	K03110	<i>ftsY</i>
GFFKBBAP_00707	PLGCOHOI_00986	IMMNMPHA_00465	preprotein translocase subunit YajC	K03210	<i>yajC</i>
GFFKBBAP_03731	PLGCOHOI_03922, PLGCOHOI_00361	-	YidC/Oxa1 family membrane protein insertase	K03217	<i>yidC</i> , <i>ccfA</i>

[Conclusão]