

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**JACKELINE ROSSETTI MATEUS**

ESTUDOS GENÔMICOS DAS ESTIRPES *Bacillus velezensis* T149-19 E *Bacillus safensis* T052-76 PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E SUA  
AÇÃO NO BIOCONTROLE DO MAL-DO-PÉ EM BATATA-DOCE

RIO DE JANEIRO

2021



**JACKELINE ROSSETTI MATEUS**



ESTUDOS GENÔMICOS DAS ESTIRPES *Bacillus velezensis* T149-19 E *Bacillus safensis* T052-76 PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E SUA AÇÃO NO BIOCONTROLE DO MAL-DO-PÉ EM BATATA-DOCE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucy Seldin

RIO DE JANEIRO

2021

## CIP - Catalogação na Publicação

MM425e Mateus, Jackeline Rossetti  
Estudos genômicos das estirpes de *Bacillus velezensis* T149-19 e *Bacillus safensis* T052-76 produtoras de substâncias antimicrobianas e sua ação no biocontrole do mal-do-pé em batata-doce / Jackeline Rossetti Mateus. -- Rio de Janeiro, 2021. 112 f.

Orientadora: Lucy Seldin.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2021.

1. *Bacillus velezensis*. 2. *Bacillus safensis*. 3. Substância antimicrobiana. 4. Batata-doce. 5. Mal-do pé. I. Seldin, Lucy, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Jackeline Rossetti Mateus

ESTUDOS GENÔMICOS DAS ESTIRPES *Bacillus velezensis* T149-19 E *Bacillus safensis* T052-76 PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E SUA AÇÃO NO BIOCONTROLE DO MAL-DO-PÉ EM BATATA-DOCE

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Aprovada em \_\_\_\_\_

---

Prof. Dra. Lucy Seldin (orientadora)  
Professora - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Andrew Macrae (presidente da banca)  
Professor - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Maitê Vaslin de Freitas Silva (Membro da Banca)  
Professor - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Daniela Sales Alviano (Membro da Banca)  
Professor - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank (Membro da Banca)  
Professor - UFS – Universidade Federal de Sergipe

---

Prof. Dra. Joana Montezano Marques (Membro da banca)  
Professora - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Fernanda de Ávila Abreu (Revisor/Suplente interno)  
Professor - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Diogo Jurelevicius (Suplente externo)  
Professora - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Dedico este trabalho à minha família, que além de sempre incentivar meu caminho acadêmico, também sempre me amou de forma exigente, fazendo com que eu tivesse força necessária para chegar até aqui. Dedico também à minha orientadora, Lucy Seldin, cuja paciência e dedicação foram meu esteio nesses tempos sombrios.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família: meus pais e minhas irmãs, pois sem o apoio deles eu não estaria aqui e este trabalho não seria realizado; especialmente à Débs, irmã-marida, companheira de todas as horas – inclusive de quarentena, e a melhor tia que os gatos podem ter! Ao meu moreno, companheiro amado, Pablo Miranda, que me apoia todos os dias, incansavelmente. Ao Albus e ao Tobias – as razões da minha vida, motivos pelos quais continuo levantando da cama todos os dias.

À professora Lucy Seldin, em primeiro lugar, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo, e então, por todo o conhecimento passado com tanta dedicação, por ser uma inspiração, por todo o suporte, orientação e paciência. Por ser humana, por estar sempre presente e por ter acreditado em mim quando nem eu acreditava mais. Não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão.

À antiga e à nova “Equipe Planta”: Jow, Thais, Rê e Isa Dal’Rio - Obrigada por tudo! Não poderia esquecer o começo, sem vocês não teria chegado até o fim! À Isa de novo, porque um agradecimento só é pouco! Você foi e é a melhor aluna, pesquisadora, companheira de bancada e amiga que esse Instituto há de ver. Grande e brilhante é o seu futuro, e sou feliz por ter feito um pouquinho parte dele.

Agradeço a todos que de alguma forma participaram deste trabalho, a todos do Laboratório de Genética Microbiana pela paciência e pela ajuda nos momentos em que mais precisei, pelos cafés, pelos risos, pela companhia – por tudo! Janinha, muitíssimo obrigada por todo o suporte na bancada. Bia, você é gigante na frente de um computador, impressiona sua dedicação e capacidade de aprender, você é incrível! Obrigada por tudo, sempre! Diju, obrigada por tanta ajuda, em qPCR, análises e tudo o mais! Érickinha, Lili, Mari, Rapha, Carol, Bianca, Ju, Isinha Campelo, Felipe, Isas novas; aos que já foram, mas que muito ajudaram quando estiveram, especialmente à Vá. Obrigada a todos! Vocês todos foram essenciais para minha vida diária no laboratório e para esse trabalho chegar até aqui (desculpe se esqueci alguém, mas ando com memória de peixe – mais precisamente de uma certa *Paracanthurus hepatus* da Pixar).

Agradeço às minhas amigas Luana Lessa, Renata Cristina, Lina, Denise, Lucilene Marcolino e Ivana. Todas vocês são muito importantes na minha vida e, conseqüentemente, estiveram comigo, de alguma forma, nesses anos todos de doutorado. Amo cada uma de vocês e sou grata por existirem.

Obrigada aos parceiros do LABEM, especialmente aos professores Diju (de novo, sim!), Caio e Mateus. Todas as dúvidas sanadas e socorros que me deram nos mais variados momentos foram valiosos e essenciais.

Ao professor Arie Blank, que vem nos auxiliando desde os primórdios do projeto com a batata-doce, sempre cedendo mais um exemplar das cultivares utilizadas, sempre ajudando. Muito, muito obrigada!

À professora Celuta, que também vem auxiliando esse projeto desde o seu início, seja cedendo materiais de seu laboratório, espaço, ideias, colaboradores (Obrigada, Fátima!!!!), ou mesmo transportando batatas. Obrigada por tudo, professora!

Aos professores Arthur, Rommel e Joana, pela parceria, por cederem material, tempo e todo auxílio necessário ao sequenciamento e montagem dos genomas. A toda equipe do laboratório do professor Arthur, por terem me recebido tão bem, especialmente à Cássia, Carla, Rosiane, Alyne, Vitória e Adriedson. Obrigada de novo à Jow (esse já é o terceiro, e ainda é pouco!), que além de possibilitar essa parceria, abriu sua casa para me receber, com tanto carinho!

Ao Dr. Fábio, pelo auxílio na anotação, depósito e análise dos genomas, e pela paciência com muitas e muitas perguntas, muitos e-mails! Obrigada demais, Fábio!

Ao Professor Paulo Gagliardi, por ceder o espaço, material, tempo e alunos de seu laboratório para a realização dos experimentos na casa de vegetação.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela estrutura e formação, desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e nos mais de quatro anos do doutorado. Tenho orgulho demais de ser Minerva! A UFRJ é um patrimônio nacional e merece, junto a todo o corpo docente e discente, mais atenção e investimentos para que siga sendo pública, gratuita e de excelência!

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, e todos os professores do programa, pela formação e pela oportunidade da realização deste trabalho. Obrigada às funcionárias e estagiárias da secretaria do PBV, sempre solícitas e competentes. Obrigada também ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a todos os professores e funcionários! Um agradecimento especial às tias da limpeza – como rimos juntas nesses anos todos de laboratório! Maravilhosas e essenciais! Obrigada a todos os professores, de ambas os programas de pós que fizeram parte da minha formação, em todas as disciplinas, e também aos que fizeram parte de todas as bancas pelas quais esse trabalho passou - desde o processo seletivo, o plano, a qualificação, as jornadas e agora a tese.

À Embrapa, especialmente à pesquisadora da Embrapa Agrobiologia Marcia Reed Coelho, com quem meu caminho tanto cruzou, uma profissional incrível, sempre disposta a ajudar de todas as formas possíveis, a trocar conhecimentos e ideias. Muito obrigada, Marcinha!

Ao LNCC, pelos cursos incríveis onde pude aprender um pouquinho do básico desse universo gigantesco que é a bioinformática.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

*Vocês, melhor aprenderem a ver, em vez de apenas  
Arregalar os olhos, e a agir, em vez de somente falar.  
Uma coisa dessas quase chegou a governar o mundo!  
Os povos conseguiram dominá-la, mas ainda  
É muito cedo para sair cantando vitória:  
O ventre que gerou a coisa imunda continua fértil!*

Bertolt Brecht

*A vida, sem ciência, é uma espécie de morte.*

Sócrates

## RESUMO

Mateus, Jackeline Rossetti. Estudos genômicos das estirpes *Bacillus velezensis* T149-19 e *Bacillus safensis* T052-76 produtoras de substâncias antimicrobianas e sua ação no biocontrole do mal-do-pé em batata-doce/Jackeline Rossetti Mateus – Rio de Janeiro, 2021. Rio de Janeiro, 2021. Tese de doutorado (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Universidade Federal do Rio de Janeiro/Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, 2021.

A batata-doce (*Ipomoea batatas*) é uma planta pertencente à família Convolvulacea com um sistema radicular que apresenta dois tipos de raízes, as de reserva (ou tuberosas) e as de absorção. A hortaliça é do tipo perene, tolerante à seca, e suas raízes tuberosas são ricas em vitaminas e carboidratos, principalmente amido. A batata-doce possui diversas aplicações, podendo ser utilizada para o consumo humano, para o preparo de rações animais e de diversos produtos industriais. No Brasil, é considerada uma cultura de subsistência, com grande importância social para a agricultura familiar, especialmente na região nordeste. No entanto, a cultura é suscetível a diversas pragas e doenças. O mal-do-pé da batata doce é uma doença causada pelo fungo fitopatogênico *Plenodomus destruens* e pode levar à perda total da produção, com sintomas que incluem o apodrecimento das raízes tuberosas, necrose do caule e morte da planta. Não existe registro de antifúngico para uso no Brasil específico contra o *P. destruens*, sendo o principal combate à doença restrito à seleção de cultivares resistentes ao fungo. Espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo empregadas na agricultura como biocontrole e para promover o crescimento das plantas. Em trabalho anterior do nosso grupo, duas estirpes - *Bacillus velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76 - foram capazes de permanecer viáveis por 180 dias em vasos, na rizosfera de mudas de batata-doce, e de inibir o fungo *P. destruens in vitro*. Pela importância da cultura de batata-doce no Brasil e pela necessidade de combater o mal-do-pé, essa tese teve como objetivos: (i) sequenciar e anotar os genomas das duas estirpes de *Bacillus* para se conhecer os genes envolvidos na produção de metabólitos secundários, possivelmente envolvidos na inibição do fitopatógeno; (ii) determinar se as duas estirpes bacterianas evitam o aparecimento de sintomas da doença e/ou se são capazes de combater o fitopatógeno *in vivo* e (iii) verificar o efeito da inoculação das bactérias e do fungo sobre a comunidade microbiana presente na rizosfera de batata-doce. O sequenciamento completo dos genomas das bactérias foi realizado utilizando-se a plataforma Ion Torrent PGM System e o software antiSMASH para a predição dos metabólitos secundários. Foram realizados experimentos em casa de vegetação, onde as bactérias T052-76 e T149-19 foram inoculadas (as duas juntas e separadamente) em vasos contendo mudas de batata-doce, antes e após a inoculação do fungo *P. destruens*. O aparecimento ou não de sintomas característicos do mal-do-pé foi acompanhado durante os 180 dias do experimento. A estrutura das comunidades bacteriana e fúngica presentes na rizosfera de batata-doce após as diferentes inoculações foi determinada através de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE) e a diminuição da contaminação pelo fungo na presença das bactérias inoculadas foi determinada por PCR quantitativo (qPCR). Os resultados do experimento em casa de vegetação mostraram que

ambas as estirpes de *Bacillus* podem proteger a planta da doença e mitigar os sintomas do mal-do-pé. Após o sequenciamento e anotação dos dois genomas, os genes que codificam para micosubtilina, bacileno, macrolactina, bacilibactina, plipastatina, difícidina, bacilisina, kijanimicina, plantazolicina, fengicina e surfactina foram encontrados em *B. velezensis* T149-19, enquanto aqueles que codificam para botromicina A, bacilisina, carotenoide, zwittermicina A, fator de morte da esporulação skfA, liquenisina, surfactina, bacilibactina e fengicina foram encontrados em *B. safensis* T052-76. Nos experimentos em vasos, foi observado que todas as plantas inoculadas com as bactérias (cada uma separadamente ou as duas bactérias juntas) apresentaram um melhor desempenho no seu crescimento e maior capacidade de sobrevivência na presença do fungo. Foi observado também a emissão de brotos laterais e um maior número de folhas nas plantas tratadas com as bactérias. A DGGE obtida para a análise da estrutura da comunidade bacteriana mostrou maior similaridade entre as réplicas. Através da análise de Coordenadas Principais (PCoA) da matriz da DGGE, foi observado que a estrutura da comunidade bacteriana foi mais impactada quando foram inoculadas as duas bactérias em consórcio, estas inoculadas antes do fungo, quando comparadas ao tratamento controle. Ao contrário, não foi detectada uma influência significativa sobre a comunidade bacteriana nas plantas inoculadas primeiramente com o fungo. Já para a comunidade fúngica analisada por meio da DGGE, houve uma clara influência do inóculo das bactérias na estruturação dessa comunidade, com o agrupamento das amostras inoculadas apenas com o fungo, grupo este que se separa das amostras que continham as bactérias, em todas as condições. A quantificação da comunidade fúngica total por PCR em tempo real mostrou que para a maioria dos tratamentos ocorreu uma diminuição significativa no número de cópias da região ITS (*internal transcribed spacer*) quando as bactérias foram inoculadas, antes ou depois do fungo, em comparação com o controle (apenas com o fungo). Em conjunto, os dados aqui apresentados contribuem para o avanço do conhecimento para a utilização dessas estirpes de *Bacillus* no biocontrole do mal-do-pé em batata-doce.

Palavras-chaves: *Bacillus velezensis*, *Bacillus safensis*, substância antimicrobiana, batata-doce, mal-do-pé.

## ABSTRACT

Mateus, Jackeline Rossetti. Genomic studies of strains of *Bacillus velezensis* T149-19 and *Bacillus safensis* T052-76 that produce antimicrobial substances and their action in the biocontrol of sweet potato/Jackeline Rossetti Mateus – Rio de Janeiro, 2021. Rio de Janeiro, 2021. Doctoral thesis (Doctorate in Plant Biotechnology and Bioprocesses). Federal University of Rio de Janeiro/Postgraduate in Plant Biotechnology and Bioprocesses, 2021.

Sweet potato plant (*Ipomoea batatas* L.) is a Convolvulaceae family plant that presents a complex root system composed by tuberous roots (specialized in nutrient storage) and absorption roots. The vegetable is a perennial plant type, tolerant to drought, and its tuberous roots are rich in vitamins and carbohydrates, mainly starch. Sweet potato has many applications and can be used for human consumption, for animal feed and for the development of industrial products. In Brazil, it is considered a subsistence crop, with great social importance for family-based agriculture, mainly in the northeast region of Brazil. However, the crop is susceptible to various pests and diseases. The foot-rot disease is a disease caused by the phytopathogenic fungus *Plenodomus destruens* and can result in the total loss of harvest production, with symptoms including rotting of the tuberous roots, stem necrosis and plant death. There is no antifungal agent registered for use in Brazil against *P. destruens*, the main fight against the disease being restricted to the selection of resistant cultivars. The genus *Bacillus* has been used in agriculture as a biocontrol agent and to promote plant growth. In a previous study of our group, two strains - *Bacillus velezensis* T149-19 and *B. safensis* T052-76 - were able to remain viable for 180 days in pots, in the rhizosphere of sweet potato seedlings, and to inhibit the fungus *P. destruens* *in vitro*. Because of the sweet potato crop importance in Brazil and the need to combat the foot-rot disease, the present study aimed to: (i) sequence and annotate the genomes of the two *Bacillus* strains in order to gain knowledge about the genes involved in the production of secondary metabolites, possibly involved in the phytopathogen inhibition; (ii) determine whether the two bacterial strains prevent the onset of disease symptoms and/or are able to fight against the phytopathogen *in vivo*, and (iii) verify the effect of the inoculation of the bacteria and the fungus on the microbial community present in the sweet potato rhizosphere. The complete sequencing of the bacterial genomes was performed using the Ion Torrent PGM System platform and the antiSMASH software was used for the prediction of the secondary metabolites. Experiments were carried out in a greenhouse, where the bacterial strains T052-76 and T149-19 were inoculated (both together and separately) in pots containing sweet potato seedlings, before and after inoculation of the fungus *P. destruens*. The appearance or not of characteristic symptoms of foot-rot disease was monitored during the 180 days of the experiment. The structure of the bacterial and fungal communities present in the sweet potato rhizosphere after the different inoculations was determined using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE). The decrease of fungal contamination in the presence of the inoculated bacteria was determined by quantitative PCR (qPCR). The results of the greenhouse experiment showed that both strains of *Bacillus* could protect the plant and mitigate the symptoms of foot-rot disease. After sequencing and annotating the two genomes, the genes that code for mycosubtilin, bacillaene, macrolactin, bacillibactin,

plipastatin, difficidin, bacilysin, kijanimicin, plantazolicin, fengycin and surfactin were found in *B. velezensis* T149-19, while those that code for bottromycin A, bacilysin, carotenoid, zwittermicin A, skfA sporulation killing factor, lichenysin, surfactin, bacillibactin and fengycin were found in *B. safensis* T052-76. In the pot experiments, all plants inoculated with the bacteria (each one separately or both bacteria together) showed better performance in their growth and greater ability to survive in the presence of the fungus. It was also observed the emission of lateral shoots and a greater number of leaves in plants treated with the bacteria. The bacterial community structure analyzed by DGGE showed a greater similarity among the replicates. Through the Principal Coordinates (PCoA) analysis of the DGGE matrix, it was observed that the structure of the bacterial community was more impacted when the two bacteria were inoculated in consortium, (they inoculated before the fungus), when compared to the control. No significant influence on the bacterial community was observed in the analysis of samples previously inoculated with the fungus. A clear influence of the bacterial inoculum on the structuring of the fungal community was detected, with the grouping of samples inoculated only with the fungus, a group that is separated from the samples that contained the bacteria, in all conditions. Quantification of the total fungal community by real-time PCR showed that for most treatments there was a significant decrease in the number of ITS gene copies when the bacteria were inoculated, before or after the fungus, compared to the control (only with the fungus). Altogether, the data presented here contribute to advancing the knowledge for the use of these *Bacillus* strains as biocontrol products to foot-rot disease in sweet potato.

Palavras-chaves: *Bacillus velezensis*, *Bacillus safensis*, antimicrobial substance, sweet potato, foot-rot.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção brasileira (em toneladas) de batata-doce no período de 2009 a 2018. Os valores no interior de cada barra/ano representam o valor médio da produção (em mil reais) para o ano em questão. Fonte: adaptado de IBGE: Produção Agrícola Municipal <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/5457>>, acessado em junho de 2021..... 2
- Figura 2.** Indicadores da produção nacional de batata-doce, por região do Brasil, para o ano de 2018. (A) Área efetivamente colhida, medida em hectares); (B) Quantidade produzida, em toneladas. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/5457>>, acessado em junho de 2021..... 3
- Figura 3.** Vasos com mudas de batata-doce. Em (A) planta susceptível e afetada pela doença mal-do-pé, com presença de necrose na base do caule e queda de folhas, apontado pelas setas. Em (B) uma planta saudável, resistente ao mal-do-pé. Fonte: PEREIRA *et al.* (2014) ..... 7
- Figura 4.** Batata-doce com lesão necrótica causada pelo mal-do-pé. A podridão se inicia na extremidade onde a raiz tuberosa está conectada à raiz mãe, e é firme, seca e marrom escura, podendo tomar conta de toda a raiz. Fonte: <<http://www.agronomicabr.com.br>>, acessado em abril de 2021 ..... 7
- Figura 5.** Características de promoção do crescimento das plantas mediadas por bactérias do gênero *Bacillus*, consistindo em: produção de substâncias antimicrobianas (SAMs); sideróforos; ácidos orgânicos; fitormônios; toxinas, enzimas e ácidos orgânicos voláteis com efeitos antimicrobianos e insetívoros; mediação de resistência sistêmica induzida (RSI) e tolerância sistêmica induzida (TSI), que ativam defesas da planta contra fitopatógenos e condições adversas. Fonte: adaptado de SAXENA *et al.* (2019) ..... 10
- Figura 6.** Etapas da montagem de genoma utilizando a metodologia *de novo*. 1. Fragmentos de DNA após o sequenciamento; 2. Procura por regiões de sobreposição entre as sequências; 3. Montagem dos *contigs* com base nas sobreposições encontradas nos *reads*; 4. Organização dos *contigs* a fim de obter *scaffolds*. Fonte: Adaptado de BAKER (2012)..... 20
- Figura 7.** Esquema dos vasos onde as mudas foram plantadas: em (A) representado cada um dos sete tratamentos (incluindo o grupo controle) que serão realizados em quadriplicata e (B) mostrando as dimensões dos vasos a serem utilizados..... 29
- Figura 8.** Fotografia mostrando as raízes coletadas com solo aderido. As amostras foram misturadas com salina estéril 0,85% para agitação e liberação do solo aderido. Após agitação, as raízes foram retiradas e o solo rizosférico foi utilizado para a extração do DNA..... 32
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose do DNA para sequenciamento. Kb representa o MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use; nos slots onde se lê 76 foi aplicado o DNA da estirpe T052-76; e nos slots onde se lê 19 foi aplicado o DNA da estirpe T149-19..... 35

**Figura 10.** Cluster biossintético que codifica uma substância antimicrobiana da classe da micosubtilina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 (B). O traço em rosa marca os genes *Yng* - estes encontram-se em posições diferentes nos dois genomas quando ambos os clusters são comparados. Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em vermelho. Todos os genes representados sem cor não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 38

**Figura 11.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe do bacileno no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *Bacillus velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em azul claro. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 39

**Figura 12.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da macrolactina H, B, 1c e E no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A), e nos genomas de *Bacillus velezensis* FZB42 para macrolactina H (B) e *Jeotgalibacillus. marinus* para macrolactina H, B, 1c e E (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos três genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 40

**Figura 13.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da bacilibactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 em (A), onde a região colorida, com os nomes de cada gene encontrado, apresenta 100% de similaridade com o cluster que codifica a substância bacilibactina no genoma de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168, que está representado em (B). Em (C) e (D), os clusters que codificam para as substâncias paenibactina (no genoma de *Paenibacillus elgii* B69) e amilociclicina (no genoma de *B. velezensis* FZB42), respectivamente. Em (E), o cluster completo do genoma aqui estudado, com as regiões marcadas em vermelho e azul correspondentes aos genes com 100% de similaridade com os clusters em (D e C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em verde limão. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 41

**Figura 14.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da plipastatina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. subtilis* subsp. *subtilis* (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em vermelho. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 41

**Figura 15.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da difigidina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas cores iguais. O core biossintético da substância difigidina é aqui representado pela cor ciano. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 42

**Figura 16.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é aqui representado pelas cores vermelha (*srfAB*), verde (*srfAC*) e ciano (*srfAD*). Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 43

**Figura 17.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é aqui representado pela cor ciano (*srfAA*). Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 43

**Figura 18.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 44

**Figura 19.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da bacilisina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e nos genomas de *B. velezensis* FZB42 (B) e *Bacillus* sp. CS93 (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos três genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 45

**Figura 20.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da kijinimicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *Actinomadura kijaniata* (B). Os homólogos encontrados nos dois genomas são representados pela cor vermelha. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 45

**Figura 21.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da plantazolicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas

são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 46

**Figura 22.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da fengicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 47

**Figura 23.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da fengicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pela cor vermelha. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 47

**Figura 24.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da botromicina A no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *Streptomyces* sp. BC16019 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 50

**Figura 25.** Cluster biossintético que codifica uma substância antimicrobiana da classe da bacilisina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). O traço em rosa marca os genes do core biossintético da bacilisina, genes *bac* e *ywg*. A seta em vermelho mostra o gene *bacG* encontrado no cluster de *B. safensis* T052-76. Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O gene sem cor no genoma de *B. velezensis* FZB42 é o gene *bacC*, não encontrado no genoma aqui estudado. Todos os genes sem cor em (A) representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes em (B)..... 50

**Figura 26.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe carotenoide no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *Halobacillus halophilus* DSM 2266 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados... 51

**Figura 27.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da zwitermicina A no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. cereus* (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 51

**Figura 28.** Cluster biossintético que codifica para um metabólito do tipo fator de morte da esporulação (fator *skfA* e locilomicina no genoma de *B. safensis* T052-76 em (A), fator de morte da esporulação em *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 em (B) e locilomicina em *B. subtilis* sp. em (C). A linha na cor azul (em A e C) marca os genes *ybbR*, *glmM* e *glmS*, responsáveis pelo core biossintético da substância da classe da locilomicina. A linha na cor vermelha (em

A e B) destaca os genes *skf*, responsáveis pelo core biossintético do metabólito fator de morte da esporulação. Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 52

**Figura 29.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da liquenisina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. licheniformis* DSM 13 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 53

**Figura 30.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados. Os genes marcados com um asterisco vermelho e não coloridos estão presentes no genoma de *B. safensis* e não foram identificados homólogos no genoma de *B. velezensis* FZB42..... 53

**Figura 31.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da bacilobactina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A), e nos genomas de *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (B) e *B. velezensis* FZB42 (D). Cluster biossintético que codifica a substância paenibactina no genoma de *Paenibacillus elgii* B69 (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos quatro genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 54

**Figura 32.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da fengicina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 54

**Figura 33.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da liquenisina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. licheniformis* DSM13 (B). Os homólogos encontrados nos dois genomas são representados pela cor vermelha. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados..... 55

**Figura 34.** Determinação do número de folhas nas diferentes plantas dos tratamentos T1 a T7 - 180 DAP. Os tratamentos de T3 a T7 apresentaram número de folhas significativamente maior do que o tratamento controle (inoculado apenas com o fungo) (T1=F; T2=19+F; T3=76+F; T4=19+76+F; T5=F+19; T6=F+76; T7=F+19+76) ..... 56

**Figura 35.** Determinação do comprimento das plantas - 180 DAP. A média de comprimento das plantas do tratamento controle (F) foi aproximadamente 64% menor que a média de todos

os tratamentos inoculados com as bactérias <i>B. velezensis</i> T149-19 e <i>B. safensis</i> T052-6, juntas ou separadamente, antes ou após o inóculo fúngico.....	57
<b>Figura 36.</b> Sobrevivência das plantas nos diferentes tratamentos - 180 DAP. Todas as plantas inoculadas apenas com o fungo (controle F) mostraram uma sobrevivência menor que as plantas inoculadas com as bactérias.....	57
<b>Figura 37.</b> Emissão de brotos laterais - 180 DAP. Nas plantas do tratamento controle, inoculadas apenas com o fungo, a emissão de brotos laterais foi muito inferior à emissão de brotos laterais pelas plantas dos tratamentos onde as estirpes de <i>Bacillus</i> foram inoculadas.....	58
<b>Figura 38.</b> Vasos contendo mudas de batata-doce dos tratamentos 3 e 5, inoculadas com a bactéria <i>B. safensis</i> T052-76 e depois com o fungo <i>P. destruens</i> (A) e com o fungo e depois com a bactéria <i>B. velezensis</i> T149-19 (B), respectivamente. As setas vermelhas apontam para os brotos laterais emitidos pelas plantas em (A) e (B).....	58
<b>Figura 39.</b> Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando-se o coeficiente de Dice a partir da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) baseado em fragmentos do gene <i>rrs</i> da comunidade bacteriana da rizosfera dos tratamentos de T1 a T7. F: inoculado com <i>P. destruens</i> ; 19: <i>B. velezensis</i> T149-19; 76: <i>B. safensis</i> T052-76. A-D representam as réplicas (n=4).....	60
<b>Figura 40.</b> Análise PCoA baseada na matriz obtida na DGGE para a comunidade bacteriana total das amostras dos tratamentos T1 (controle), T2, T3 e T4. Os vértices de cada figura representam as réplicas (n=4) dentro de cada tratamento (T1=F; T2=19+F; T3=76+F; T4=19+76+F) .....	61
<b>Figura 41.</b> Análise PCoA baseada na matriz obtida na DGGE para a comunidade bacteriana total das amostras dos tratamentos T1 (controle), T5, T6 e T7. Os vértices de cada figura representam as réplicas (n=4) dentro de cada tratamento. (T1=F; T5=F+19; T6=F+76; T7=F+19+76) .....	61
<b>Figura 42.</b> Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando-se o coeficiente de Dice a partir da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) baseado em fragmentos do ITS da comunidade fúngica presente na rizosfera das plantas submetidas aos tratamentos T1 a T7. F: inoculado com <i>P. destruens</i> ; 19: <i>B. velezensis</i> T149-19; 76: <i>B. safensis</i> T052-76. A-D representam as réplicas (n=4).....	62
<b>Figura 43.</b> Determinação da abundância de fungos nos vasos dos diferentes tratamentos, utilizando PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e iniciadores para o ITS. Os valores das barras indicam a média das quatro réplicas de cada tratamento. F: inoculado com <i>P. destruens</i> ; 19: <i>B. velezensis</i> T149-19; 76: <i>B. safensis</i> T052-76.....	63
<b>Figura 44.</b> Análise gráfica N-MDS utilizando dissimilaridade de Bray-Curtis, baseada na matriz de bandas obtida na PCR-DGGE para a comunidade fúngica total das amostras dos tratamentos de T1 a T7. Foram utilizados parâmetros de saúde vegetal (altura da planta e	

número de folhas) e abundância de fungos determinada por qPCR como vetores para a análise do N-MDS. T1=F; T2=19+F; T3=76+F; T4=19+76+F; T5=F+19; T6=F+76; T7=F+19+76. F: inoculado com *P. destruens*; 19: *B. velezensis* T149-19; 76: *B. safensis* T052-76. PH = altura da planta, LN = número de folhas e FA = abundância de fungos..... 65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das SAMs produzidas por <i>Bacillus</i> . Adaptado de: ABRIOUEL <i>et al.</i> , 2011; SUMI <i>et al.</i> , 2015; CAULIER <i>et al.</i> , 2019; STOICA <i>et al.</i> , 2019.....	14
<b>Tabela 2.</b> Resultados iniciais obtidos após o sequenciamento e a montagem do genoma da bactéria <i>B. velezensis</i> T149-19.....	36
<b>Tabela 3.</b> Clusters gênicos que codificam para metabólitos secundários encontrados no genoma da estirpe <i>B. velezensis</i> T149-19 utilizando o software antiSMASH .....	37
<b>Tabela 4.</b> Resultados iniciais obtidos após o sequenciamento e a montagem do genoma da bactéria <i>B. safensis</i> T052-76.....	48
<b>Tabela 5.</b> Clusters gênicos que codificam para metabólitos secundários encontrados no genoma da estirpe <i>Bacillus safensis</i> T052-76 utilizando o software antiSMASH.....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*
- BLIS** - Substância inibidora semelhante a bacteriocina (*Bacteriocin-Like Inhibitory Substances*)
- CMOS** - Chips de Metal-Óxido-Semicondutor
- ddNTPs** - Dideoxinucléotídeos
- DGGE** - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- DNAr 16S** - Fragmento oriundo da amplificação por PCR do gene que codifica o RNA ribossomal 16S
- DAP** - Dias Após o Plantio
- EC** - *Enzyme Commission Numbers*
- EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- Gb** - Gigabases
- Gene *rrs*** - Gene que codifica o RNA ribossomal 16S
- ITS** - *Internal Transcribed Spacer*
- Kb** - Kilobase
- MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- Mb** - Megabases
- MIBiG** - *Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*
- NGS** - Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing*)
- NMDS** - Escalonamento Multidimensional Não Métrico
- NRP** - Peptídeo Não Ribossomal (*Non-Ribosomal Peptide*)
- NRPS** - *Non-ribosomal peptide synthase*
- OTU** - Unidades Taxonômicas Operacionais
- PAST** - *Paleontological Statistics*
- pb** - pares de base
- PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase
- PCoA** - Análise do Componente Principal

**PGM** - Máquina Genômica Pessoal (*Personal Genome Machine*)

**PGPB** - Bactérias Promotoras do Crescimento da Planta (*Plant Growth Promotion Bacteria*)

**PGPR** - Rizobactérias Promotoras do Crescimento da Planta (*Plant Growth Promotion Rhizobacteria*)

**PK** - Policetídeo (*polyketide*)

**PKS** - Policetídeo Sintase (*polyketide synthase*)

**qPCR** - PCR quantitativa em tempo real (*Real Time Quantitative PCR*)

**RP** - Peptídeo Ribossomal (*Ribosomal Peptides*)

**RSI** - Resistência Sistêmica Induzida

**SAMs** - Substâncias Antimicrobianas

**SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio

**SisGen** - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

**TAE** - Tris, Acetato, EDTA

**TEB** - Tris, EDTA, Ácido Bórico

**TSA** - Agar Soja Tríplica (*Trypticase Soy Agar*)

**TSB** - Caldo de Soja Tríplica (*Trypticase Soy Broth*)

**TSI** - Tolerância Sistêmica Induzida

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**UPGMA** - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

## ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. A batata-doce	1
1.2.1. Doenças que afetam a cultura de batata-doce	4
1.2.2. <i>Plenodomus destruens</i> e a doença mal-do-pé	5
1.3. O gênero <i>Bacillus</i>	9
1.4. Substâncias antimicrobianas (SAMs) de <i>Bacillus</i> e biocontrole	11
1.5. Tecnologias para estudos genômicos de <i>Bacillus</i> produtores de SAMs	18
2. HISTÓRICO PRÉVIO DO PRESENTE TRABALHO	22
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivos específicos	24
5. METODOLOGIA	25
5.1. Estirpes bacterianas	25
5.2. Fungo	26
5.3. Crescimento das estirpes bacterianas e extração do DNA genômico	26
5.4. Sequenciamento completo do genoma	27
5.4.1. Construção da biblioteca para o sequenciamento	27
5.5. Montagem do genoma	28
5.6. Anotação funcional	28
5.7. Montagem do experimento em vasos	29
5.8. Análise dos parâmetros fisiológicos e de desenvolvimento das plantas	31
5.9. Extração do DNA total das amostras de rizosfera	31
5.10. Análise das comunidades microbianas através de PCR-DGGE	32
5.11. Determinação da abundância de fungos nos vasos dos diferentes tratamentos, utilizando PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	34
6. RESULTADOS	35

6.1. Extração do DNA genômico	35
6.2. Montagem e anotação do genoma de <i>B. velezensis</i> T149-19 e busca por genes relacionados à síntese de metabólitos secundários	36
6.3. Montagem e anotação do genoma de <i>B. safensis</i> T052-76 e busca por genes relacionados à síntese de metabólitos secundários	47
6.4. Experimento em casa de vegetação	55
6.4.1. Análise da saúde das plantas	55
6.4.2. Análise das comunidades microbianas através de PCR-DGGE	59
6.4.3. Determinação da abundância de fungos nos vasos dos diferentes tratamentos, utilizando PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	63
6.4.4. Correlação da estrutura da comunidade fúngica nos diferentes tratamentos com a fitossanidade (altura da planta e número de folhas) e a abundância fúngica obtida na qPCR	64
7. DISCUSSÃO	65
8. CONCLUSÃO	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10. ANEXOS	81
10.1. Meios de cultura	81
10.2. Tampões	81
10.3. Iniciadores	82
10.4. Trabalhos e contribuições científicas gerados durante o doutorado	84
10.4.1 Artigos como primeira autora	84
10.4.2 Artigos publicados como co-autora	86
11. MATERIAL SUPLEMENTAR DIGITAL	
11.1 Anotação dos clusters gênicos encontrados, com os nomes dos produtos e números EC das enzimas - <i>Bacillus velezensis</i> T149-19	
11.2 Anotação dos clusters gênicos encontrados, com os nomes dos produtos e números EC das enzimas - <i>Bacillus safensis</i> T052-76	

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.2. A BATATA-DOCE

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma dicotiledônea pertencente à família Convolvulaceae e está entre as culturas de subsistência mais amplamente cultivadas em todo o mundo, com aproximadamente 115 milhões de toneladas por ano. Desse total, cerca de 95% são cultivadas em países em desenvolvimento (ZENGGZHI *et al.*, 2016; FAOSTAT, 2019). A planta, originária das Américas do Sul e Central, possui um genoma hexaploide e altamente heterozigótico (ZENGGZHI *et al.*, 2016). Apresenta característica herbácea e perene, e o formato de suas folhas alterna entre a forma de coração e a palmato-lobada, com flores simpétalas que podem apresentar as cores branca ou rosa (MOHANRAJ & SIVASANKAR, 2014).

A batata-doce é capaz de produzir sementes botânicas, porém estas raramente são observadas no campo, uma vez que as raízes geralmente são colhidas antes do florescimento da planta. Assim, a propagação da cultura é realizada comercialmente de maneira vegetativa (reprodução assexuada), via corte e transplântio de ramos de 30 a 50 cm (EMBRAPA: [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br), acessado em maio de 2021).

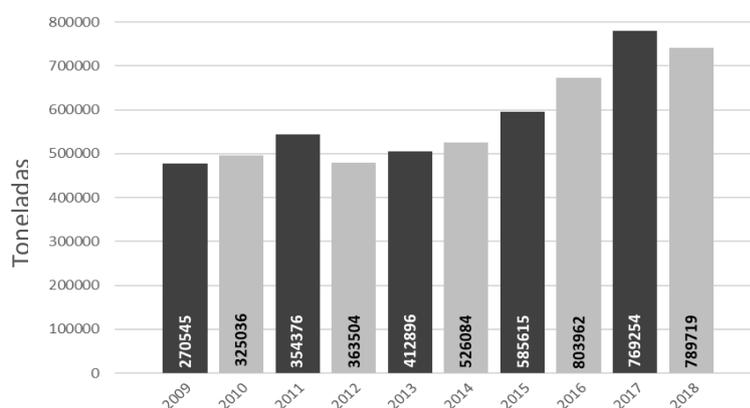
O vegetal apresenta dois tipos de raízes: as de absorção e as de armazenamento (também chamadas de raízes tuberosas). As raízes tuberosas são a parte de maior interesse social e econômico da planta, sendo utilizadas na alimentação humana e animal, e na produção industrial de farinha, amido e álcool (SILVA, LOPES & MAGALHÃES, 2008). Na alimentação humana, a raiz tuberosa tem grande valor nutricional, o que é importante para atender as necessidades nutricionais, incluindo carboidratos, fibras, carotenos, tiamina, riboflavina, niacina, potássio, zinco, cálcio, ferro, vitaminas A e C e proteína de alta qualidade (EL SHEIKHA & RAY, 2017).

Dependendo da coloração da polpa da batata-doce, até 100% da quantidade diária de vitamina A que uma pessoa necessita pode ser suprida com o consumo de 200g da hortaliça cozida. Os genótipos que apresentam cor alaranjada são os mais ricos em  $\beta$ -caroteno e podem ser utilizados para suplementar a alimentação e combater deficiências de vitamina A. Além disso, a raiz tuberosa pode conter até 60% de teor de amido, componente de maior interesse das indústrias alimentícias e de produção de

biocombustíveis (MOHANRAJ & SIVASANKAR, 2014; ISLAM *et al.*, 2016a; TACO: Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (2011): <<http://www.nepa.unicamp.br/taco/tabela.php?ativo=tabela>>, acessado em março de 2021).

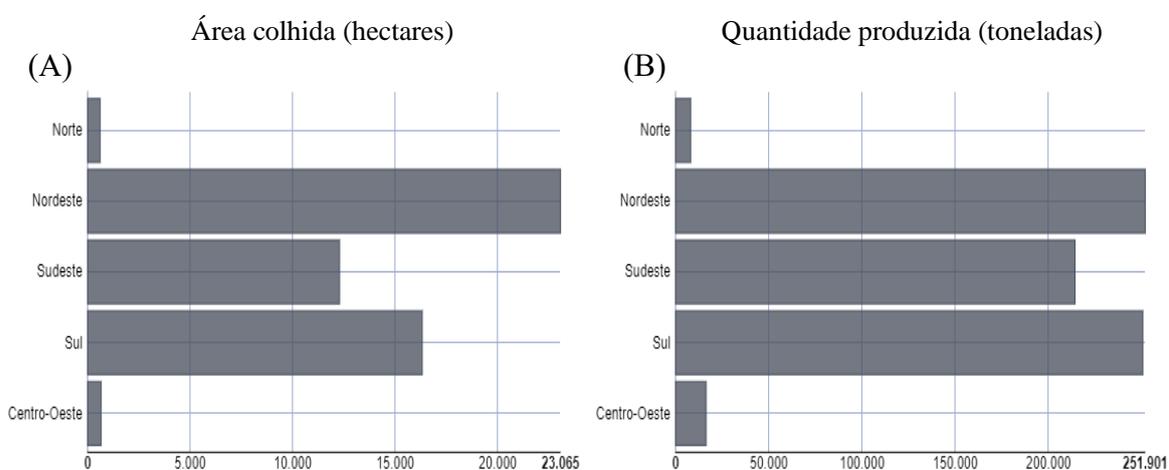
Por todas essas propriedades benéficas, a batata-doce vem sendo utilizada, com bastante sucesso, em programas de combate à desnutrição em países gravemente afetados por insegurança alimentar (FAO: Resilience Programme for Somalia <<http://www.fao.org> >, acessado em maio de 2021). Além disso, a diminuição da disponibilidade de arroz em todo o mundo, o crescimento populacional, os níveis modestos de renda absoluta para grandes segmentos de consumidores e o declínio do tamanho das fazendas produtoras tendem a contribuir para esse uso crescente de raízes frescas para consumo humano (EL SHEIKHA & RAY, 2017).

A cultura da batata-doce é bastante difundida no mundo, sendo cultivada em pelo menos 115 países. Porém, adapta-se melhor a regiões tropicais (FAOSTAT, 2019; NEELA & FANTA, 2019). A batata-doce é considerada uma das principais culturas alimentares em todo o mundo sendo produzida e consumida em grande quantidade no Leste Asiático, Oceania, África Subsaariana e América Latina (JONGSTRA *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021). Ela é a sexta hortaliça mais plantada no Brasil, com uma tendência de aumento no seu cultivo nos últimos anos (IBGE, 2019). No Brasil, a produção anual de batata-doce foi de aproximadamente 740.000 toneladas nos anos de 2017-2018 (Figura 1).



**Figura 1.** Produção brasileira (em toneladas) de batata-doce no período de 2009 a 2018. Os valores no interior de cada barra/ano representam o valor médio da produção (em mil reais) para o ano em questão. Fonte: adaptado de IBGE: Produção Agrícola Municipal <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/5457>>, acessado em junho de 2021.

As principais regiões produtoras da batata-doce no Brasil são as regiões sul e nordeste. De acordo com os últimos dados disponibilizados pelo Sistema Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), cerca de 23 mil hectares foram plantados e efetivamente colhidos na região nordeste, enquanto aproximadamente 16 mil hectares foram colhidos na região sul. No entanto, apesar de ter colhido em uma área de 7 mil hectares a mais, a região nordeste apresentou uma produção de apenas 1 mil toneladas a mais que a região sul (Figura 2) (IBGE, 2019). Essa disparidade entre a produção total em relação ao tamanho da área utilizada para plantio na região nordeste mostra que ainda existe um grande potencial para o aumento da produção nessa região.



**Figura 2.** Indicadores da produção nacional de batata-doce, por região do Brasil, para o ano de 2018. (A) Área efetivamente colhida, medida em hectares); (B) Quantidade produzida, em toneladas. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/5457>>, acessado em junho de 2021.

Em todo o Brasil, mas principalmente na região nordeste, apesar da importância da batata-doce, o cultivo ainda acontece sem ou com pouca orientação profissional e com pouco uso de tecnologia, o que resulta em índices de produtividade abaixo do esperado e em baixa qualidade dos produtos (PEREIRA, FERNANDES & PINHEIRO, 2011). Isso ocorre porque a maior parte da produção de batata-doce, tanto no Brasil quanto no restante do planeta, é realizada por pequenos produtores, estando diretamente relacionada à agricultura familiar. Assim, a hortaliça constitui uma importante fonte de subsistência (SILVA, LOPES & MAGALHÃES, 2008).

Um estudo de Neto e colaboradores (2017) mostrou, por exemplo, que é possível aumentar a produtividade das raízes tuberosas da batata-doce com aplicações de doses

adequadas de fertilizantes para diferentes cultivares da planta. Mas a situação da baixa produtividade da cultura muitas vezes é agravada por algumas doenças e pragas que afetam a hortaliça e acarretam perdas produtivas. Neste sentido, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) tem, ao longo dos últimos anos, empreendido esforços para selecionar cultivares da batata-doce resistentes a pragas e a doenças que afetam o seu cultivo (PEREIRA *et al.*, 2014). Porém, ainda existe uma carência nesses estudos, especialmente em relação à compreensão da interação entre o vegetal e os microrganismos do solo e os endofíticos, que são muitas vezes os agentes patogênicos que afetam a lavoura. Por outro lado, outros microrganismos que interagem com a rizosfera da planta podem proteger o vegetal contra patógenos de diversos tipos, pela produção de substâncias antimicrobianas no seu metabolismo.

#### 1.2.1. DOENÇAS QUE AFETAM A CULTURA DA BATATA-DOCE

Além de possuir baixo custo produtivo e contribuir contra a erosão do solo, a batata-doce é uma hortaliça considerada rústica, apresentando maior resistência a doenças quando comparada a outras hortaliças. Apesar disso, algumas doenças e pragas afetam seu cultivo e mais estudos são necessários para a sua compreensão e para o seu controle. A maioria dos patógenos causa danos às raízes, depreciando a parte economicamente mais importante do produto, e esses danos podem provocar forte redução ou até a perda total da produção (WILLIAMS *et al.*, 2013; LOPES & MICHEREFF, 2018). No entanto, a parte aérea da batata-doce também está suscetível a diversas pragas, principalmente ao ataque de insetos.

Em todo o mundo, 270 espécies de insetos e 17 espécies de ácaros foram registradas como pragas de batata-doce em condições de campo ou armazenamento (MENEZES, 2002). Entre elas, o inseto *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire), causador da “Broca da Raiz da batata-doce” é a principal praga dessa cultura em vários países, incluindo o Brasil (OKADA *et al.*, 2014).

No Brasil, os nematoides mais importantes associados ao cultivo da batata-doce são pertencentes ao gênero *Meloidogyne* sp. Na região Nordeste, também é encontrado o nematóide endoparasitário migratório, *Scutellonema bradys*, que pode causar grandes danos à cultura de batata-doce (PINHEIRO *et al.*, 2012).

Em relação aos vírus como patógenos de batata-doce, o *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV, gênero *Potyvirus*) causa a doença conhecida como Nanismo, sendo o fitopatógeno de etiologia viral mais importante economicamente e o mais disseminado em todo o mundo (CLARK *et al.*, 2012).

Quanto a patógenos bacterianos, as espécies *Erwinia chrysanthemi* e *E. carotovora* são os fitopatógenos de batata-doce de maior importância no mundo. A doença causada pela *Erwinia* é conhecida como podridão mole, sendo altamente prejudicial à cultura da batata-doce, atingindo inicialmente o caule, com posterior murcha e morte das extremidades das ramas. As raízes tuberosas podem apresentar a podridão mole no campo, em trânsito, em armazenamento e durante a comercialização (MIKHAIL *et al.*, 2019).

Os fungos patogênicos responsáveis pelas maiores perdas econômicas no cultivo da batata-doce, de acordo com LOPES & MICHEREFF (2018), são: *Ceratocystis fimbriata*, causador da podridão negra; *Fusarium oxysporum*, causador da murcha do Fusarium; *Rhizopus oryzae*, causando podridão mole; *Monilochaetes infuscans*, responsável pela sarna da batata-doce e *Plenodomus destruens*, agente da doença conhecida como mal-do-pé. Dentre as doenças que afetam o cultivo da batata-doce, o mal-do-pé é o mais temido, já que o fungo *P. destruens*, causador da doença, é considerado o patógeno mais destrutivo da cultura (PEREIRA *et al.*, 2014; LOPES & MICHEREFF, 2018).

### 1.2.2. *Plenodomus destruens* E A DOENÇA MAL-DO-PÉ

*Plenodomus destruens* Harter é um fungo pertencente à família Sphaeropsidaceae, patógeno restrito às plantas da família Convolvulacea (PEREIRA, FERNANDES & PINHEIRO, 2011) e tem como características morfológicas picnídios escuros, produzidos de forma isolada ou agrupada, com rostro alongado. Seus esporos são chamados de clamidósporos, e são responsáveis por sua longa permanência no solo e em restos de cultura e raízes infectadas durante o período de armazenamento (KIMATI *et al.*, 1997).

O fungo *P. destruens* é facilmente confundido com *Phomopsis* sp., responsável por outra doença em batata-doce, a Podridão Seca. Para diferenciá-los é necessária a

observação microscópica dos picnídios, sendo que o *Plenodomus* apresenta duas paredes em seus picnídios (uma externa escura e uma interna transparente), enquanto o *Phomopsis* sp. apresenta quatro paredes (PEREIRA, FERNANDES & PINHEIRO, 2011).

A forma principal de disseminação do fungo *P. destruens* consiste na sua permanência em meio a ramas ou raízes tuberosas contaminadas, e o posterior carreamento por insetos, vento, e por outras formas de disseminação passiva (pelas ferramentas utilizadas no plantio/colheita ou pelas próprias mãos do agricultor, por exemplo). Seu desenvolvimento ocorre no solo, sendo favorecido por condições de alta umidade, alta temperatura e excesso de fertilizantes nitrogenados. Após a infecção, os sintomas da doença mal-do-pé levam um período de 30 a 35 dias para aparecerem na planta (KIMATI *et al.*, 1997; PEREIRA, FERNANDES & PINHEIRO, 2011; MENDES *et al.*, 2012).

O início da infecção se dá pelo coleto do caule (base próxima ao solo), implicando em interrupção da absorção de água e nutrientes, decorrente da formação de uma necrose úmida que circunda o caule (Figura 3) (SILVA, LOPES & MAGALHÃES, 2008). Essas lesões necróticas são recobertas por picnídios do fungo, porém a estrutura vegetativa de *P. destruens* cresce abaixo da periderme de raízes frescas. Com o avanço da doença, as ramas infectadas tornam-se enrugadas e secas e os caules morrem e ficam pretos, ocorrendo também uma decomposição seca e escura nas extremidades da raiz tuberosa da batata-doce (Figura 4). A decomposição geralmente continua a se desenvolver durante a colheita e o armazenamento (PEREIRA, FERNANDES & PINHEIRO, 2011; GAI *et al.*, 2016) e, quando a infecção é severa, a planta morre (SILVA, LOPES & MAGALHÃES, 2008).

Atualmente não existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle do mal-do-pé. O fungo *P. destruens*, causador da doença, também não está registrado no AGROFIT, o banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins, que permite consultar todos os agentes causadores de doenças e danos em culturas, registrados no Ministério da Agricultura do Brasil (<[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>, acessado em maio de 2021). Por falta de produtos específicos e de informação a respeito da doença, os agricultores acabam por utilizar fungicidas não específicos e em doses arbitrárias (como os difenoconazóis, tiabendazóis, dicarboximidas e outros) contra o *P. destruens*,

uma vez que não existe uma recomendação oficial para a aplicação de fungicidas em batata-doce (ANVISA, 2019).



**Figura 3.** Vasos com mudas de batata-doce. Em (A) planta susceptível e afetada pela doença mal-do-pé, com presença de necrose na base do caule e queda de folhas, apontado pelas setas. Em (B) uma planta saudável, resistente ao mal-do-pé. Fonte: PEREIRA *et al.* (2014).



**Figura 4.** Batata-doce, em (A) e (B), com lesão necrótica causada pelo mal-do-pé. A podridão se inicia na extremidade onde a raiz tuberosa está conectada à raiz mãe, e é firme, seca e marrom escura, podendo tomar conta de toda a raiz. Fonte: <<http://www.agronomicabr.com.br>>, acessado em abril de 2021.

O uso dos fungicidas tanto tiabendazol quanto difenoconazol apresenta risco ambiental (Muito Perigoso Ao Meio Ambiente: Classe II) e risco à saúde, conforme apresentado na Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) elaborada com base na NBR-14725, da empresa Syngenta®, que comercializa os produtos para uso na agricultura. Em humanos, ambos os produtos podem causar irritação para os olhos e intoxicação. Ainda em humanos, o difenoconazol pode prejudicar a

fertilidade ou o feto. Ambos são altamente persistentes no meio ambiente. O tiabendazol é altamente tóxico para microcrustáceos e sua decomposição térmica gera vapores tóxicos ou irritantes (disponível em: <<https://cloud.cnpgc.embrapa.br/igu/category/s12-administracao/c42-gestao/administracao/srh/fispq/campoexperimental/Tecto%20SC.pdf>> e <[https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score\\_a7402n.pdf?token=1511171921](https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score_a7402n.pdf?token=1511171921)> acessado em maio de 2021).

Assim, para combater a doença, a seleção de clones de batata-doce resistentes à doença tem se mostrado, até o presente momento, a alternativa mais segura. Para maior sucesso, essa estratégia pode ser utilizada juntamente com a seleção de partes terminais das ramas sadias, rotação de culturas e diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados (PEREIRA, FERNANDES & PINHEIRO, 2011; LOPES & MICHEREFF, 2018), minimizando a necessidade de uso e, conseqüentemente, os riscos da utilização de agrotóxicos.

Cavalcanti, Coêlho & Perez (2002) realizaram um estudo com dez genótipos de batata-doce, inoculados com o fungo *P. destruens* em condições de campo, a fim de selecionar clones resistentes à doença mal-do-pé. Dos dez genótipos avaliados, seis deles apresentaram resistência ao fungo, sugerindo a utilização destes em programas de controle da doença. Pereira e colaboradores (2014) avaliaram ao todo 40 cultivares e acessos de batata-doce da Embrapa Hortaliças, em casa de vegetação, contra o fungo *P. destruens*. Dentre eles, os autores demonstraram que quatro cultivares comerciais e cinco acessos da Embrapa eram resistentes ao mal-do-pé, mostrando a variabilidade na resistência entre os acessos e as cultivares de batata-doce avaliados. Marques e colaboradores (2018) testaram em laboratório, em casa de vegetação e em campo, diferentes genótipos de batata-doce infectados por *P. destruens* e verificaram diferenças entre os genótipos da planta quanto à resistência ao mal-do-pé e quanto à produtividade.

Apesar dos esforços em selecionar clones resistentes, outras estratégias precisam ser desenvolvidas para o combate à doença. Uma estratégia que pode ser utilizada é a aplicação de bactérias que tenham características de promoção do crescimento de plantas (PGPB, do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*), produtoras de substâncias antimicrobianas na cultura da batata-doce, utilizando-as para o controle biológico do mal-do-pé.

### 1.3. O GÊNERO *Bacillus*

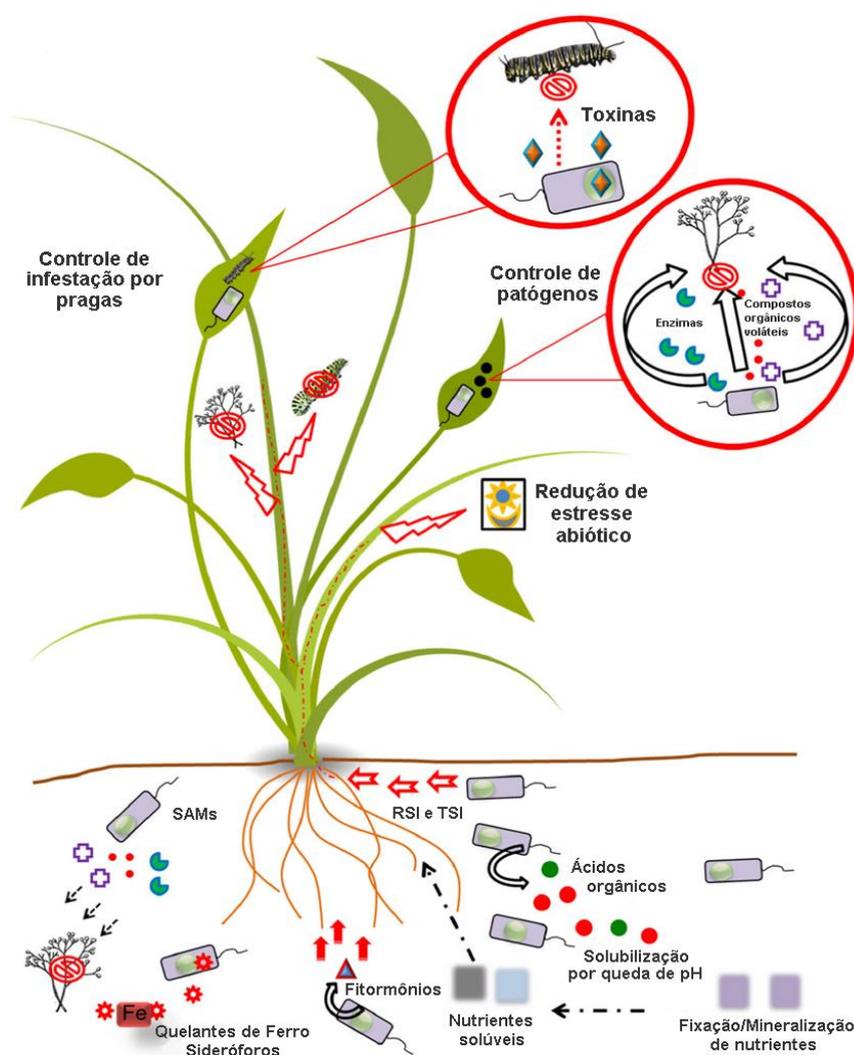
As bactérias do gênero *Bacillus* pertencem à família Bacillaceae, filo Firmicutes e são geralmente Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, formadoras de endosporos e catalase positivas (LIN *et al.*, 2015; FIRA *et al.*, 2018). Os esporos representam as formas latentes, que podem ser reconvertidos para a forma vegetativa quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis ao metabolismo bacteriano (WIEDMANN & ZHANG, 2011). Como características típicas dos membros do gênero *Bacillus* temos também o baixo teor do conteúdo G+C no DNA e a presença de menaquinona MK-7 como a principal quinona respiratória (LIN *et al.*, 2015). Há também grande variabilidade entre as diferentes espécies do gênero, quanto ao tipo de metabolismo respiratório, ao metabolismo de açúcares e à motilidade (WIEDMANN & ZHANG, 2011).

Consistem atualmente da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, (LPSN) 94 espécies validadas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Nos últimos anos (2018-2020), foram incluídas 16 espécies novas (<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>, acessado em abril de 2021).

O gênero é amplamente distribuído, sendo encontrado em uma variedade de ambientes como solo, água e ar, superfícies e rizosfera das plantas, em trato gastrointestinal de animais, bem como em muitos ambientes extremos. O gênero *Bacillus* é extremamente heterogêneo, tanto geneticamente quanto fenotipicamente. Uma das características mais importantes das espécies de *Bacillus* é o seu metabolismo secundário diversificado que lhes confere a capacidade de produção de uma grande variedade de substâncias estruturalmente diferentes, muitas delas com capacidade antagonista a outros microrganismos (FIRA *et al.*, 2018).

Entre as bactérias do gênero *Bacillus* são encontradas espécies de grande interesse na pesquisa biomédica, em aplicações industriais e, principalmente, na obtenção de produtos biotecnológicos. Como já mencionado, os membros do gênero *Bacillus* são ubíquos e abundantemente encontrados no solo e na rizosfera das plantas, estando muito bem adaptados a estes microambientes e apresentam diversas características de PGPB. Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal por *Bacillus* sp. podem ser diretos ou indiretos, consistindo em: fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização e

mineralização de fósforo, solubilização de potássio, produção de fitormônios, produção de sideróforos, produção e liberação de compostos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas, resistência sistêmica induzida (RSI) e tolerância sistêmica induzida (TSI) a estresses abióticos (SAXENA *et al.*, 2019). Por isso, diferentes espécies de *Bacillus* têm sido usadas na agricultura como alternativas muito eficientes aos fertilizantes e pesticidas químicos, especialmente devido a sua longa vida útil - comparável com a dos agroquímicos. Além disso, não são prejudiciais ao ambiente (WU *et al.*, 2015; TIWARI, PRASAD & LATA, 2019). A figura 5 apresenta um resumo de características benéficas às plantas, mediadas por *Bacillus* sp.



**Figura 5.** Características de promoção do crescimento das plantas mediadas por bactérias do gênero *Bacillus*, consistindo em: produção de substâncias antimicrobianas (SAMs), sideróforos, ácidos orgânicos, fitormônios, toxinas, enzimas e ácidos orgânicos voláteis com efeitos antimicrobianos e insetívoros; mediação de resistência sistêmica induzida (RSI) e tolerância sistêmica induzida (TSI), que ativam defesas da planta contra fitopatógenos e condições adversas. Fonte: adaptado de SAXENA *et al.* (2019).

Como já foi dito, o gênero *Bacillus* se destaca por ser produtor de uma grande variedade de metabólitos que podem inibir o crescimento e as funções de outros organismos no solo e na rizosfera, como bactérias, fungos, insetos e nematoides. Dentre esses metabólitos, a produção de substâncias antimicrobianas (SAMs) se destaca. Bactérias do gênero *Bacillus* têm sido utilizadas, com sucesso, em experimentos *in vitro* e *in vivo* no controle de fitopatógenos pela sua produção de SAMs (ISLAM *et al.*, 2016b; SAXENA *et al.*, 2019).

#### 1.4. SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS (SAMs) DE *Bacillus* E BIOCONTROLE

As SAMs que são produzidas por microrganismos geralmente são moléculas de baixo peso molecular produzidas como metabólitos secundários, principalmente por microrganismos do solo. Essas substâncias apresentam grande diversidade de estrutura química e de estrutura tridimensional, além de variações quanto à estabilidade ao calor e às mudanças de pH e temperatura. São sintetizadas por uma ampla variedade de vias, e tanto a composição genética específica das estirpes produtoras quanto as diferentes condições ambientais podem afetar sua atividade (BENITEZ, 2010; STOICA *et al.*, 2019).

Uma única célula bacteriana pode produzir mais de um tipo de metabólito secundário com ação antimicrobiana. Esses metabólitos podem ser produzidos durante a multiplicação celular ativa, na fase logarítmica tardia ou na fase estacionária inicial de crescimento do microrganismo. Quanto à função, as SAMs podem funcionar como armas químicas para matar competidores no solo, tanto como proteção (defensiva) quanto como predação (ofensiva), ou servir como moléculas sinalizadoras para bactérias do mesmo gênero/espécie, a fim de mediar interações com hospedeiros eucarióticos, como insetos e plantas (HUTCHINGS, TRUMAN & WILKINSON, 2019; STOICA *et al.*, 2019).

Vários estudos vêm, ao longo dos anos, demonstrando que os membros do gênero *Bacillus* produzem um amplo arsenal de SAMs que já foram divididas apenas em dois grandes grupos, ou classes: produzidas por via ribossomal ou não. Estudos recentes, no entanto, mostram a necessidade de novas abordagens que incluam a via de biossíntese e a bioatividade das substâncias antimicrobianas de *Bacillus*. Uma das abordagens mais modernas divide os metabólitos bioativos em: peptídeos sintetizados ribossomicamente

(RPs, do inglês *ribosomal peptides*), peptídeos não ribossomais (NRPs, do inglês *Non-ribosomal peptides*), policetídeos (PKs, do inglês *polyketides*), e compostos voláteis.

O primeiro grupo de SAMs compreende peptídeos sintetizados ribossomicamente. Nesse grupo estão incluídas as bacteriocinas e as substâncias inibidoras do tipo bacteriocina (BLIS, do inglês *bacteriocin-like inhibitory substances*). Geralmente, elas atuam no envelope celular da célula alvo. Muitas delas têm um espectro inibitório estreito, em geral limitado a bactérias intimamente relacionadas (SNYDER & WOROBO, 2014; FIRA *et al.*, 2018; STOICA *et al.*, 2019). Porém, as bacteriocinas e BLIS de *Bacillus* sp. estão se tornando cada vez mais importantes, conforme são melhor estudadas e conhecidas, devido aos seus espectros de inibição mais amplos. É sabido que elas podem inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos – microrganismos estes que podem ser patogênicos a humanos, animais e plantas (ABRIOUEL *et al.*, 2011).

Já a segunda classe de SAMs é constituída por pequenos peptídeos sintetizados enzimaticamente por vias não ribossômicas. Esses peptídeos não ribossomais (NRPs) são sintetizados pela condensação de resíduos de aminoácidos mediada por enzimas que são independentes do ribossomo, chamadas de NRPSs (do inglês *Non-ribosomal peptide synthases*). Quando as NRPSs que catalisam a síntese possuem múltiplos domínios, isso acarreta, geralmente, em NRPs com várias cadeias de ácidos graxos, conhecidos como lipopeptídeos (FIRA *et al.*, 2018; SAXENA *et al.*, 2019; STOICA *et al.*, 2019). Os peptídeos não ribossomais podem ser lineares, cíclicos e podem, ainda, apresentar estruturas ramificadas contendo um grupo hidroxila, L-aminoácidos ou D-aminoácidos. Outra característica dos NRPs é a possibilidade de modificação por N-metilação, acilação, glicosilação ou formação de anel heterocíclico (SUMI *et al.*, 2015).

Os policetídeos, terceiro grupo aqui tratado, são uma classe de produtos naturais biossintetizados por grandes blocos enzimáticos multimodulares, denominados policetídeo sintases (PKSs, do inglês *polyketide synthases*) que podem ser do tipo I, II ou III. De forma geral, as enzimas são formadas por uma sucessão de módulos de alongamento, flanqueados por módulos de iniciação e terminação que utilizam como precursor, para a síntese dos policetídeo, um dos blocos mais simples da natureza, o acetato. Além da síntese principal, muitos compostos policetídeos sofrem modificações posteriores por domínios adicionais das PKSs, que enriquecem consideravelmente sua complexidade estrutural e diversidade. A complexidade sintética de policetídeo é tão

grande que há casos em que as vias de síntese são mistas e combinam diferentes tipos de PKSs, ou podem até associar uma ou mais PKSs a NRPs para formar metabólitos híbridos de peptídeo não ribossomal com policetídeo (CAULIER *et al.*, 2019).

Existe, ainda, uma grande variedade de SAMs produzidas por *Bacillus* que não se enquadram nas três classes já citadas, por serem considerados antimicrobianos não baseados em peptídeos e que apresentam diferentes estruturas químicas (STOICA *et al.*, 2019). Os metabólitos voláteis, por exemplo, constituem uma grande família de antimicrobianos que exibem vários papéis metabólicos e funcionais (CAULIER *et al.*, 2019).

A classificação das SAMs produzidas por *Bacillus* sofreu diversas mudanças ao longo dos anos, conforme novas substâncias eram caracterizadas. Em relação às SAMs classe I, uma classificação geral para bacteriocinas e substâncias inibidoras do tipo bacteriocina (BLIS) foi organizada por Abriouel e colaboradores (2011). Em 2015, Sumi e colaboradores organizaram uma classificação para os NRPs de *Bacillus*. Mais recentemente, Caulier e colaboradores (2019) e Stoica e colaboradores (2019) também revisaram e organizaram a classificação de SAMs do gênero *Bacillus*. A Tabela 1 apresenta uma sumarização dessas classificações.

O uso de bactérias benéficas e produtoras de SAMs, como as pertencentes ao gênero *Bacillus*, vem aumentando cada vez mais. Na agricultura, elas já são vistas como uma alternativa aos pesticidas químicos na proteção de plantas (QIAO *et al.*, 2014). Um número cada vez maior de agricultores está reconhecendo a necessidade de outras alternativas para o controle de pragas e/ou doenças que não sejam tão prejudiciais ao ambiente, à terra e à saúde dos próprios agricultores (WU *et al.*, 2015).

**Tabela 1.** Classificação das SAMs produzidas por *Bacillus*. Adaptado de: ABRIOUEL *et al.*, 2011; SUMI *et al.*, 2015; CAULIER *et al.*, 2019; STOICA *et al.*, 2019.

		Característica	Exemplos	
Bacteriocinas e BLIS	Classe I	Subclasse I.1	Peptídeo único, lantibióticos lineares	Plantazolicina, Subtilina, Ericina A
		Subclasse I.2	Outros lantibióticos tipo peptídeo único	Sublancina 168, Mersacidina, Paenibacilina
		Subclasse I.3	Lantibióticos de dois componentes peptídicos	Haloduracina, Liquenicidina
		Subclasse I.4	Outros peptídeos modificados pós-tradução	Subtilosina A
	Classe II	Subclasse II.1	Peptídeos semelhantes à pediocina	Coagulina, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580
		Subclasse II.2	Peptídeos semelhantes à turicina	Turicina H, Turicina S, Turicina 17, Bacturicina F4, Cereína MRX1
		Subclasse II.3	Outros peptídeos lineares	Liquenisina Cereína 7A, Cereína 7B, Turicina 439
Classe III	-	Grandes peptídeos (>30kDa) termolábeis	Megacina A-216, Megacina A-19213	
BLIS	-	Peptídeos tipo-bacteriocinas	Brevicina AF01, Entomocina, Kenyacina, Peptídeo A12-C, SkfA	
Peptídeos não ribossomais	Lipopetídeos	Família I Iturinas e macrolactonas	Hepta-peptídeos cíclicos com ligação éster ou peptídica de um ácido graxo $\beta$ -NH <sub>2</sub> e o grupo carboxila do aminoácido C-terminal	Micosubtilina, Iturina D, Bacilomicina Lc, Subtuleno (contém uma única cadeia longa Iso C15 de $\beta$ -aminoácido)
		Família I Surfactina	Hepta-peptídeos cíclicos que formam uma ponte de lactona entre o grupo carboxila do aminoácido C-terminal e ácidos graxos $\beta$ -hidroxi	Surfactina, WH1fungina
		Família I Fengicina	Deca-peptídeos com um ácido graxo $\beta$ -hidroxi ligado por ligação peptídica ou éster ao C-terminal, que mostram propriedades incomuns, como a presença de ornitina	Fengicina, Pliplastatina, Agrastatina
	NRPs de natureza não-lipídica	Dipeptídeos, fosfo-peptídeos, polipeptídeos cíclicos e sideróforos	Bacilibactina, Bacilisina, Carotenoide	
Policetídeos	Sintetizados por PKS	Estrutura típica de carbono, sintetizados a partir de precursores de acil CoA. Estrutura base extrapolada a partir das sintases de ácidos graxos, com redução variável	Dificidina, Macrolactina, Kijanamicina, Oxidificidina	
	Sintetizados por PKS+NRPS	Estrutura híbrida e complexa	Bacileno, Zwitermicina A, kanosamina	
SAMs não baseadas em peptídeos/Metabólitos voláteis		SAMs não peptídicas, com diferentes estruturas químicas, podendo ser voláteis, orgânicas ou inorgânicas	Amicumacinas, Ácido oleico, Hetiamacin B-D, Álcool fenético, Cianeto de hidrogênio	

As bactérias do gênero *Bacillus* produtoras de SAMs, uma vez associadas às plantas, podem atuar como bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) por serem agentes de biocontrole, uma vez que a supressão dos agentes patogênicos aumenta a saúde das plantas e reduz as perdas da colheita (BORRISS, 2015; KAMILOVA *et al.*, 2015). Além desse mecanismo antagônico direto de produção de SAMs, bactérias do gênero *Bacillus* também são capazes de induzir resistência sistêmica e competição por nutrientes e espaço (colonização) (CHEN *et al.*, 2020). A soma dessas características leva ao biocontrole à base de *Bacillus* em diversas culturas.

É possível encontrar na literatura diversos relatos de estirpes de *Bacillus* produtoras de SAMs sendo utilizadas em testes tanto *in vitro* quanto *in vivo* e com diferentes plantas. Por exemplo, Kefi e colaboradores (2015) trabalharam com quatro estirpes de *Bacillus*: BL1, BT5, BR8 e BF11, todas endofíticas de tomateiro. Eles demonstraram a atividade antagonista das estirpes (de 27 a 53%) contra *Botrytis cinerea*, um fungo fitopatogênico responsável pela doença mofo cinzento em diversas culturas importantes. Além disso, quando testadas com o colete do tomateiro infectado com o fungo, as estirpes reduziram a severidade da doença de 50 a 94%. Através da análise por espectrometria de massas demonstrou-se que as estirpes produzem as SAMs: fengicina, surfactina, iturina e bacilomicina, possuindo então potencial para uso em biocontrole de doenças de plantas.

Em 2018, Chen e colaboradores mostraram que o mofo verde, uma doença pós-colheita de citros, causada por *Penicillium digitatum*, pode ser controlada por *B. amyloliquefaciens* DH-4. O fungo foi inibido *in vitro* pela estirpe DH-4, por inibição direta. Já a suspensão das células da cultura e o seu sobrenadante (filtrado da cultura) reduziram claramente a incidência de podridão dos frutos, *in vivo*. Os autores identificaram as substâncias antifúngicas macrolactina, bacilaeno, iturina, fengicina e surfactina no sobrenadante da cultura.

Tiwari e colaboradores (2010) demonstraram que uma estirpe de *B. subtilis* era capaz de promover o crescimento da planta produtora de óleo essencial - *Ocimum sanctum*, popularmente conhecida como manjeriço santo. Além do aumento no rendimento da planta (aumento do peso fresco e peso seco), a estirpe proporcionou também o aumento na produção do óleo essencial. Além disso, essa mesma estirpe mostrou-se capaz de inibir o fungo fitopatogênico *Alternaria solani*.

A estirpe HC6 de *Bacillus velezensis* é capaz de inibir dois fungos fitopatogênicos: *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., *in vitro*, além da bactéria patogênica a humanos *Listeria monocytogenes*. No experimento *in vivo*, a mesma estirpe foi aplicada em grãos de milho e também inibiu o crescimento de várias espécies dos fungos *Aspergillus* e *Fusarium*. Três tipos de lipopeptídeos antimicrobianos foram identificados no sobrenadante da cultura de *B. velezensis* HC6: iturina, fengicina e surfactina (LIU *et al.*, 2020).

Mutantes da estirpe SQR9 de *B. amyloliquefaciens* foram inoculadas por Xu e colaboradores (2014) em mudas de pepino, em casa de vegetação, a fim de verificar sua capacidade de inibir o fungo *Fusarium oxysporum*, causador da murcha do pepino. Os pesquisadores mostraram que a bactéria inibiu a doença, e atribuíram o resultado à produção de bacilomicina D e à colonização da raiz do pepino (formação de biofilme) por *B. amyloliquefaciens*.

Em relação ao controle biológico por bactérias do gênero *Bacillus* especificamente em batata-doce, duas estirpes de *Bacillus aerophilus* em consórcio com *Rhodopseudomonas faecalis* foram capazes de inibir, em experimentos *in vitro*, o fungo *Helicobasidium mompa*, causador da podridão violeta radicular ou podridão violeta da raiz da batata-doce (WEI *et al.*, 2016). Entretanto, não há relatos na literatura sobre a inibição do *Plenodomus destruens* (causador do mal-do-pé) em batata-doce.

Em relação ao uso comercial de estirpes de *Bacillus* em produtos para uso na agricultura no Brasil, a Embrapa vem obtendo sucesso em parcerias com empresas privadas para a pesquisa e lançamento no mercado interno desses inoculantes. Em 2019, em parceria com a empresa Bioma®, a Embrapa lançou o inoculante BiomaPhos®, o primeiro inoculante nacional para solubilização de fósforo, para uso nas culturas do milho e da soja. O produto foi desenvolvido com as estirpes de *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *B. megaterium* CNPMS B119 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Indicado para uso nas culturas de hortaliças e de soja, o inoculante Biotrio® é comercializado pela empresa Biotrop®. O produto contém as estirpes de *Bacillus pumilus* CCTB05, *B. subtilis* CCTB04 e *B. amyloliquefaciens* CCTB09, que potencializam o equilíbrio biológico do solo e a produtividade das culturas (disponível em: <https://biotrop.com.br/bionews-2/>, acessado em julho de 2021).

A maioria dos produtos biológicos contendo *Bacillus* comercializados no país tem como alvo as culturas economicamente mais vultosas, como a soja, o milho, a cana-de-açúcar e o feijão. Além dos exemplos já citados, a estirpe de *B. subtilis* CNPSo 2657 é utilizada como nematicida no produto Furatrop®, sendo indicado para uso nas culturas de soja, milho, feijão, cana-de-açúcar, entre outros (disponível em: <https://biotrop.com.br/produtos/biodefensivos/furatrop/>, acessado em: julho de 2021). Portanto, existe um grande gargalo de exploração, desde a produção até a comercialização, para bioinoculantes à base de *Bacillus* no país, explorando culturas com potencial para crescimento e que ainda não dispõem de produtos específicos, como é o caso da batata-doce.

Desde que o primeiro peptídeo não-ribossomal produzido por *Bacillus* foi caracterizado – a gramicidina, na década de 70, muitos outros têm sido isolados e caracterizados. Com a surgimento de poderosas ferramentas moleculares, de sequenciamento e de bioinformática, inúmeros genes e grupos de genes responsáveis pela síntese de SAMs foram identificados (BORRISS, 2015).

Um bom exemplo disso ocorreu no trabalho de Chowdhury e colaboradores (2015) com a estirpe comercial *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Os autores estudaram o genoma da bactéria e, por meio dele, descobriram que 10% do genoma da FZB42 são responsáveis pela síntese de metabólitos antimicrobianos.

Também por meio de estudos genômicos, Kumar e colaboradores (2016) encontraram genes associados à produção de substâncias antifúngicas, três diferentes lipopeptídeos e genes relacionados a características de PGPB para a estirpe RHNK22 de *B. amyloliquefaciens*.

A possibilidade de explorar os genomas bacterianos em busca de sequências codificadoras para SAMs pode levar a uma melhor compreensão de muitos mecanismos genéticos relacionados à produção desses antimicrobianos e pode auxiliar também no desenvolvimento de formulações contendo bactérias para uso no controle biológico.

## 1.5. TECNOLOGIAS PARA ESTUDOS GENÔMICOS DE *Bacillus* PRODUTORES DE SAMs

As técnicas de microbiologia clássica forneceram, ao longo dos anos, uma visão importante sobre o mundo dos microrganismos. No entanto, nos dias atuais, essas técnicas já não são utilizadas isoladamente para o estudo e a classificação de microrganismos. O estudo da ecologia microbiana independente de cultura foi impulsionado pelo desenvolvimento de tecnologias analíticas de alto rendimento, ocorrendo então uma mudança, na qual a microbiologia clássica é complementada com estudos genômicos e metagenômicos modernos. Isso exigiu o desenvolvimento e a especialização de diversos ramos de conhecimento, especialmente das tecnologias de sequenciamento, que transformaram a microbiologia e a bioinformática (FINKEL *et al.*, 2017).

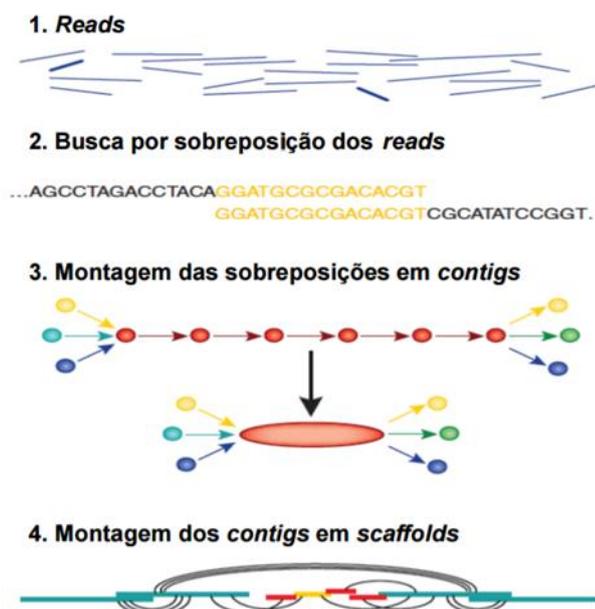
O advento das tecnologias de sequenciamento se deu no ano de 1977, quando dois grupos de pesquisa diferentes apresentaram, pela primeira vez, os resultados do desenvolvimento de métodos diferentes para determinar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA (MAXAM & GILBERT, 1977; SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977). A tecnologia de sequenciamento de Sanger passou a ser a mais usada nos anos seguintes para sequenciar o DNA. Em 1986, o método foi automatizado e foi lançado no mercado o primeiro sequenciador automático (HEATHER & CHAIN, 2016). À partir da automatização do sequenciamento de DNA foi possível a realização de grandes projetos de sequenciamento, como o genoma humano. Apesar dos avanços nesses sequenciadores, chamados de primeira geração, a determinação da sequência de DNA por meio deles produz fragmentos com um comprimento máximo de cerca de um kilobase (kb). Além disso, o processo envolve a clonagem gênica, necessita de elevado tempo de corrida e tem um alto custo por base sequenciada (RICHARDSON, 2010; HEATHER & CHAIN, 2016).

Em 2005, surgiram as plataformas de sequenciamento de segunda geração, chamadas também de NGS (*Next Generation Sequencing*), que inovaram bastante em relação ao método anterior. As primeiras NGS utilizaram um método luminescente enzimático para detectar todas as vezes que ocorria a síntese de um pirofosfato. (ESCOBAR-ZEPEDA, VERA-PONCE & SANCHEZ-FLORES, 2015).

Os sequenciadores NGS geram grande quantidade de dados em uma única corrida e uma redução considerável do tempo e custo por sequenciamento (ESCOBAR-ZEPEDA, VERA-PONCE & SANCHEZ-FLORES, 2015). Usando essa tecnologia é possível acessar a informação genética em amostras ambientais sem passar por uma etapa de clonagem de fragmentos. Esta abordagem é interessante porque permite uma análise que inclui genes funcionais e genes que funcionam como marcadores taxonômicos e filogenéticos conjuntamente, aumentando a capacidade de inferência sobre a funcionalidade microbiana nos solos e outros ambientes (FASANELLA, 2012).

Em 2010, foi lançada pela empresa *Life Technologies* a plataforma Ion Torrent PGM (*Personal Genome Machine*), que deu início à era de sequenciadores que não utilizam métodos luminosos para detecção da sequência de nucleotídeos. A plataforma possui um método de sequenciamento que utiliza chips de metal-óxido-semicondutor (CMOS) como sistema de detecção de alterações no pH, resultantes da liberação de íons de hidrogênio ( $H^+$ ). Cada vez que um nucleotídeo é adicionado na reação, ocorre a liberação de um íon hidrogênio (ROTHBERG *et al.*, 2011).

Para acompanhar o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento modernas, também foram necessários esforços para desenvolver programas (*softwares*) para montagem e anotação dos dados gerados. A montagem organiza um grande número de leituras de um DNA sequenciado (fragmentos), agrupando-as por identidade entre as bases das bordas de cada fragmento, que formam *contigs*, visando à reconstrução linear e completa do genoma alvo (HUGHES, HOUGHTEN & ASHLOCK, 2016). Atualmente, a metodologia mais empregada é a montagem *de novo*, que evita que erros presentes em um genoma de referência se repitam no genoma novo que está sendo montado (ELMETWALLY *et al.*, 2013) (Figura 6).



**Figura 6.** Etapas da montagem de genoma utilizando a metodologia *de novo*. 1. Fragmentos de DNA após o sequenciamento; 2. Procura por regiões de sobreposição entre as sequências; 3. Montagem dos *contigs* com base nas sobreposições encontradas nos *reads*; 4. Organização dos *contigs* a fim de obter *scaffolds*. Fonte: Adaptado de BAKER (2012).

Após a montagem, os dados genômicos necessitam de uma interpretação que envolve a identificação e a anotação dos elementos presentes no DNA (MÉDIGUE & MOSZER, 2007). A anotação pode ser feita de forma automática ou manual. Para o genoma de bactérias, a anotação é um processo bastante trabalhoso e demorado quando executado pelo método manual. Assim, geralmente é realizado por método automático (KREMER *et al.*, 2016). Quando a anotação é realizada, os elementos estruturais do genoma são colocados em um contexto biológico, e são obtidas relações entre as proteínas, interações entre reguladores e/ou vias metabólicas (MÉDIGUE & MOSZER, 2007).

A disponibilidade das tecnologias modernas de sequenciamento de alto rendimento acelerou impressionantemente a pesquisa na ciência biológica durante os últimos anos, em diversos campos da biologia, sendo que os avanços mais significativos foram na caracterização e monitoramento da biodiversidade microbiana. (ARRIBAS *et al.*, 2021). Esses avanços permitiram aos pesquisadores obter *insights* mais profundos sobre os mecanismos moleculares e genéticos das atividades de promoção de crescimento

de plantas realizadas pelas PGPB, assim como comparar genomas inteiros a sequências e padrões globais disponíveis em bancos de dados (REVA *et al.*, 2020).

Utilizando a tecnologia de sequenciamento de larga escala, Valenzuela-Ruiz e colaboradores (2019) conseguiram mostrar que o genoma da estirpe TRQ65 de *B. paralicheniformis* contém sequências codificantes para genes envolvidos em tolerância a fatores abióticos em agrossistemas (condições de estresse oxidativo e hídrico), genes envolvidos em controle biológico de fitopatógenos (lipopeptídeos e biossíntese de antibióticos), e genes envolvidos na promoção do crescimento da planta (biossíntese de auxina).

Outra estirpe de *B. velezensis*, EB14, endofítica de uma planta híbrida de bálsamo e álamo, foi utilizada nos estudos de Sachin e colaboradores (2021). Neste caso, após o sequenciamento e montagem do genoma, os autores utilizaram o software antiSMASH para prever metabólitos secundários. Eles encontraram agrupamentos de genes que codificam para a síntese de substâncias das classes da surfactina, rizoactina, bacilibactina, fengicina, bacileno, difucidina, macrolactina e bacilisina.

Uma busca por compostos bioativos também foi realizada utilizando a estirpe de *Bacillus siamensis* JFL15. Após a análise do genoma utilizando o software antiSMASH, os autores encontraram três grupos de genes envolvidos na biossíntese de NRPs: surfactina (genes *srf*), bacilibactina (genes *dhb*) e fengicina (genes *fen*). Além disso, também foram encontradas regiões codificantes para o policetídeo da classe do bacileno e para as bacteriocinas plantazolicina e butirósina (XU *et al.*, 2018).

Grady e colaboradores (2019) também utilizaram o sequenciamento de genoma completo, neste caso da estirpe de *B. velezensis* 9D-6, para investigar metabólitos envolvidos em mecanismos de biocontrole. Os autores encontraram treze grupos de genes envolvidos na produção de antimicrobianos e, dentre estes, dois agrupamentos codificantes incomuns em *Bacillus*: um para *ladderane* (sem tradução) e um para lantipeptídeo, o que mostra que mesmo entre espécies bacterianas já bastante exploradas em estudos anteriores é possível encontrar novos produtos bioativos.

## 2. HISTÓRICO PRÉVIO DO PRESENTE TRABALHO

O grupo de trabalho do Laboratório de Genética Microbiana, liderado pela Professora Lucy Seldin, vem desenvolvendo desde 2011 um projeto em colaboração com membros da Universidade Federal do Sergipe (UFS) utilizando-se diferentes genótipos de batata-doce, dentre eles o genótipo IPB-149 da cultivar comercial Ourinho, plantados no campo na Fazenda Experimental "Campus Rural da UFS". Marques e colaboradores (2015) isolaram 93 estirpes bacterianas endofíticas das raízes tuberosas dos diferentes genótipos de batata-doce. As estirpes foram então testadas quanto a diversas características de PGPB.

A doença mal-do-pé sempre afetou a produção de batata-doce na região nordeste e, por isso, testamos as bactérias isoladas contra o fungo causador do mal-do-pé, o *P. destruens*. Os testes preliminares indicaram que 10 estirpes endofíticas isoladas foram capazes de inibir o fungo em experimentos *in vitro*. A identificação taxonômica inicial dessas 10 estirpes mostrou que todas elas pertenciam ao gênero *Bacillus*. Dessas, 2 estirpes (T149-19 e T052-76) apresentaram os maiores halos de inibição contra o fungo e foram escolhidas para o nosso estudo aqui apresentado. Elas foram então testadas contra outros fungos e caracterizadas fenotipicamente através de: construção de curvas de crescimento, determinação do ótimo de produção das SAMs, do perfil de sensibilidade ou resistência a antimicrobianos, do perfil de utilização de carboidratos e da capacidade de emulsificar o hexadecano (um teste que é indicativo da produção de surfactina). Além disso, as bactérias foram utilizadas em um experimento em casa de vegetação, inoculando-as em vasos contendo solo e mudas de batata-doce, com a finalidade de verificar sua permanência nos vasos ao longo do tempo e determinar a influência da inoculação das referidas estirpes de *Bacillus* sobre a comunidade microbiana indígena (LACERDA, 2016; MATEUS *et al.*, 2019). No entanto, algumas questões não foram esclarecidas com os trabalhos anteriores, como por exemplo, se as estirpes bacterianas seriam capazes de inibir ou mitigar os efeitos da doença mal-do-pé *in vivo* e qual seria a(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida(s) por cada uma das bactérias, o que levou à realização do presente trabalho.

Resumidamente, as estirpes T149-19 e T052-76 apresentaram como características principais: (i) capacidade de inibir vários fungos fitopatogênicos, (ii) sensibilidade a diferentes antimicrobianos, (iii) facilidade de adaptação na rizosfera da

batata-doce e permanência no solo por um longo período de tempo (até 180 dias em contato com a planta) e (iv) a característica de não alterar significativamente as comunidades microbianas indígenas. Baseando-se nesses resultados promissores, os estudos que ora serão apresentados vêm contribuir para um maior conhecimento do aporte genético e metabólico das duas estirpes de *Bacillus* selecionadas, através do sequenciamento de seus genomas, e do papel das bactérias inoculadas na batata-doce, com a presença do fungo fitopatogênico *P. destruens* em experimentos em vasos.

### 3. JUSTIFICATIVA

O mal-do-pé vem acarretando perdas produtivas para o cultivo de batata-doce no Brasil que chegam, em média, a 80% da produção. O problema é agravado pela falta de cultivares totalmente resistentes no mercado e, principalmente, pela dificuldade em combater o patógeno, que forma esporos e pode permanecer, por longos períodos, tanto no solo quanto nas ramas utilizadas para replantio, de forma assintomática. Não existe no mercado um composto específico para combater o fungo causador do mal-do-pé, *Plenodomus destruens*. Os demais métodos de controle da doença, que consistem em replantio de ramas saudáveis e rotação de culturas, não garantem eficácia total uma vez que os esporos do fungo são reprodutivos e podem permanecer viáveis no solo e até mesmo nas plantas aparentemente saudáveis.

Atualmente, diversas bactérias do gênero *Bacillus* vêm sendo empregadas na agricultura para promover o crescimento das plantas e como controle biológico de pragas e doenças, tanto em casa de vegetação, como em campo. Esse tipo de estratégia é interessante porque possui muito mais especificidade para o patógeno a ser combatido. Além disso, por dispensar ou diminuir o uso de agrotóxico, o controle biológico é mais seguro para o trabalhador do campo, para o meio ambiente e para os consumidores, tornando a agricultura mais sustentável.

Os estudos preliminares com as estirpes T052-76 e T149-19 mostraram que ambas possuem potencial para uso como agentes de controle biológico, tanto por características de seu metabolismo, que favorecem sua adaptação e permanência na rizosfera da batata-doce por até 180 dias, como por não influenciarem significativamente as comunidades microbianas indígenas da planta. No entanto, nenhum experimento tinha sido realizado

ainda utilizando simultaneamente as bactérias, o fungo e a planta, a fim de saber se as bactérias seriam também capazes de combater o fitopatógeno *in vivo*, na rizosfera na planta, e impedir o aparecimento de sintomas (que indicariam o estabelecimento da doença). Além disso, o uso de uma abordagem que estuda o genoma das bactérias permitirá conhecer os genes envolvidos na produção das substâncias antimicrobianas que podem estar inibindo o fungo, abrindo caminho para futuros estudos especificamente com essas substâncias.

#### 4. OBJETIVOS

- (i) Sequenciar o genoma total das estirpes de *B. safensis* T052-76 e *B. velezensis* T149-19 utilizadas no estudo utilizando tecnologia NGS;
- (ii) Inocular as duas estirpes T052-76 e T149-19 e o fungo *P. destruens* em vasos contendo solo e mudas de batata-doce, em casa de vegetação, com a finalidade de avaliar se a introdução das bactérias inibe ou mitiga a doença causada pelo fungo *P. destruens*, tanto visualmente, analisando os sintomas da doença, como por análise molecular;
- (iii) Determinar a influência das bactérias inoculadas sobre a comunidade microbiana (bactérias e fungos) da rizosfera da planta.

##### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o sequenciamento e a montagem do genoma das estirpes *B. safensis* T052-76 e *B. velezensis* T149-19;
- Identificar as prováveis regiões codificadoras de substâncias antimicrobianas no genoma das estirpes T052-76 e T149-19;

- Realizar experimentos *in vivo*, em casa de vegetação, inoculando mudas de batata-doce com o fungo fitopatogênico *P. destruens* e com as duas estirpes bacterianas (individualmente ou em consórcio) antes e depois da inoculação do fungo;
- Determinar o possível controle do mal-do-pé nas mudas de batata-doce através da observação de aparecimento ou não de sintomas associados à doença, ao final do experimento;
- Determinar o possível controle do mal-do-pé nas mudas de batata-doce através de comparação da abundância de fungos antes e depois das inoculações, utilizando PCR quantitativo em tempo real;
- Realizar análises moleculares, utilizando DGGE e, com as matrizes obtidas, realizar análises estatísticas e gerar gráficos (PCoA e NMDS) que auxiliem na determinação da influência das estirpes bacterianas inoculadas nas mudas de batata-doce sobre a comunidade microbiana da rizosfera da planta nos experimentos em vasos.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. ESTIRPES BACTERIANAS

As duas estirpes de *Bacillus* isoladas previamente de batata-doce (MARQUES *et al.*, 2015), cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o nº AF4C383, e que foram utilizadas no presente estudo foram estocadas em meio Trypticase Soy Broth (TSB) (Anexo 9.1) contendo 20% de glicerol e conservadas a -80°C. O mesmo meio foi utilizado para seu crescimento a 32°C por 24 h. Quando necessário, foi adicionado 1,5% de ágar ao meio TSB (TSA) (Anexo 9.1).

## 5.2. FUNGO

O fungo aqui utilizado foi isolado de mudas doentes de batata-doce coletadas na região de Sergipe, identificado como pertencente à espécie *Plenodomus destruens* pela pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Dra. Viviane Talamine, e gentilmente cedido para este estudo. O fungo foi mantido em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Anexo 9.1), em temperatura ambiente.

## 5.3. CRESCIMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS E EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a obtenção do DNA genômico, as duas estirpes foram crescidas em 5 ml de meio TSB por 24 h a 32°C. A partir de cada um desses cultivos, 2 ml foram inoculados em 60ml de meio TSB que foi incubado nas mesmas condições. A cultura crescida foi centrifugada à temperatura ambiente a 8.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga Sorvall™ RC-5B. O precipitado formado foi ressuspensão em 20 ml de tampão TE 1X (Anexo 9.2), com o auxílio de um vórtex, e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado formado na nova centrifugação foi ressuspensão em 4 ml de tampão de lise (SELDIN & DUBNAU, 1985). Foram adicionados 400 µl de solução de lisozima (10 mg/ml) e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 400 µl de SDS a 10% e, após agitação manual, foi feita nova incubação a 37°C por 10 minutos. Foram então adicionados 20 µl de RNase A (10mg/ml) e incubado a 37°C por 10 minutos. Foram adicionados 440 µl de pronase (10mg/ml) e novamente incubado a 37°C por 2 horas. A partir desta última incubação, a extração foi realizada com o kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research Corp., Irvine, CA, EUA - D6005).

Após a extração, o DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, a 60V por 3 h, para verificar sua integridade. Para isso foram aplicados 2 µl do DNA extraído e comparado com 2 µl de MassRuler™ High Range DNA Ladder, da Thermo Fisher Scientific™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Além disso, a concentração do DNA obtido foi determinada através do Qubit® (Thermo Scientific) e do NanoDrop® (Thermo Scientific).

Para verificar se não ocorreu contaminação por outro microrganismo durante o crescimento e a extração do DNA, foram realizadas reações de PCR utilizando-se os iniciadores universais pA e pH (MASSOL-DEYA *et al.*, 1995) (Anexo 9.3). Cada reação foi realizada em um volume final de 50 µl em um tubo contendo tampão de PCR 5X da Promega® na concentração de 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de dNTP, 1 µM de cada iniciador, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, 1µl (50 a 100 ng) de DNA e água MilliQ estéril q.s.q. 50 µl. O ciclo aplicado foi: 1X (2 min a 94°C); 35X (1 min e 10seg a 94°C; 30 seg a 48°C; 2 min e 10 seg a 72°C); 1X (2 min a 72°C); 4°C.

Os produtos gerados pela reação de PCR foram sequenciados através do sistema ABI Prism 3100 automatic sequencer na empresa MACROGEN (Coréia do Sul) e o eletroferograma de Sanger foi analisado para se ter certeza de que o DNA era proveniente de uma única estirpe bacteriana.

#### 5.4. SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA

O sequenciamento do genoma das duas estirpes bacterianas do estudo (*Bacillus velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76) foi realizado em parceria com o grupo do Professor Artur Luiz da Costa da Silva da Universidade Federal do Pará. A plataforma utilizada foi Ion Torrent PGM System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

##### 5.4.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PARA O SEQUENCIAMENTO

A preparação da biblioteca das estirpes de *Bacillus* para o sequenciamento foi feita utilizando o protocolo da ION Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation (Life Technologies), e utilizando o kit ION Xpress™ Plus Fragment Library. O DNA foi fragmentado com o uso da enzima ION Shear Enzyme Mix II, que gerou fragmentos de aproximadamente 400 pb. Os fragmentos gerados foram purificados com o kit Agencourt AMPure XP reagent (Beckman Coulter Life Sciences, IN, EUA). Após a purificação, os fragmentos foram depositados em um chip de 318v2 utilizando os procedimentos do protocolo ION PGM™ Sequencing 400 kit e o sequenciamento foi realizado através da plataforma Ion Torrent PGM™.

## 5.5. MONTAGEM DO GENOMA

Para avaliar inicialmente os dados brutos gerados foi utilizado o *software* FastQC (<<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>>). Em seguida, foi realizada a montagem *de novo* do genoma utilizando o montador SPAdes versão 3.10. (BANKEVICH *et al.*, 2012). Os parâmetros de trimagem, filtragem e montagem utilizados para as duas estirpes foram: -phread 33; -q 20 e -p 80. Os *contigs* gerados através do SPAdes foram utilizados como entrada para os *softwares* de anotação.

## 5.6. ANOTAÇÃO FUNCIONAL

O genoma foi anotado em duas etapas, sendo uma etapa automática e uma etapa de curadoria manual. Para a etapa de anotação automática foram utilizados três sistemas:

(i). a ferramenta PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) que está disponível no NCBI, para obtenção do número de acesso;

(ii). o *software* antiSMASH (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) Versão 5.0 (BLIN *et al.*, 2019), para definir quais regiões dos genomas estariam associadas à produção de metabólitos secundários, dentre eles, substâncias antimicrobianas;

(iii). o sistema web RAST clássico com correção de erros automática e correção de *frameshifts* RAST (AZIZ *et al.*, 2008; OBERBREEK *et al.*, 2014), cujo arquivo de entrada foram as regiões já anotadas por meio do antiSMASH, com a finalidade de confirmar a anotação e de obter os nomes dos produtos gerados por cada gene anotado e o número EC (do inglês *Enzyme Commission Numbers*) das enzimas, padronizando assim as nomenclaturas de maneira universal.

A segunda etapa foi feita por meio de uma curadoria manual utilizando como entrada os arquivos ‘gbk’, gerados na primeira etapa com as anotações obtidas por meio dos *softwares* antiSMASH e RAST, empregando, para a comparação, a ferramenta Artemis (RUTHERFORD *et al.*, 2000). Além disso, foram usados bancos de dados como: UniProt (<<http://www.uniprot.org/>>), que ajuda a identificar a sigla e a sequência de

nucleotídeos dos genes e o algoritmo Blastp (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>) para confirmar algumas sequências codificantes de proteínas.

## 5.7. MONTAGEM DO EXPERIMENTO EM VASOS

O experimento em vasos foi realizado em casa de vegetação, na Universidade Federal de Sergipe (UFS), em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Gagliardi. O genótipo de batata-doce utilizado nos experimentos foi o IPB-149 - “Ourinho”, o mesmo genótipo utilizado nos experimentos anteriores. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições (vasos) para cada tratamento (Figura 7). Os tratamentos foram delineados com o objetivo de determinar se as bactérias seriam capazes de: (i) proteger a planta da doença - inoculando as bactérias antes (60 dias após o plantio = DAP) e o fungo depois (120 DAP); e/ou (ii) de mitigar os sintomas do mal-do-pé - inoculando o fungo antes (60 DAP) e as bactérias depois (120 DAP). Sete grupos de vasos foram então avaliados como listados a seguir:

- 1 – controle da doença - batata-doce e o fungo *P. destruens*;
- 2 – batata-doce inoculada com a estirpe T149-19 e depois com *P. destruens*;
- 3 – batata-doce inoculada com a estirpe T052-76 e depois com *P. destruens*;
- 4 – batata-doce inoculada com as estirpes T052-76 + T149-19 e depois com *P. destruens*;
- 5 – batata-doce inoculada com *P. destruens* e depois com a estirpe T149-19;
- 6 – batata-doce inoculada com *P. destruens* e depois com a estirpe T052-76;
- 7 – batata-doce inoculada com *P. destruens* e depois com as estirpes T149-19 + T052-76.



**Figura 7.** Esquema dos vasos onde as mudas foram plantadas: em (A) representado cada um dos sete tratamentos (incluindo o grupo controle) que foram realizados em quadruplicata e (B) as dimensões dos vasos utilizados.

Para a simplificação das legendas e do texto, os tratamentos serão tratados, daqui até o final deste trabalho, de acordo com os códigos a seguir onde T representa cada um dos tratamentos de 1 a 7, F representa o inóculo com o fungo *P. destruens*, 19 representa o inóculo com a bactéria *B. velezensis* T149-19 e 76 com a bactéria *B. safensis* T052-76. A posição da letra F (antes ou depois dos números) indica o momento da inoculação do fungo (antes ou depois das bactérias).

**T1** = Controle (F)

**T2** = 19 + F

**T3** = 76 + F

**T4** = 19 + 76 + F

**T5** = F + 19

**T6** = F + 76

**T7** = F + 19 + 76

As mudas de batata-doce (ramas) foram plantadas em vasos de 1L contendo uma mistura de 85% de subsolo do cerrado peneirado, 5% de casca de arroz seca e 10% de casca de arroz carbonizada, enriquecido com mais 100g de calcário dolomítico, 200 g de superfosfato simples e 60 g de sulfato de amônio para cada 100 L de substrato. Estas mudas foram mantidas em casa de vegetação (25°C +/- 2°C) durante todo o período experimental (180 dias). A irrigação foi feita com um microaspersor preso ao teto, em intervalos de 48 horas.

Para a inoculação, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por 40 dias. Em seguida, 15 ml de água destilada foram adicionados às placas e, 20 minutos após, a suspensão foi obtida mediante filtragem em gaze. Após homogeneização da suspensão, a concentração foi ajustada para  $4,0 \times 10^6$  conídios/ml. Foi então feita uma incisão, com o auxílio de um bisturi estéril, no caule de cada uma das plantas, próximo à região do coleto e, nesta incisão, foi realizada a inoculação da suspensão de conídios (adaptado de PEREIRA *et al.*, 2014).

Para a inoculação das bactérias, foi feito um sulco de aproximadamente 2 cm de profundidade em torno do caule da planta, onde foram inoculadas  $10^6$  células/g de solo

em 2 ml de salina estéril. Para isso, as bactérias foram previamente crescidas em meio TSB, por 24h a 32°C e lavadas duas vezes com salina estéril (NaCl 0,85%), através de centrifugação (10.000 rpm por 15min, em centrífuga Sorvall™ RC-5B). Ao final, as células lavadas foram ressuspensas em solução salina estéril, ajustando a concentração para 10<sup>6</sup> UFC/g de solo, conforme previamente definido (LACERDA, 2016; MATEUS *et al.*, 2019).

Nos vasos controle, foram adicionados o mesmo volume de salina estéril que nos vasos inoculados. A incidência da doença mal-do-pé foi avaliada pelo Prof. Dr. Paulo Gagliardi, ao longo do experimento, até alcançar 180 DPA. Foi feita uma amostragem de raiz e solo rizosférico de cada um dos tratamentos ao final do experimento, e as amostras foram mantidas refrigeradas até seu envio e chegada no Laboratório de Genética Microbiana para processamento e extração do DNA.

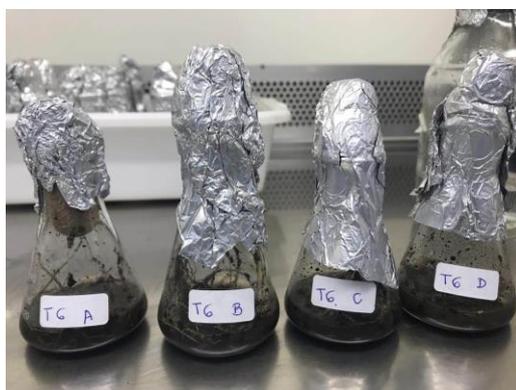
## 5.8. ANÁLISE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E DE DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

A saúde das plantas foi analisada ao final do experimento, após 180 DAP (correspondendo a 60 dias após o último inóculo – seja ele fúngico ou bacteriano). As plantas controle que foram inoculadas uma única vez com *P. destruens*, só foram avaliadas após 120 DAP. Os cinco parâmetros utilizados pelo fitopatologista nas análises foram: presença de sintomas da doença (como escurecimento da haste na região do colo da planta, com conseqüente amarelecimento e/ou queda das folhas e morte do ramo), sobrevivência das plantas, comprimento das plantas, presença de broto adjacente no caule das plantas (rebrotas) e número de folhas.

## 5.9. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE RIZOSFERA

As coletas foram realizadas abrindo sulcos no solo, em quatro pontos equidistantes e ao redor do caule da muda de cada vaso. Com auxílio de espátulas estéreis e luvas desinfetadas com álcool 70%, foram coletados 4 a 6g de raízes absorventes com o solo

aderido (para obtenção da rizosfera). As amostras de raiz e solo rizosférico (solo aderido às raízes) dos sete tratamentos foram acondicionadas em Erlenmeyers de 250ml estéreis (Figura 8), onde foram adicionados 10ml de salina estéril (0,85%) em cada recipiente, e incubados sob agitação (100 rpm), a 28°C por 1h. As raízes foram então separadas do restante do lavado com o auxílio de uma pinça estéril. Alíquotas de 500 mg das amostras do lavado (contendo solo rizosférico, mas sem as raízes) foram retiradas e pesadas assepticamente e utilizadas para a extração do DNA total através do método de lise direta, seguindo o protocolo do fabricante do kit comercial DNeasy PowerSoil (Qiagen®, Hilden, Alemanha).



**Figura 8.** Fotografia mostrando as raízes coletadas com solo aderido. As amostras foram misturadas com salina estéril 0,85% para agitação e liberação do solo aderido. Após agitação, as raízes foram retiradas e somente o solo rizosférico foi utilizado para a extração do DNA.

#### 5.10. ANÁLISE DAS COMUNIDADES MICROBIANAS ATRAVÉS DE PCR-DGGE

Para determinar a influência das bactérias inoculadas sobre a comunidade microbiana da rizosfera da planta nos diferentes tratamentos (T1 a T7), as amostras do solo rizosférico foram analisadas utilizando a técnica de PCR-DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante). Para isso, foram utilizados iniciadores específicos para a comunidade bacteriana (gene *rrs*) e também para a comunidade fúngica (região ITS – do inglês *Internal Transcribed Spacer*).

As reações de amplificação de parte do gene *rrs* da comunidade bacteriana total foram realizadas com os iniciadores U968F e L1401R (Anexo 9.3) (NÜBEL *et al.*, 1996). O iniciador U968F foi acrescido de um grampo rico em nucleotídeos GC, como descrito

por MUYZER, DE WAAL & UITTERLINDEN (1993), para ser utilizado na DGGE. Cada reação foi realizada em um volume final de 25 µl em tubo contendo uma mistura de 5 µl do tampão de PCR 5x da Promega®, 3,75 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0,2 µl 10mM de cada dNTP, 0,5 µl 10nM de cada iniciador, 0,2 µl da enzima *Taq* DNA polimerase, 1 µl de DNA e água Milli-Q estéril q.s.p 25 µl. O ciclo aplicado foi 1x (2 min 94°C); 30x (1 min 94°C; 1 min 55°C; 2 min 72°C); 1x (10 min 72°C); 4°C.

Para a avaliação da estrutura da comunidade fúngica total foram utilizados os pares de iniciadores EF4F/ITS4R e ITS1F GC/ITS2R (Anexo 9.3). Um grampo rico em nucleotídeos CG foi adicionado à extremidade 5' do iniciador ITS1F, como descrito por MUYZER, DE WAAL & UITTERLINDEN (1993). A primeira reação de PCR foi realizada usando os iniciadores EF4/ITS4 (SMIT *et al.*, 1999; WHITE *et al.*, 1990, respectivamente) e a segunda reação os iniciadores ITS1f GC/ITS2 (GARDES & BRUNS, 1993; WHITE *et al.*, 1990, respectivamente).

A primeira reação foi realizada em um volume de 25 µl, em tubos contendo 5 µl do tampão de PCR 5x da Promega® na concentração de 1x, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,125 µl de cada dNTP 10 mM, 0,4 µl de cada iniciador 10 µM, 0,175 µl de *Taq* DNA polimerase, 0,5 µl de albumina sérica bovina (BSA) 1% (v/v), 0,5 µl de DNA e água MilliQ estéril q.s.p. 25 µl. O produto da primeira reação (1 µl) foi usado como molde para a segunda reação de PCR contendo os mesmos reagentes em proporções iguais, exceto pelo uso do segundo par de iniciadores, e pela substituição do BSA por 0,5 µl de formamida e água MilliQ estéril q.s.p. 25 µl. O ciclo aplicado foi: 1x (5 min a 94°C); 30x (30 seg a 94°C; 30 seg a 55°C (1ª reação) ou 57°C (2ª reação); 1 min e 30 seg a 72°C); 1x (5 min 72°C); 4°C. Os produtos gerados foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (1,4%) a 85 V por 90 min.

Os géis da DGGE foram realizados utilizando-se o equipamento INGENYphorU (INGENY, Leiden, NL, The Netherlands). Alíquotas dos produtos de PCR (8µl) foram misturadas com 6 µl da solução de corrida (Anexo 9.2) e esta mistura foi aplicada no gel de poliacrilamida a 8% (peso/volume) em tampão TAE (Anexo 9.2) 50x diluído contendo um gradiente desnaturante (ureia e formamida) linear. As concentrações do gradiente desnaturante foram as seguintes: 46,5-60% para a comunidade bacteriana, e 23-48% para a comunidade fúngica. Os géis foram submetidos à corrida de eletroforese nas condições de 140 V durante 17 h a 60°C, conforme descrito por Heuer e colaboradores (2001). Após

a eletroforese, os géis foram corados com 20µl de Sybr Green diluídos em 250ml de água destilada por 40 min, sob agitação, e foram então escaneados e visualizados utilizando o sistema STORM (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido). A análise do perfil de bandas gerado foi realizada utilizando-se o programa BioNumerics e a construção dos dendrogramas foi baseada no coeficiente de similaridade de DICE e no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Utilizando as matrizes quantitativas obtidas a partir desses perfis de bandas, foram gerados gráficos – N-MDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) e PCoA (Análise de Coordenadas Principais) e realizados testes estatísticos utilizando o programa Past versão 3.14 (HAMMER, HARPER & RYAN, 2001).

#### 5.11. DETERMINAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE FUNGOS NOS VASOS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS, UTILIZANDO PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

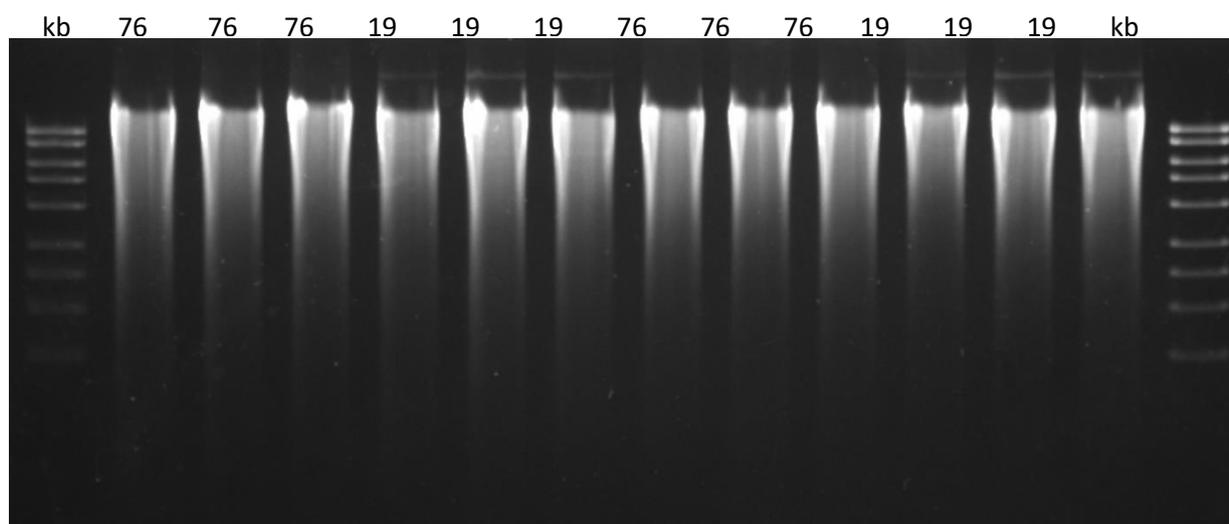
Para determinar se houve efeito protetivo contra a doença mal-do-pé após a inoculação das bactérias, foi feita uma análise quantitativa da presença do fungo nas amostras de DNA provenientes da rizosfera das plantas ao término do experimento. As análises para a quantificação da população total de fungos foram feitas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Foi realizada a quantificação absoluta em triplicata para cada uma das amostras utilizando o equipamento ABI Prism 7300 Cyler (Applied Biosystems, Alemanha) com o sistema *SYBR Green I*. Foram utilizados os iniciadores ITS 1f (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 5.8s (5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3') (FIERER *et al.*, 2005). Uma curva padrão foi construída após a clonagem do fragmento alvo em plasmídeos utilizando o kit *pGEM-T Easy* (Promega®). Após a confirmação do inserto no plasmídeo, por PCR convencional utilizando os iniciadores específicos, foram realizadas diluições seriadas (1:10) de um plasmídeo contendo um número conhecido de cópias do fragmento alvo ( $10^{10}$  cópias/µl). Os dados da amplificação do DNA extraído das amostras do experimento foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias da região ITS. Todas as reações foram realizadas segundo os autores que descreveram os iniciadores aqui listados. As condições das amplificações foram de 2 min a 50°C; 5 min a 95°C; seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg e

72°C por 1 min. A quantificação da população total de fungos das amostras provenientes dos vasos de controle da doença (inoculados apenas com o fungo) foi comparada com a quantificação da população total de fungos presente nas amostras dos vasos inoculados com as bactérias, antes ou depois do fungo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Após o crescimento das estirpes T052-76 e T149-19, cada qual tendo sido crescida em 3 frascos separados, o DNA de cada frasco foi extraído conforme descrito no item 5.3 da metodologia e dosado utilizando Qubit® e NanoDrop®. Foi observado que as amostras de DNA se encontravam na concentração necessária para o sequenciamento (aproximadamente 15 ng/μl). Além disso, o DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% a 60 V por 3 h para verificar a sua integridade (Figura 9). Foi retirada uma alíquota de cada um dos tubos de DNA para a PCR com os iniciadores universais pA e pH. Após o sequenciamento dos produtos de PCR, o eletroferograma de Sanger de cada amostra foi analisado e verificou-se que os DNAs não estavam contaminados por outros microrganismos podendo, então, serem submetidos à fase de construção da biblioteca para sequenciamento.



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose do DNA para sequenciamento. Kb representa o *MassRuler™ High Range DNA Ladder, ready-to-use*; nas canaletas onde se lê 76 foi aplicado o DNA da estirpe T052-76; e nas canaletas onde se lê 19 foi aplicado o DNA da estirpe T149-19.

## 6.2. MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *B. velezensis* T149-19 E BUSCA POR GENES RELACIONADOS À SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O sequenciamento da estirpe T149-19 gerou 1.234.656 *reads* brutos e a cobertura do genoma ficou entre 80 e 85 vezes e os *reads* gerados foram utilizados para a montagem. A montagem *de novo* foi feita utilizando o montador SPAdes e resultou em um cromossomo de aproximadamente 3.894.256 pares de bases, totalizando 75 *contigs*. O N50 (o tamanho do *contig* que, juntamente com os *contigs* maiores, contém metade da sequência de um genoma particular) dos *contigs* foi 337.604 pb, o que corresponde a 43% do genoma inteiro. O conteúdo GC foi de 46,5%. O genoma da estirpe T149-19 deste estudo foi depositado no DDBJ/EMBL/Genbank/SRA, sob os números de acesso: PGAP file n° NGUJ00000000; BioProject ID PRJNA386667; BioSample ID SAMN06761372 e SUB2674729/SRA: SRR5568584. As informações citadas acima foram reunidas abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados iniciais obtidos após o sequenciamento e a montagem do genoma da bactéria *B. velezensis* T149-19.

<i>reads</i> brutos	1.234.656
Cobertura	~ 85 vezes
cromossomo (1)	3.894.256 pb
<i>Contigs</i>	75
N50	337.604 pb
conteúdo GC	~ 46,5%

As informações obtidas na execução online do programa antiSMASH 5.0 para o genoma da estirpe T149-19 de *B. velezensis* são mostradas na tabela 3. Essas informações obtidas no software antiSMASH e comparadas com as informações de saída do sistema web RAST, juntamente com os nomes dos produtos gerados por cada gene anotado e o respectivo número EC das enzimas, foram compilados no material suplementar digital.

Os dados mostraram 17 regiões codificantes para metabólitos secundários, cujas regiões gênicas possuíam tamanhos variados (de 776.079 nt a 9.108 nt) e estão distribuídas ao longo do genoma. São mostrados também os respectivos números de acesso para a base de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene*

cluster) para cada região predita pelo antiSMASH e a localização dos genes de cada substância em seus respectivos *contigs*, dentre outras informações.

**Tabela 3.** Clusters gênicos que codificam para metabólitos secundários encontrados no genoma da estirpe *B. velezensis* T149-19 utilizando o software antiSMASH.

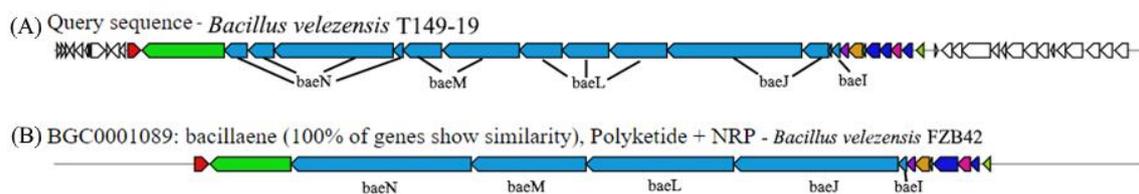
Contig e tamanho em nucleotídeos (nt)	Região	Tipo	Similar à substância	Localização dos genes da substância no contig:		MIBig ID	Similaridade
				De	Até		
Contig 1_776079	1.1	NRPS, betalactona, TransAT-PKS	Micosubtilina	1	88273	BGC0001103	100% ←
	1.2	TransAT-PKS, NRPS	Bacileno	158063	255627	BGC0001089	100% ←
	1.3	TransAT-PKS	Macrolactina	474780	563079	BGC0000181	100% ←
Contig 2_627247	2.1	Bacteriocina, NRPS	Bacilibactina	501909	553695	BGC0000309	100% ←
Contig 3_379830	3.1	NRPS	Plipastatina	1	22467	BGC0000407	30% ←
	3.2	Terpeno	s/c	87019	108902	s/c	s/c
	3.3	Policetídeo tipo III	s/c	177526	218626	s/c	s/c
Contig 4_337604	4.1	TransAT-PKS	Dificidina	303713	337604	BGC0000176	66% ←
Contig 6_219321	6.1	Terpeno	s/c	114536	134970	s/c	s/c
Contig 7_196388	7.1	Peptídio não ribossomal	Surfactina	1	25256	BGC0000433	39% ←
Contig 8_160188	8.1	Peptídio não ribossomal	Surfactina	132463	160188	BGC0000433	43% ←
Contig 9_143941	9.1	Sacarídeo	Bacilisina	96600	138018	BGC0001184	100% ←
Contig 10_140985	10.1	LAP, tiopeptídeo	Kijanamicina	70890	100002	BGC0000082	4% ←
Contig 14_59620	14.1	LAP, sacarídeo	Plantazolicina	24536	46717	BGC0000569	91% ←
Contig 24_13008	24.1	NRPS	Fengicina	1	13008	BGC0001095	20% ←
Contig 25_9205	25.1	NRPS	Fengicina	1	9205	BGC0001095	13% ←
Contig 26_9108	26.1	NRPS	Surfactina	1	9108	BGC0000433	8% ←

As setas em vermelho indicam os clusters com as classes de substâncias com potencial ação antimicrobiana e que apresentaram algum grau de similaridade com outras regiões codificantes no banco de dados e, assim, tiveram seu contexto genético analisado neste trabalho. Sem correspondência (“s/c” na tabela) corresponde a todas as regiões que foram encontradas pelo software como sendo regiões codificantes, pela presença de algum gene específico, porém não foi identificada correspondência com clusters gênicos depositados no banco de dados (Blast).

A seguir, foram realizadas análises do contexto genético das regiões que codificam para os diferentes metabólitos secundários. Para *B. velezensis* T149-19, foram exploradas as regiões preditas como codificantes para classes de substâncias que apresentaram alguma similaridade com outras substâncias no banco de dados. São elas:

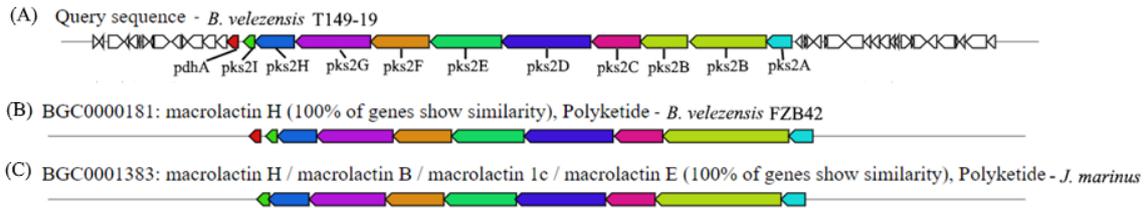


O cluster gênico relacionado à síntese da substância da classe bacileno no genoma da estirpe T149-19 apresentou um tamanho de 97.565 nt. Nesse cluster estão incluídos os genes *bae* (*I, J, L, M, N*) que fazem parte do core biossintético, codificando para as enzimas responsáveis pela síntese do policetídeo bacileno. Os genes essenciais e acessórios envolvidos na síntese do composto formam um cluster que apresentou 100% de similaridade com a região gênica da bactéria *Bacillus velezensis* FZB42. A análise do contexto genético mostrou que os genes no genoma da estirpe T149-19 que codificam para o core biossintético de bacileno, embora sejam os mesmos, possuíam tamanhos um pouco diferentes dos genes *bae* presentes na estirpe FZB42, apresentando-se segmentados e dispostos em diferentes quadros de leitura (Figura 11).



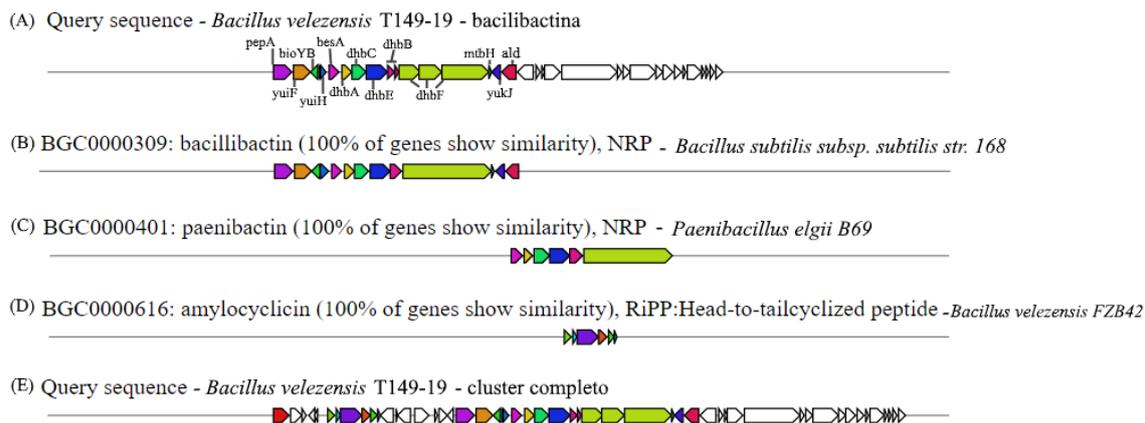
**Figura 11.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe do bacileno no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *Bacillus velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em azul claro. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

A última substância codificada no primeiro *contig* encontrado pelo antiSMASH foi da classe da macrolactina. Nesse cluster, estão incluídos os genes *pks* e *pdhA* que fazem parte do core biossintético desse composto. Esse cluster apresentou, de acordo com o banco de dados MIBig, 100% de similaridade com o cluster gênico contendo os genes *pks* da bactéria *B. velezensis* FZB42, que codifica para uma macrolactina H. Além disso, também foram encontrados no genoma da estirpe T149-19 sequências com 100% de similaridade com uma região contendo genes *mln* de *Jeotgalibacillus marinus*. Nessa espécie, as substâncias macrolactina H, B, 1c e E são codificadas por esse cluster. Quando o contexto genético do core biossintético da estirpe T149-19 foi analisado, verificou-se que o gene *pks2B* está fragmentado, enquanto no genoma das bactérias *B. velezensis* FZB42 e *J. marinus* o gene apresenta-se contínuo. Além disso, o gene *pdhA*, considerado como essencial para a produção de macrolactina nos genomas de *B. velezensis* T149-19 e FZB42, não é encontrado no cluster biossintético de *J. marinus* (Figura 12).



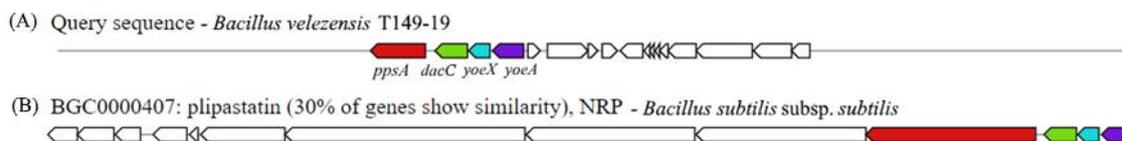
**Figura 12.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da macrolactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A), e nos genomas de *Bacillus velezensis* FZB42 para macrolactina H (B) e *Jeotgalibacillus marinus* para macrolactina H, B, 1c e E (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos três genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

O segundo *contig*, com 627.247 nt, continha um cluster biossintético de 51.787 nt que codifica uma bacteriocina como metabólito secundário, pertencente à classe da bacilibactina. Nesse cluster, estão incluídos os genes *dhb*, *yui*, entre outros, que fazem parte do core biossintético desse composto. Esse cluster gênico apresentou 100% de similaridade com uma região do genoma da bactéria *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, cujo cluster também codifica para uma bacilibactina. O cluster gênico da estirpe aqui estudada também apresentou 100% de similaridade com as regiões de clusters gênicos para outras duas classes de substâncias: paenilactina (de *Paenibacillus elgii* B69) e amilociclicina (de *B. velezensis* FZB42). Os resultados mostraram que o contexto genético dos genes relacionados à síntese de bacilibactina no genoma da estirpe T149-19 em comparação com os genes de *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 foi o mesmo, com uma única exceção: no genoma de *B. velezensis* T149-19, o gene *dhbF*, que codifica o componente F de bacilibactina e que também participa da síntese dos outros dois metabólitos, peanibactina e amiliciclicina, estava dividido em três partes (Figura 13).



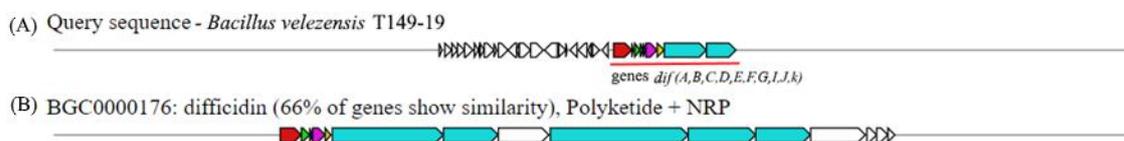
**Figura 13.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da bacilibactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 em (A), onde a região colorida, com os nomes de cada gene encontrado, apresenta 100% de similaridade com o cluster que codifica a substância bacilibactina no genoma de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168, que está representado em (B). Em (C) e (D), os clusters que codificam para as substâncias paenibactina (no genoma de *Paenibacillus elgii* B69) e amilociclicina (no genoma de *B. velezensis* FZB42), respectivamente. Em (E), o cluster completo do genoma aqui estudado, com as regiões marcadas em vermelho e azul correspondentes aos genes com 100% de similaridade com os clusters em (D) e (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em verde limão. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

No *contig* 3 (379.830 nt), foi identificado um cluster gênico que codifica para uma substância da classe da plipastatina, com tamanho de 22.467 nt. Esse agrupamento apresentou 30% de similaridade com o cluster gênico para plipastatina no genoma de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* e a ordenação dos genes nos dois clusters, quando comparados, foi a mesma. A estirpe T149-19 apresentou o gene *ppsA*, que faz parte do core biossintético de plipastatina, além de outros genes acessórios (Figura 14).



**Figura 14.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da plipastatina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. subtilis* subsp. *subtilis* (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é representado em vermelho. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

Outra região encontrada no genoma de *B. velezensis* T149-19, com um comprimento total de 337.604 nt (*contig* 4), apresentou um cluster gênico que codifica a síntese do metabólito secundário da classe da difícidina. Esse *contig*, cujo cluster gênico apresentou um tamanho de 33.892 nt, continha os genes *dif A, B, C, D, E, F, G, I, J* e *K* no genoma da estirpe T149-19. O cluster apresentou 66% de similaridade com a região que codifica uma difícidina no genoma de *B. velezensis* FZB42. A comparação dos dois clusters mostrou que a ordenação gênica foi semelhante nos dois genomas, sendo que a estirpe aqui estudada não apresentou o gene *dif H*, presente no genoma usado como referência (Figura 15).



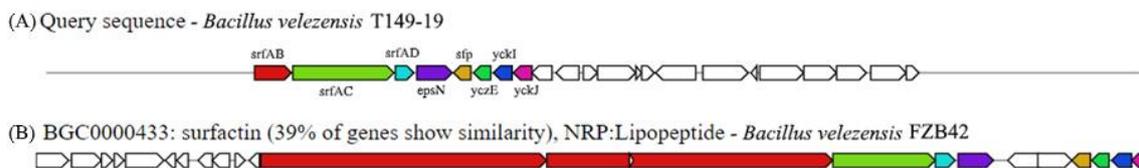
**Figura 15.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da difícidina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas cores iguais. O core biossintético da substância difícidina é aqui representado pela cor ciano. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

Dentre as regiões encontradas e escolhidas para verificação de contexto genético, estavam os clusters contendo os genes *urf*, que codificam para uma substância antimicrobiana da classe da surfactina. Esses genes estavam distribuídos em três diferentes regiões do genoma da estirpe T149-19, tendo sido identificadas pelo software antiSMASH como localizadas nos *contigs* 7, 8 e 26.

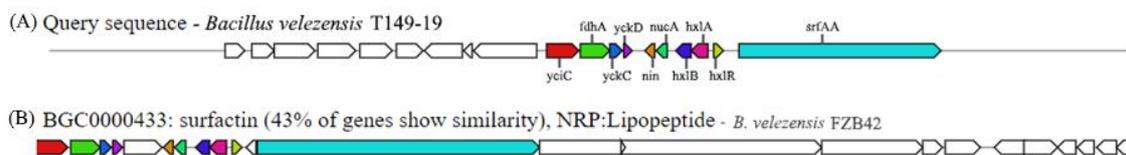
No *contig* 7 foi identificado um cluster gênico com um tamanho de 25.256 nt, que apresentou 39% de similaridade com a região gênica que codifica uma surfactina no genoma da bactéria *B. velezensis* FZB42. A análise do contexto genético mostrou que os genes para surfactina no genoma da estirpe FZB42 estavam na mesma orientação que os genes do cluster presente na estirpe aqui estudada, T149-19. Estavam presentes os genes *urfAB*, *urfAC* e *urfAD*, que fazem parte do core biossintético da surfactina, não apresentando, no entanto, o gene *urfAA* (Figura 16).

No *contig* 8 encontrou-se um cluster gênico com um tamanho de 160.188 nt, e apresentando 43% de similaridade com o cluster gênico que codifica uma surfactina na bactéria *B. velezensis* FZB42. A análise do contexto genético mostrou que os genes nos genomas das duas estirpes (T149-19 e FZB42) estavam na mesma orientação, e que o cluster gênico da estirpe T149-19 foi constituído apenas por um dos genes do core biossintético de surfactina, o gene *srfAA*, e os demais são genes acessórios (Figura 17).

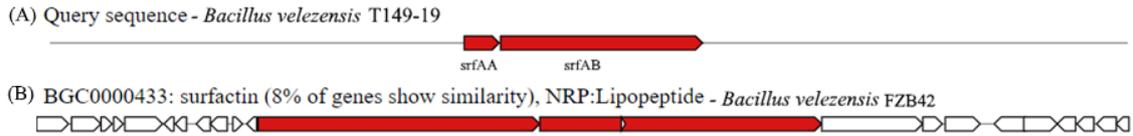
O *contig* 26 apresentou um tamanho de 9.108 nt e nele foi predito um cluster biossintético que codifica uma surfactina, com um tamanho também de 9.108 nt. Esse cluster gênico continha os genes *srfAA* e *srfAB*, que fazem parte do core biossintético dessa substância. Ele apresentou 8% de similaridade com a região que codifica surfactina no genoma de *B. velezensis* FZB42 (Figura 18).



**Figura 16.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é aqui representado pelas cores vermelha (*srfAB*), verde (*srfAC*) e ciano (*srfAD*). Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

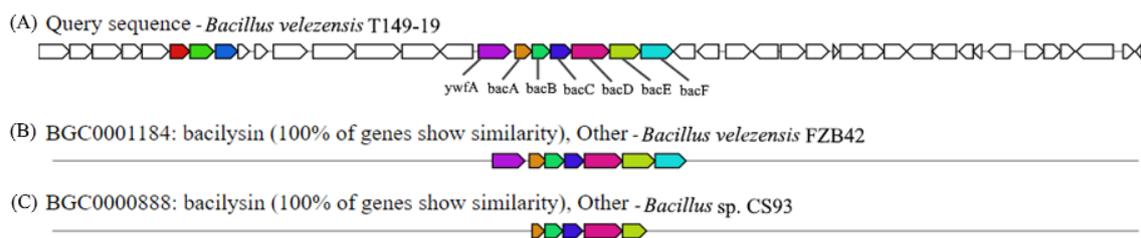


**Figura 17.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. O core biossintético é aqui representado pela cor ciano (*srfAA*). Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.



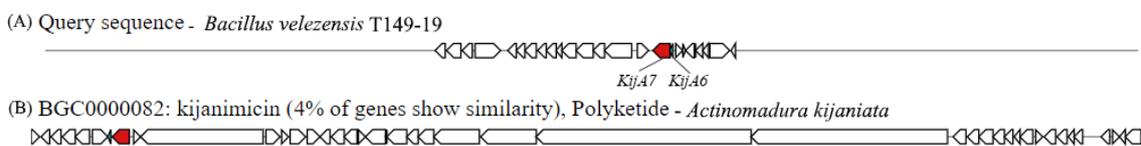
**Figura 18.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

Outra região do genoma de *B. velezensis* T149-19 - com um comprimento total de 143.941 nt (*contig* 9) - apresentou um cluster contendo o grupo de genes *bac*, que direcionam a síntese de um composto da classe da bacilisina, também com ação antimicrobiana. Esse cluster gênico relacionado à síntese de uma bacilisina em *B. velezensis* T149-19 mostrou um tamanho de 41.419 nt. Nesse cluster estavam incluídos os genes *ywfA* e *bac A, B, C, D, E* e *F*, que fazem parte do core biossintético desse composto. A região apresentou 100% de similaridade com o cluster biossintético da bactéria *B. velezensis* FZB42 e também com o cluster de *Bacillus* sp. CS93, ambos codificando para a síntese de uma bacilisina. A análise do contexto genético dos genes presentes nos clusters citados mostrou que eles se encontravam na mesma orientação e ordenação nos três genomas das bactérias comparadas. Além disso, a análise do genoma da bactéria aqui estudada, T149-19, mostrou que seu cluster gênico para bacilisina foi muito maior, apresentando genes que não estão presentes nos clusters de *B. velezensis* FZB42 e *Bacillus* sp. CS93. Estes genes representados sem cor na Figura 19 estavam relacionados a transportadores, genes biossintéticos adicionais e genes reguladores, que também poderiam estar relacionados à síntese de bacilina.



**Figura 19.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da bacilicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e nos genomas de *B. velezensis* FZB42 (B) e *Bacillus* sp. CS93 (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos três genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

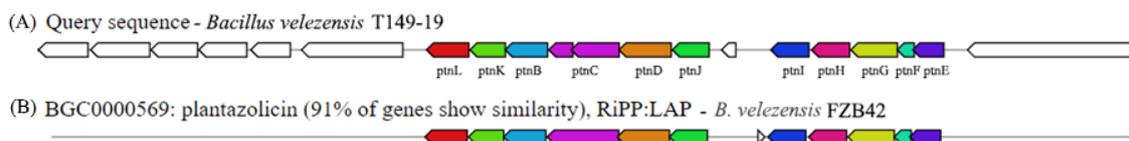
O *contig* 10 apresentou um tamanho de 140.985 nt e, nele, foi predito um cluster biossintético que codifica um thiopeptídeo da classe da kijanicina, cujo cluster biossintético apresentou um tamanho de 29.113 nt. Esse cluster gênico continha os genes *kijA7* e *kijA8* que fazem parte do core biossintético dessa substância. Ele apresentou somente 4% de similaridade com a região que codifica para kijanicina no genoma de *Actinomadura kijaniata*, um organismo do filo Actinobacteria (Figura 20).



**Figura 20.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da kijanicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *Actinomadura kijaniata* (B). Os homólogos encontrados nos dois genomas são representados pela cor vermelha. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

Outra região encontrada no genoma de *B. velezensis* T149-19 - que possuía um cluster gênico codificando a síntese de metabólito secundário - apresentou os genes *ptn*, e um comprimento total de 59.620 nt (*contig* 14). Esse *contig* continha os genes que direcionam a síntese de uma microcina da classe da plantazolicina, com ação antifúngica e nematoide. O cluster gênico relacionado à síntese de plantazolicina apresentou um tamanho de 22.182 nt. O cluster que contém os genes *ptn* apresentou 91% de similaridade com a região que codifica plantazolicina no genoma de *B. velezensis* FZB42. Nossos resultados mostraram que a organização dos genes relacionados à síntese de plantazolicina no genoma da estirpe T149-19, em comparação com os genes de *B.*

*velezensis* FZB42, diferiu apenas em um dos genes: o gene *ptnC*, que estava fragmentado em dois quadros de leitura no genoma da estirpe aqui estudada (Figura 21).



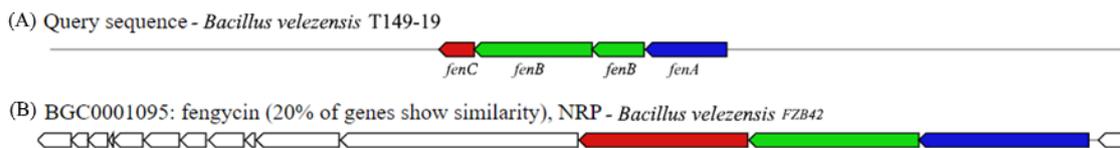
**Figura 21.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da plantazolicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

Nos *contigs* 24 e 25 (com tamanhos de 13.008 nt e 9.205 nt, respectivamente), foram identificados dois clusters pelo software antiSMASH, um em cada *contig*, com genes que codificam para um peptídeo não-ribossomal com ação antifúngica da classe da fengicina.

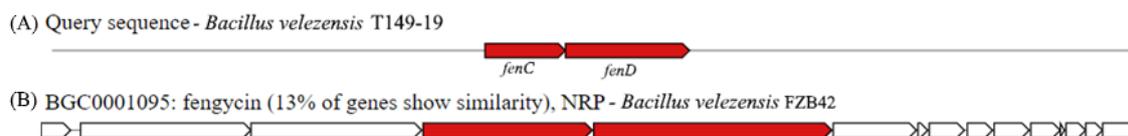
O cluster gênico que codifica para uma fengicina presente no *contig* 24 apresentou 13.008 nt. Estavam presentes os genes *fenA*, *fenB* e *fenC*, e a região apresentou 20% de similaridade com o cluster presente no genoma de *B. velezensis* FZB42, cujos genes estavam na mesma orientação do quadro de leitura. Porém, no cluster da estirpe T149-19 o gene *fenB* encontrava-se fragmentado (Figura 22).

No *contig* 25, o cluster gênico que codifica para uma fengicina apresentou 9.205 nt e continha os genes *fenC*, e *fenD*. O cluster apresentou 13% de similaridade com o cluster gênico presente no genoma de *B. velezensis* FZB42 (Figura 23).

Tanto para o *contig* 24 quanto para o *contig* 25 foi possível observar que o cluster do genoma de referência - *B. velezensis* FZB42 - apresenta outros genes que não estavam presentes nos clusters para fengicina no genoma da estirpe T149-19, o que ocasionou a baixa similaridade encontrada (20 e 13%, respectivamente).



**Figura 22.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da fengicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.



**Figura 23.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da fengicina no genoma de *B. velezensis* T149-19 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pela cor vermelha. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

No genoma de *B. velezensis* T149-19 não foram encontrados genes codificando para metabólitos secundários nos segmentos genômicos da região 5, da região 11 até a região 23 e da região 27 até a região 36.

### 6.3. MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *B. safensis* T052-76 E BUSCA POR GENES RELACIONADOS A SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O sequenciamento do genoma da estirpe T052-76 gerou 1.474.761 *reads* brutos e a cobertura ficou entre 80 e 85 vezes. Os *reads* gerados foram utilizados para a montagem do genoma. A montagem *de novo* foi feita utilizando o montador SPAdes e resultou, para a estirpe T052-76, em um cromossomo de aproximadamente 3.662.344 pares de bases, totalizando 72 *contigs*.

O N50 dos *contigs* foi 243,847 pb com um conteúdo GC de 41,7%. Essa sequência foi depositada no DDBJ/EMBL/Genbank/SRA em dezembro de 2017, sob os números de acesso: PGAP file nº NEHC00000000; BioProject ID PRJNA383335; BioSample ID

SAMN06761400; e SUB2590555/SRA: SRR5484649. As informações citadas acima foram reunidas abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultados iniciais obtidos após o sequenciamento e a montagem do genoma da bactéria *B. safensis* T052-76.

<i>reads</i> brutos	1.474.761
Cobertura	~ 85 vezes
cromossomo (1)	3.662.344 pb
<i>Contigs</i>	72
N50	243,847 pb
conteúdo GC	~ 41,7%

As informações obtidas na execução online do programa antiSMASH 5.0 para o genoma da estirpe T052-76 de *B. safensis* são mostradas na tabela 5. Essas informações obtidas no software antiSMASH e comparadas com as informações de saída do sistema web RAST, juntamente com os nomes dos produtos gerados por cada gene anotado e o respectivo número EC das enzimas, foram compilados no material suplementar digital. Os dados na tabela 5 mostram as regiões gênicas de tamanhos variados (de 511.975 nt a 9.734 nt) e distribuídas ao longo do genoma, codificando para a síntese de 13 metabólitos secundários. São mostrados também os respectivos números de acesso para a base de dados MIBiG para cada região predita pelo antiSMASH.

A seguir, foram realizadas análises do contexto genético das regiões que codificam para os diferentes metabólitos secundários. Foram exploradas as regiões preditas como codificantes para as classes de substâncias com potencial ação antimicrobiana e que apresentaram algum grau de similaridade com outras regiões codificantes no banco de dados, ou seja, com clusters gênicos já conhecidos na literatura. As classes de substâncias foram: botromicina A, bacilisina, carotenoide, zwitermicina A, fator de morte da esporulação *skfA*, liquenisina, surfactina, bacilibactina e fengicina.), totalizando 9 metabólitos secundários, distribuídos em 10 *contigs* de tamanhos variados. As regiões selecionadas para a análise estão marcadas por uma seta vermelha na tabela 5.

**Tabela 5.** Clusters gênicos que codificam para metabólitos secundários encontrados no genoma da estirpe *Bacillus safensis* T052-76 utilizando o software antiSMASH.

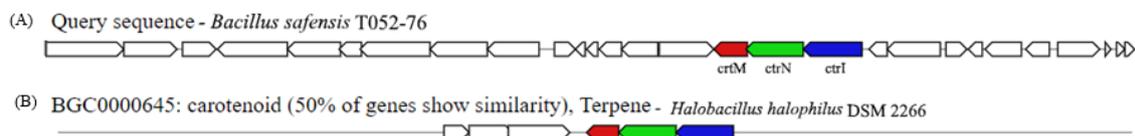
Contig e tamanho em nucleotídeos (nt)	região	Tipo	Similar à substância	Localização dos genes da substância no contig:		MIBig ID	Similaridade
				De	Até		
<i>Contig 1_511975</i>	1.1	Betalactona	Botromicina A	26315	58761	BGC0000469	6% ←
	1.2	Bacteriocina	s/c	195705	206031	s/c	s/c
<i>Contig 2_402639</i>	2.1	Sacarídeo	Bacilisina	199778	241199	BGC0001184	85% ←
<i>Contig 5_248078</i>	5.1	Terpeno/sideróforo	Carotenoide	110426	139078	BGC0000645	50% ←
<i>Contig 6_243847</i>	6.1	Policetídeo tipo I; Peptídeo não ribossomal	Zwittermicina A	62434	143384	BGC0001059	22% ←
<i>Contig 8_197021</i>	8.1	Ácido graxo/Sactipeptídeo/subtilosina-like	Fator de morte da esporulação skfA	13511	36461	BGC0000601	85% ←
	8.2	Peptídeo não ribossomal	Liquenisina	169192	197021	BGC0000381	50% ←
<i>Contig 11_114544</i>	11.1	Peptídeo não ribossomal: lipopeptídeos	Surfactina	70359	114544	BGC0000433	39% ←
<i>Contig 13_95051</i>	13.1	Policetídeo tipo III	s/c	3477	44577	s/c	s/c
	13.2	Terpeno	s/c	82953	95051	s/c	s/c
<i>Contig 14_91146</i>	14.1	Peptídeo não ribossomal	Bacilibactina	15942	65651	BGC0000309	53% ←
<i>Contig 15_79636</i>	15.1	Betalactona	Fengicina	44828	73240	BGC0001103	53% ←
<i>Contig 25_9734</i>	25.1	Peptídeo não ribossomal	Liquenisina	1	9734	BGC0000381	14% ←

As setas em vermelho indicam os clusters com as classes de substâncias com potencial ação antimicrobiana e que apresentaram algum grau de similaridade com outras regiões codificantes no banco de dados e, assim, tiveram seu contexto genético analisado neste trabalho. Sem correspondência (“s/c” na tabela) corresponde a todas as regiões que foram encontradas pelo software como sendo regiões codificantes, pela presença de algum gene específico, porém não foi identificada correspondência com clusters gênicos depositados no banco de dados (Blast).

Dentre as regiões encontradas, um cluster gênico no *contig 1* (511.975 nt) foi relacionado pelo software antiSMASH com um cluster gênico que direciona a síntese de uma betalactona da classe da botromicina A. Esse cluster apresentou um comprimento de 32.447 nt e uma similaridade de 6% com o cluster para botromicina A no genoma de *Streptomyces* sp. BC16019. Nossos resultados mostraram que o contexto genético dos genes relacionados à síntese de botromicina A com similaridade nos dois genomas foi diferente apenas na posição dos genes dentro dos respectivos clusters, mas em ambos a direção do quadro de leitura foi a mesma. Apesar da correlação estabelecida pelo software utilizado neste trabalho, os genes de *B. safensis* T052-76 que apresentaram similaridade com os genes de *Streptomyces* sp. BC16019 são relacionados a proteínas hipotéticas (Figura 24).

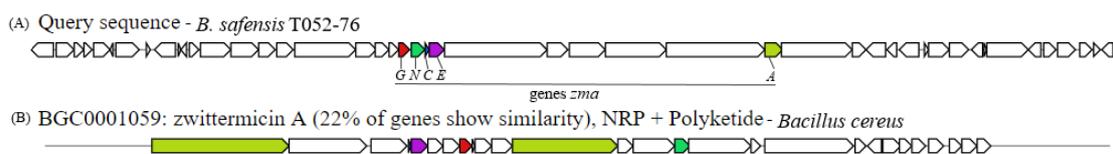


gênico da bactéria *B. safensis* T052-76 é muito maior quando comparado ao de *Halobacillus* (como mostra a Figura 26), apresentando mais genes relacionados a transportadores, genes biossintéticos adicionais, reguladores de expressão e genes acessórios.



**Figura 26.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe carotenoide no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *Halobacillus halophilus* DSM 2266 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

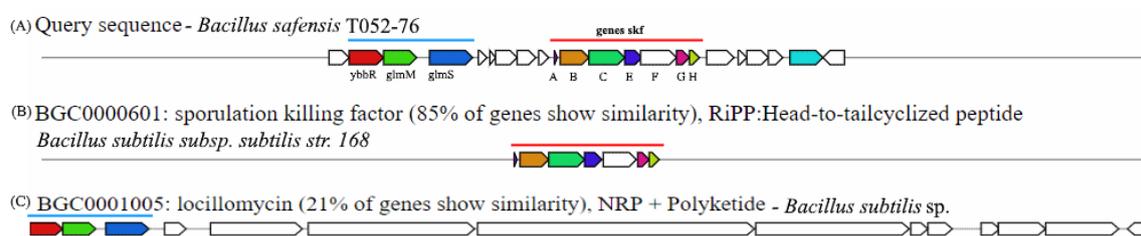
No *contig* 6 (243.847 nt) foi observado um cluster gênico com um tamanho de 80,951 nt. Essa região apresentou 22% de similaridade com o cluster gênico contendo os genes *zma* (A, C, E, G e N) da bactéria *B. cereus*, que codifica para uma substância híbrida (policetídeo + NRP) da classe da zwittermicina A. A análise do contexto genético mostrou que os genes nos genomas das duas estirpes comparadas estavam na mesma orientação, mas em posições diferentes dentro dos respectivos clusters. Além disso, o gene *zmaA* no genoma de *B. safensis* é menor que o respectivo gene no genoma de *B. cereus* (Figura 27).



**Figura 27.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da zwittermicina A no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. cereus* (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

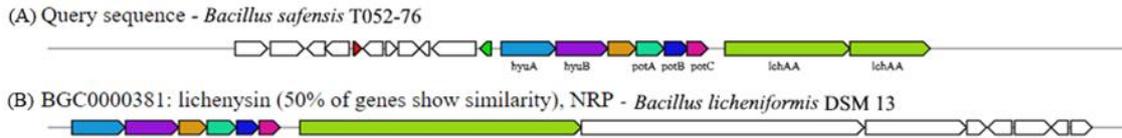
Foram encontrados, no *contig* 8 (comprimento total de 197.021 nt), dois clusters gênicos, um que direciona para a síntese de um fator *skfA*, ou fator de morte da esporulação, e outro que direciona para a síntese de uma substância da classe da liquenisina. O cluster gênico relacionado à síntese do metabólito fator de morte de

esporulação no genoma da estirpe T052-76 possui um tamanho de 22.951 nt. Nesse cluster estão incluídos os genes *skf* (*A*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G* e *H*) que fazem parte do core biossintético da substância. O cluster da estirpe T052-76 apresentou 85% de similaridade com o cluster da bactéria *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168. Além disso, estavam presentes no mesmo cluster biossintético os genes *ybbR*, *glmM* e *glmS*, relacionados à síntese de uma substância antimicrobiana da classe da locilomicina. Esse agrupamento apresentou 21% de similaridade com o cluster para locilomicina da bactéria *B. subtilis* sp. A análise do contexto genético mostrou que os genes no genoma das três bactérias se encontravam na mesma ordem e direção (Figura 28).



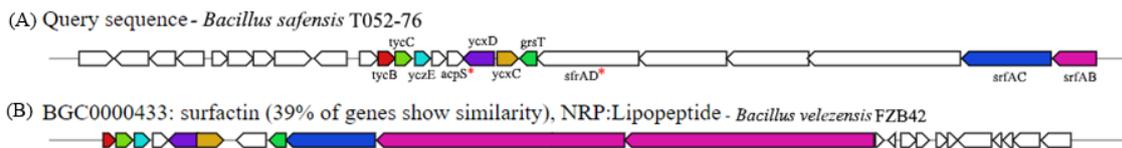
**Figura 28.** Cluster biossintético que codifica para um metabólito do tipo fator de morte da esporulação (fator *skfA* e locilomicina no genoma de *B. safensis* T052-76 em (A), fator de morte da esporulação em *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 em (B) e locilomicina em *B. subtilis* sp. em (C). A linha na cor azul (em A e C) marca os genes *ybbR*, *glmM* e *glmS*, responsáveis pelo core biossintético da substância da classe da locilomicina. A linha na cor vermelha (em A e B) destaca os genes *skf*, responsáveis pelo core biossintético do metabólito fator de morte da esporulação. Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

O segundo cluster gênico encontrado no *contig 8* (comprimento de 27.830 nt) está relacionado à síntese de uma substância da classe da liquenisina em *B. safensis* T052-76, incluindo os genes *hyu A* e *B*, os genes *put A*, *B* e *C* e os genes *lchAA*, relacionados à síntese desse composto. Esse cluster biossintético apresentou 50% de similaridade com o cluster para uma liquenisina na bactéria *B. licheniformis* DSM13. A análise do contexto genético em ambos os clusters citados mostrou que os genes se encontravam na mesma orientação e ordenação. No entanto, no genoma da estirpe T052-76, o gene *lchAA*, que faz parte do core biossintético da substância liquenisina, encontra-se fragmentado em duas partes (Figura 29).



**Figura 29.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da liquenisina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. licheniformis* DSM 13 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

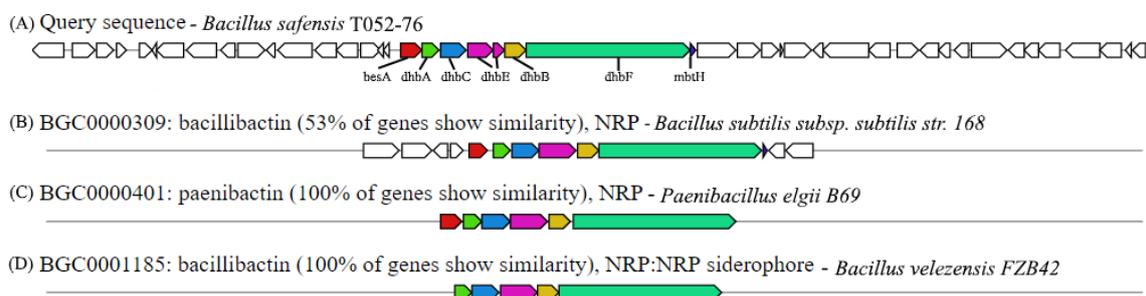
Outra região que foi encontrada no genoma de *B. safensis* T052-76, apresentou os genes *srfA* e *ycx*, entre outros, com um comprimento total de 114.544 nt (*contig* 11). Este cluster gênico foi relacionado à síntese de uma substância da classe da surfactina e possui um tamanho de 44.186 nt. O cluster apresentou 39% de similaridade com a região que também codifica uma surfactina no genoma de *B. velezensis* FZB42. Os resultados do contexto genético mostraram que os genes relacionados à síntese do composto nos genomas de ambas as bactérias se encontravam na mesma ordem e direção. Embora a similaridade entre os dois clusters comparados tenha sido de apenas 39% pela análise do software antiSMASH, foi possível verificar que o cluster do genoma de *B. safensis* T052-76 apresentava, além dos genes considerados homólogos, outros genes importantes para a síntese da surfactina, como os genes *acpS* e *srfAD* (Figura 30).



**Figura 30.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da surfactina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados. Os genes marcados com um asterisco vermelho e não coloridos estão presentes no genoma de *B. safensis* e não foram identificados homólogos no genoma de *B. velezensis* FZB42.

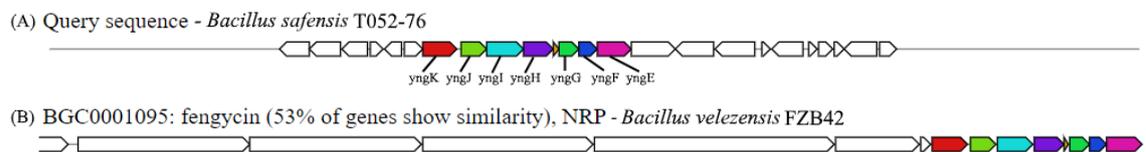
Outro cluster gênico analisado no genoma da estirpe T052-76 continha os genes *dhb* e apresentava um comprimento total de 91.146 nt. Esse cluster gênico está presente no *contig* 14 e seus genes direcionam a síntese de um peptídeo não-ribossomal da classe da bacilobactina, com um tamanho total de 49.710 nt. O cluster gênico de *B. safensis*

anotado pelo programa antiSMASH foi apontado como tendo 53% de similaridade com o cluster de bacilobactina da bactéria *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168. No genoma de *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 foram encontrados alguns genes que não foram identificados no genoma aqui estudado. No entanto, a análise mostrou que o cluster da estirpe T052-76 apresentou 100% de similaridade com o cluster presente no genoma de *B. velezensis* FZB42, que também codifica uma bacilobactina. Além disso, também foi identificada uma similaridade de 100% com o cluster do genoma de *Paenibacillus elgii* B69, que codifica uma substância da classe da paenibactina (Figura 31).



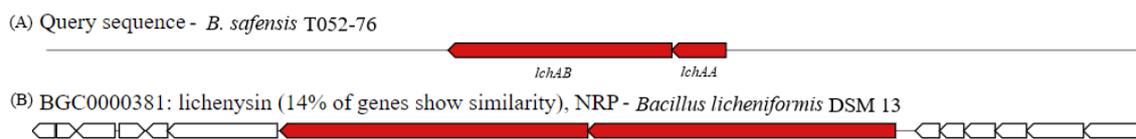
**Figura 31.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da bacilobactina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A), e nos genomas de *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (B) e *B. velezensis* FZB42 (D). Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da paenibactina no genoma de *Paenibacillus elgii* B69 (C). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos quatro genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

Um cluster biossintético de 28.413 nt, contendo os genes *yng* que codificam para um metabólito secundário da classe da fengicina, foi detectado no *contig* 15 (tamanho de 79.636 nt). Esse agrupamento gênico apresentou 53% de similaridade com o cluster da bactéria *B. velezensis* FZB42 para fengicina. A organização dos genes em ambos os clusters foi igual (Figura 32).



**Figura 32.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da fengicina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. velezensis* FZB42 (B). Os genes são representados por diferentes cores, e os genes homólogos encontrados nos dois genomas são representados pelas mesmas cores. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

O *contig* 25 possui um tamanho de 9.734 nt e, nele, foi predito um cluster biossintético que contém os genes *lchAB* e *lchAA*, com um tamanho também de 9.734 nt. Esses genes fazem parte do core biossintético da substância da classe liquenisina e o agrupamento apresentou 14% de similaridade com a região que codifica liquenisina no genoma da bactéria *B. licheniformis* DSM13 (Figura 33).



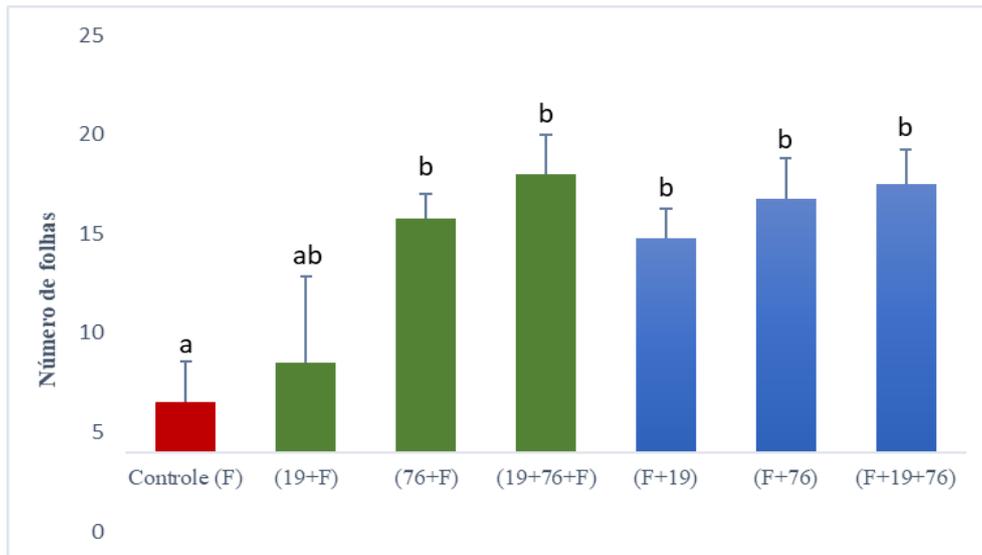
**Figura 33.** Cluster biossintético que codifica uma substância da classe da liquenisina no genoma de *B. safensis* T052-76 (A) e no genoma de *B. licheniformis* DSM13 (B). Os homólogos encontrados nos dois genomas são representados pela cor vermelha. Todos os genes sem cor representam genes que não apresentaram similaridade ou não estão presentes nos clusters gênicos comparados.

No genoma da *B. safensis* T052-76 não foram encontrados genes codificando para metabólitos secundários nos segmentos genômicos: regiões 3, 4, 7, 9, 10 e 12; da região 16 até a região 24; e da região 26 até a região 32.

## 6.4. EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

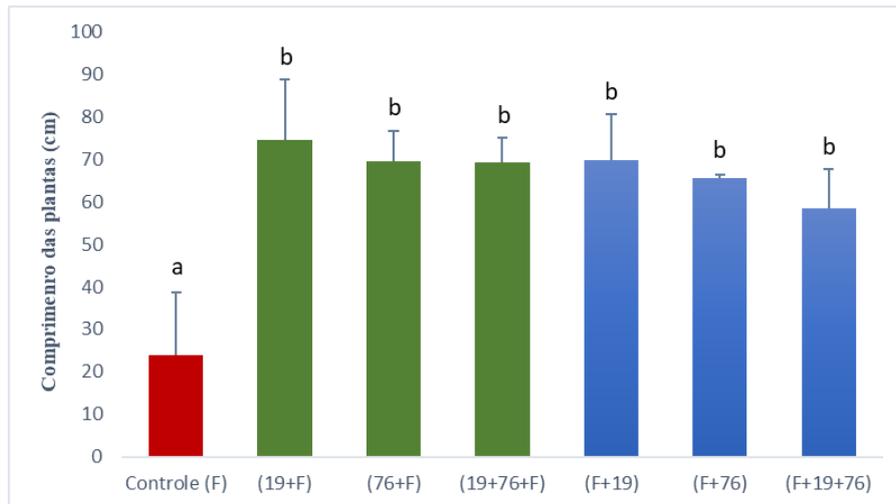
### 6.4.1. ANÁLISE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E DE DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

As plantas foram avaliadas ao longo de todo o experimento, sendo que as contagens de número de folhas, plantas doentes, sobrevivência das plantas e medição de altura das plantas foram realizadas ao término do experimento, após 180 dias após o plantio (DAP). O número de folhas variou entre os 7 tratamentos do experimento (T1 a T7), sendo observado o menor número de folhas nos vasos inoculados apenas com o fungo *P. destruens* (T1 - Controle - F). O número de folhas dos vasos controle (F) não diferiu significativamente (ANOVA: Tukey's Test;  $P \leq 0,05$ ) apenas do tratamento onde foi primeiro inoculada a bactéria *B. velezensis* T149-19 (T2), como mostra a figura 34. Os demais tratamentos diferiram significativamente do tratamento controle.



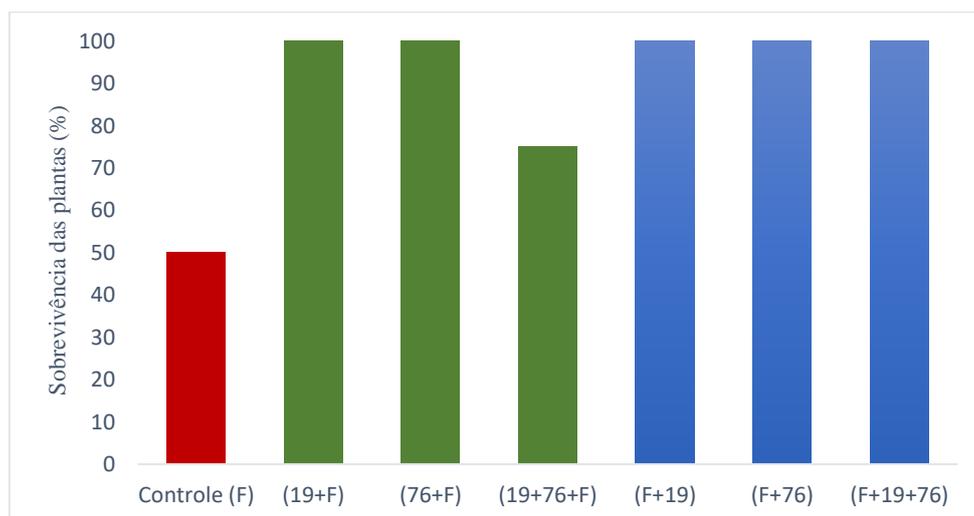
**Figura 34.** Determinação do número de folhas nas diferentes plantas dos tratamentos T1 a T7 - 180 DAP. Os tratamentos de T3 a T7 apresentaram número de folhas significativamente maior do que o tratamento controle (inoculado apenas com o fungo) (T1=F; T2=19+F; T3=76+F; T4=19+76+F; T5=F+19; T6=F+76; T7=F+19+76).

Com a medição do comprimento das plantas, foi demonstrado que todas as plantas inoculadas com as bactérias, antes ou depois do inóculo fúngico, tiveram um melhor desempenho no seu crescimento. Todas as plantas destes tratamentos chegaram ao final do experimento com aproximadamente 70 cm de comprimento. A média do tamanho das plantas do tratamento controle (aproximadamente 25 cm), inoculado apenas com o fungo, diferiu estatisticamente (ANOVA: Tukey's Test;  $P \leq 0,05$ ) dos demais tratamentos (Figura 35).



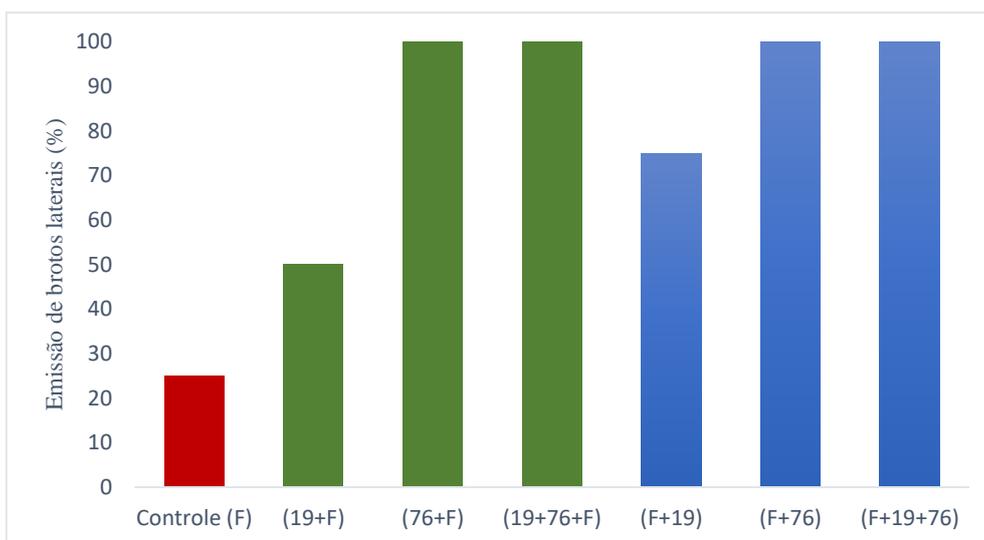
**Figura 35.** Determinação do comprimento das plantas - 180 DAP. A média de comprimento das plantas do tratamento controle (F) foi aproximadamente 64% menor que a média de todos os tratamentos inoculados com as bactérias *B. velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-6, juntas ou separadamente, antes ou após o inóculo fúngico.

Quanto à sobrevivência das plantas após a introdução do fungo, verificou-se que as plantas de todos os tratamentos inoculados com as bactérias, antes ou depois do fungo, tiveram maior capacidade de sobrevivência. No tratamento controle (F), 50% das plantas morreram. Nos demais tratamentos, contendo o inóculo bacteriano, apenas uma planta morreu no tratamento T4 (onde as duas bactérias foram inoculadas antes do fungo) (Figura 36).



**Figura 36.** Sobrevivência das plantas nos diferentes tratamentos - 180 DAP. Todas as plantas inoculadas apenas com o fungo (controle F) mostraram uma sobrevivência menor que as plantas inoculadas com as bactérias.

Durante as análises diárias das plantas na casa de vegetação, foi possível observar que, em alguns dos vasos com as mudas de batata-doce, as plantas começaram a emitir brotos laterais a partir dos caules mais próximos ao solo. Ao longo do experimento, observou-se, ainda, que esse fenômeno era mais recorrente nos vasos onde as plantas haviam sido inoculadas com as bactérias, seja antes ou após o inóculo fúngico, conforme mostram as figuras 37 e 38.



**Figura 37.** Emissão de brotos laterais - 180 DAP. Nas plantas do tratamento controle, inoculadas apenas com o fungo, a emissão de brotos laterais foi muito inferior à emissão de brotos laterais pelas plantas dos tratamentos onde as estirpes de *Bacillus* foram inoculadas.



**Figura 38.** Vasos contendo mudas de batata-doce dos tratamentos 3 e 5, inoculadas com a bactéria *B. safensis* T052-76 e depois com o fungo *P. destruens* (A) e com o fungo e depois com a bactéria *B. velezensis* T149-19 (B), respectivamente. As setas vermelhas apontam para os brotos laterais emitidos pelas plantas em (A) e (B).

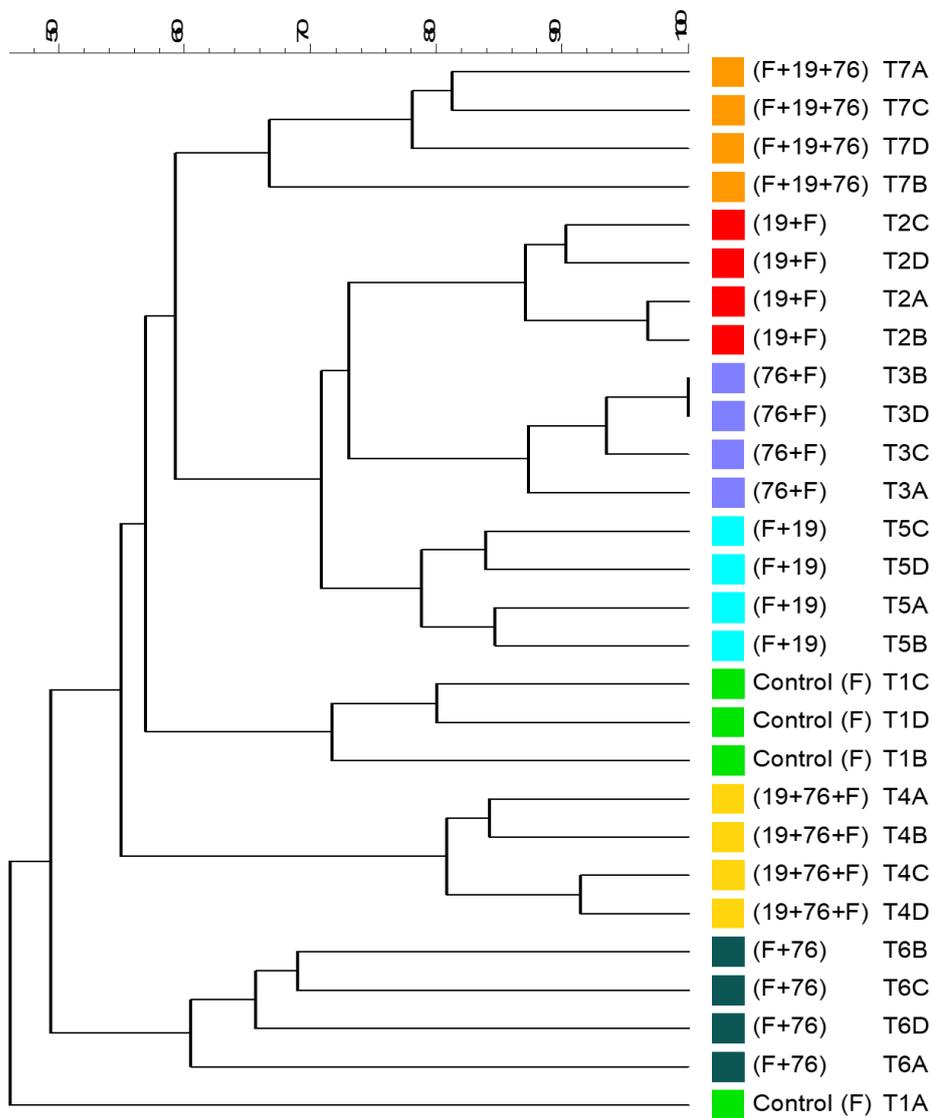
#### 6.4.2. ANÁLISE DAS COMUNIDADES MICROBIANAS ATRAVÉS DE PCR-DGGE

O efeito da inoculação do fungo *P. destruens* e das bactérias *B. velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76, nos diferentes tratamentos, sobre a estrutura da comunidade microbiana presente na rizosfera das plantas foi verificado utilizando-se a técnica de PCR-DGGE. Para a análise da comunidade bacteriana foi utilizado o gene *rrs*, enquanto para a comunidade fúngica foi utilizada a região ITS.

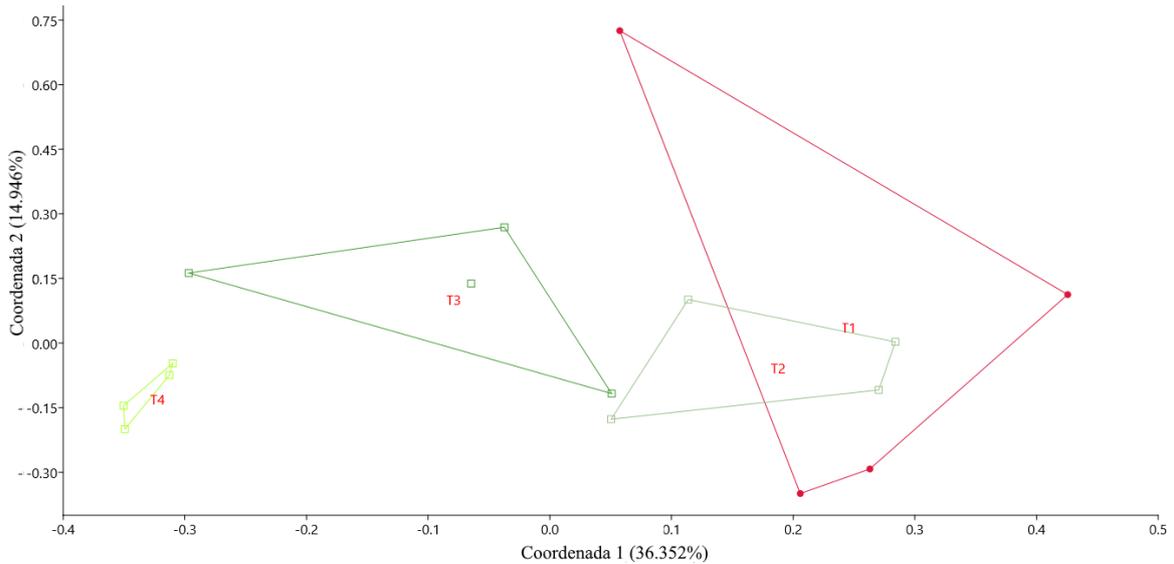
No dendrograma gerado a partir da DGGE para a comunidade bacteriana (Figura 39) podemos observar que, dentro de cada tratamento, as amostras se agruparam. Portanto, a maior similaridade foi observada entre as réplicas. Nessa análise com todas as amostras juntas, foi possível inferir que a estrutura da comunidade bacteriana foi mais influenciada pelos tratamentos 4 (com ambas as bactérias inoculadas antes do fungo) e 6 (com o fungo inoculado primeiro e a bactéria *B. safensis* T052-76 depois), pois todas as amostras desses tratamentos formaram grupos entre si, entre as réplicas, e separado dos demais tratamentos.

Além disso, a matriz numérica gerada pelas bandas da DGGE foi submetida a uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA) aplicando índices de dissimilaridade de Bray-Curtis. Foram realizadas duas análises separadas: i. considerando todos os tratamentos onde as bactérias foram inoculadas antes do fungo - T2 (19+F), T3 (76+F) e T4 (19+76+F) - e comparando com o controle da doença - T1 (F); ii. considerando todos os tratamentos onde o fungo foi inoculado antes das bactérias - T5 (F+19), T6 (F+76) e T7 (F+19+76) - e comparando também com o controle - T1 (F). As diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os tratamentos foram avaliadas utilizando-se uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), com o mesmo índice (Bray-Curtis).

O gráfico resultante da primeira análise (i. bactérias inoculadas antes do fungo) mostra as coordenadas 1 e 2 (Figura 40). Foi possível observar que em T1 (controle), as amostras diferiram estatisticamente das pertencentes ao grupo T3 (76+F) ( $P < 0,05$ ) pela coordenada 2. A análise estatística também mostrou que as amostras de T4 (19+76+F) se separaram das amostras de todos os outros tratamentos ( $P < 0,05$ ), sendo então o tratamento que mais influenciou a estrutura da comunidade bacteriana dentre as amostras inoculadas com as bactérias antes do fungo.

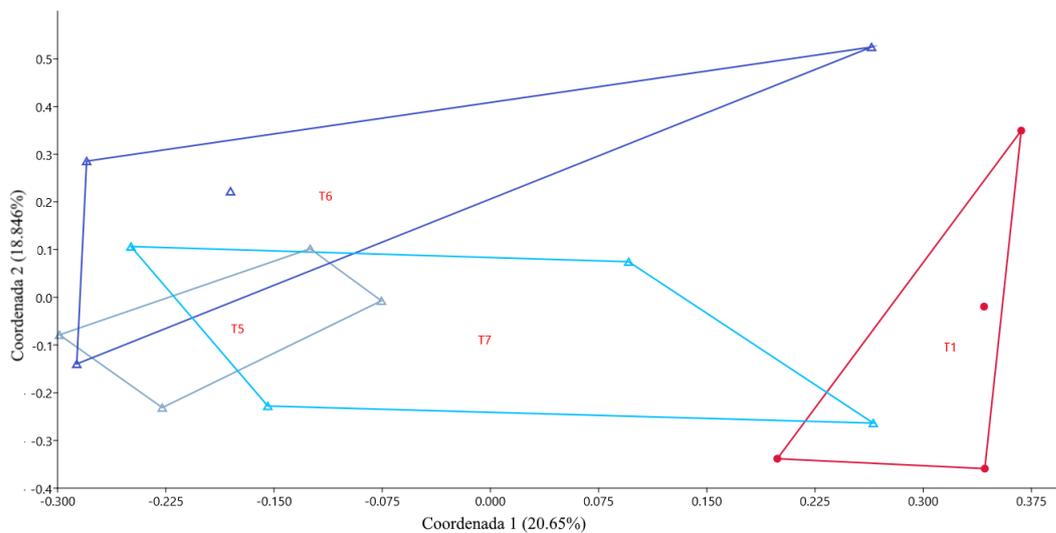


**Figura 39.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando-se o coeficiente de Dice a partir da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) baseado em fragmentos do gene *rrs* da comunidade bacteriana da rizosfera dos tratamentos de T1 a T7. F: inoculado com *P. destruens*; 19: *B. velezensis* T149-19; 76: *B. safensis* T052-76. A-D representam as réplicas (n=4).



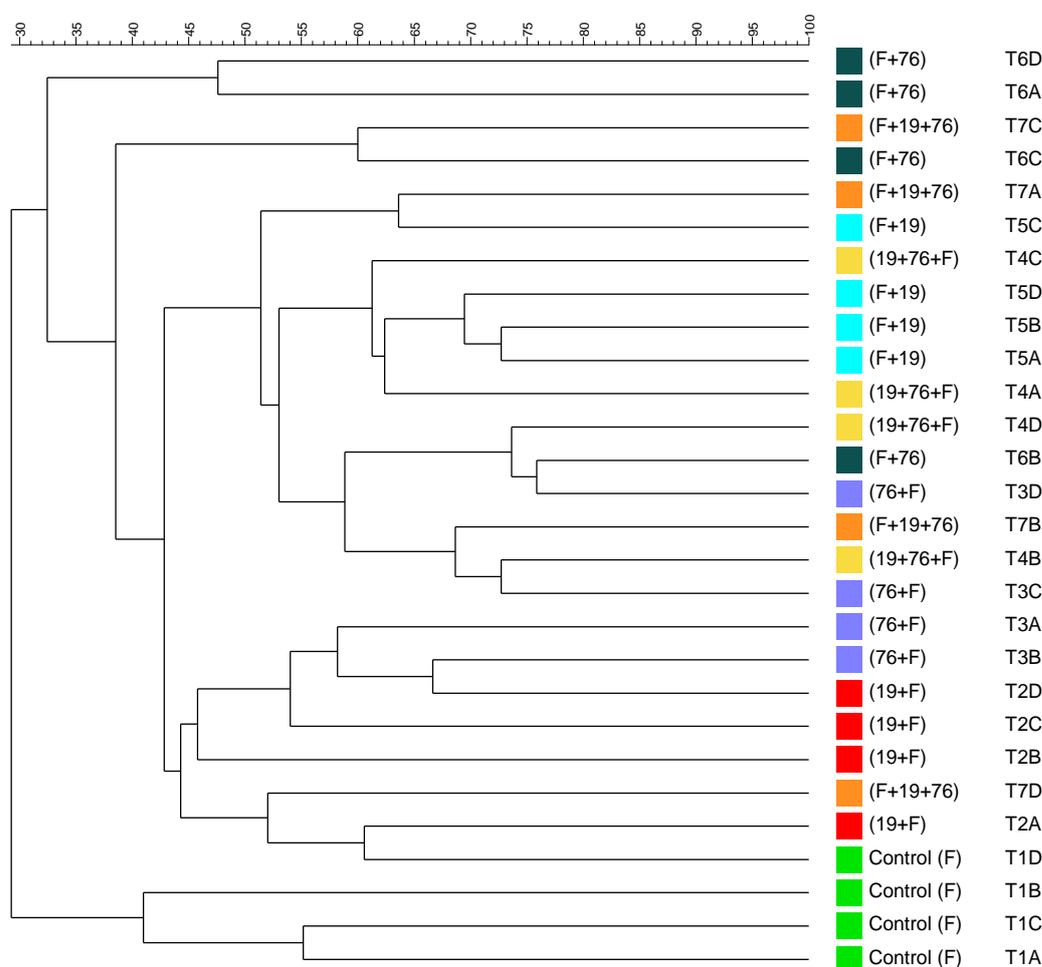
**Figura 40.** Análise PCoA baseada na matriz obtida na DGGE para a comunidade bacteriana total das amostras dos tratamentos T1 (controle), T2, T3 e T4. Os vértices de cada figura representam as réplicas (n=4) dentro de cada tratamento (T1=F; T2=19+F; T3=76+F; T4=19+76+F).

O gráfico resultante da segunda análise (ii. fungo inoculado antes das bactérias) é apresentado também com as coordenadas 1 e 2 (Figura 41). Foi possível observar que as amostras de T1, inoculadas apenas com o fungo, se separaram das amostras de T5 (F+19) pela coordenada 2 ( $P < 0,05$ ). Os demais tratamentos mostraram uma tendência de separação de T1, também pela coordenada 2, mas não foram diferentes estatisticamente.



**Figura 41.** Análise PCoA baseada na matriz obtida na DGGE para a comunidade bacteriana total das amostras dos tratamentos T1 (controle), T5, T6 e T7. Os vértices de cada figura representam as réplicas (n=4) dentro de cada tratamento. (T1=F; T5=F+19; T6=F+76; T7=F+19+76).

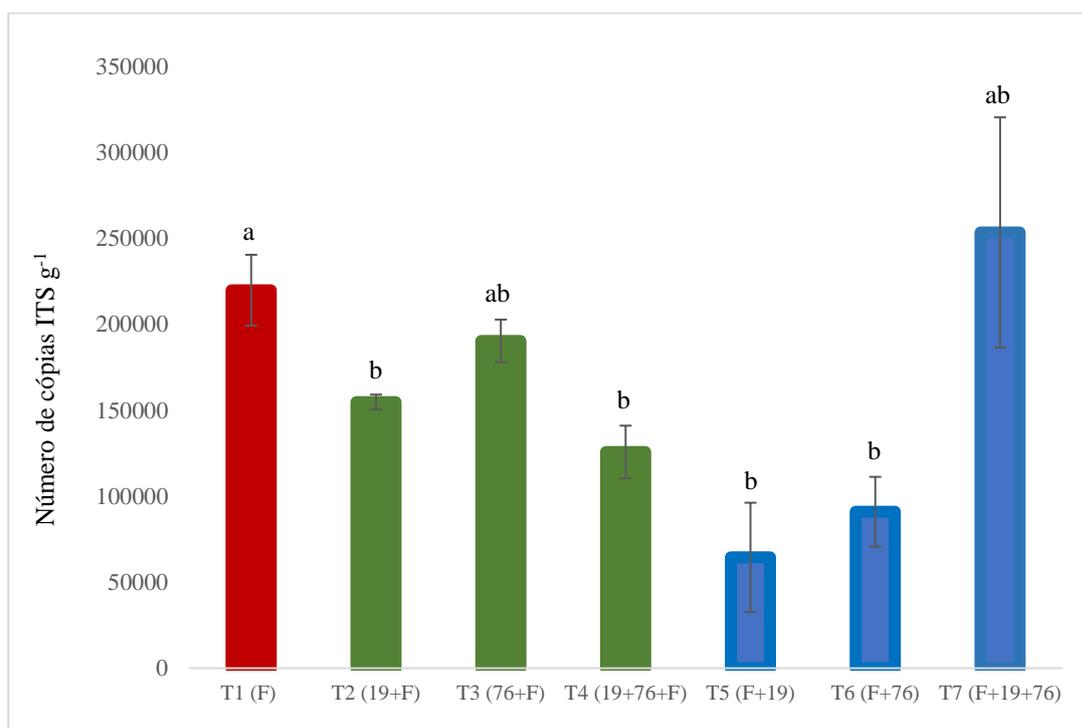
Para a comunidade fúngica, o dendrograma gerado a partir da PCR-DGGE (Figura 42) também revelou que há maior similaridade e tendência de agrupamento entre as réplicas dos mesmos tratamentos. A maioria das amostras do tratamento de controle da doença, onde as mudas foram inoculadas apenas com o fungo *P. destruens*, formou um grupo separado das amostras restantes, sendo possível observar, então, uma clara influência do inóculo das bactérias na estruturação da comunidade fúngica. Além disso, foi observado também uma tendência de agrupamento das amostras que tiveram o inóculo fúngico sendo introduzido primeiro nos vasos (parte superior do dendrograma). As amostras inoculadas com as bactérias *B. velezensis* e *B. safensis*, separadamente (tratamentos T2 e T3) formaram subgrupos próprios, com aproximadamente 45% de similaridade.



**Figura 42.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando-se o coeficiente de Dice a partir da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) baseado em fragmentos do ITS da comunidade fúngica presente na rizosfera das plantas submetidas aos tratamentos T1 a T7. F: inoculado com *P. destruens*; 19: *B. velezensis* T149-19; 76: *B. safensis* T052-76. A-D representam as réplicas (n=4).

### 6.4.3. DETERMINAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE FUNGOS NOS VASOS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS, UTILIZANDO PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

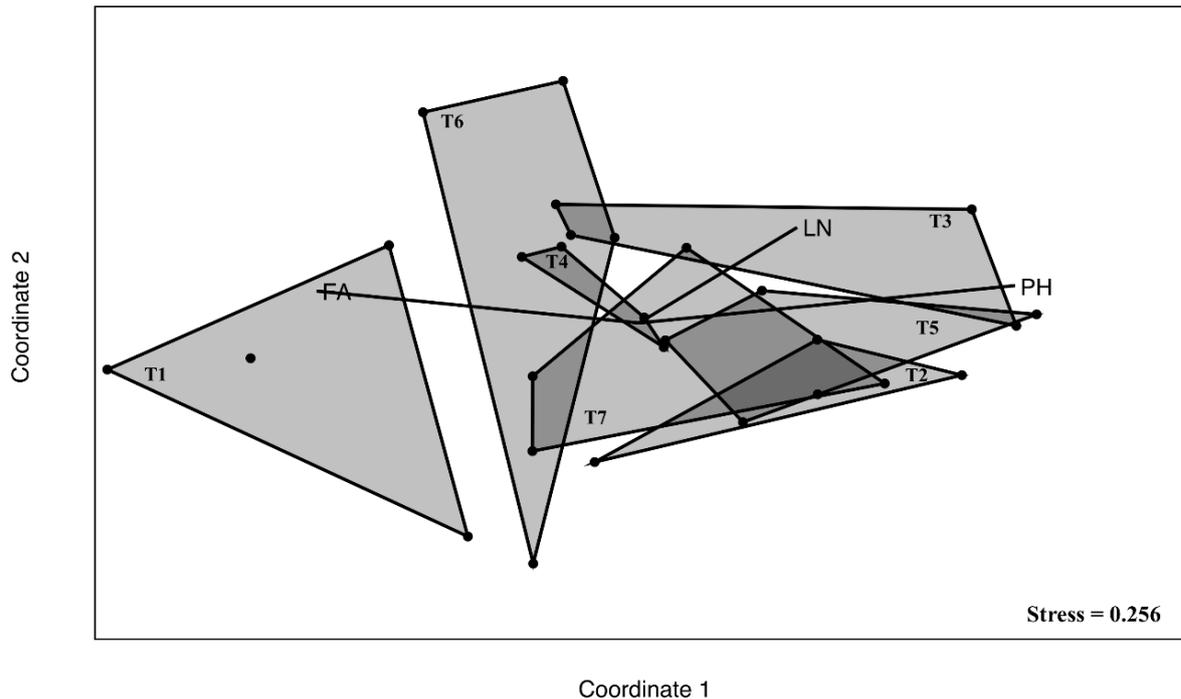
Foi realizada uma análise quantitativa por qPCR dos fungos presentes nas amostras de DNA provenientes da rizosfera das plantas ao término do experimento. Uma vez determinado o número de cópias do ITS para as amostras do tratamento controle (T1-F), este número foi comparado com o número de cópias de ITS presentes nas amostras dos vasos inoculados com as bactérias, antes ou depois do fungo. Esta análise mostrou que nos tratamentos T2, T4, T5 e T6 houve uma queda significativa ( $P \leq 0,05$ ) no número de cópias do ITS avaliado em relação ao tratamento controle T1 (F) (Figura 43). Os demais tratamentos (T3 e T7) não apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparadas ao controle.



**Figura 43.** Determinação da abundância de fungos nos vasos dos diferentes tratamentos, utilizando PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e iniciadores para o ITS. Os valores das barras indicam a média das quatro réplicas de cada tratamento. F: inoculado com *P. destruens*; 19: *B. velezensis* T149-19; 76: *B. safensis* T052-76.

#### 6.4.4. CORRELAÇÃO DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE FÚNGICA NOS DIFERENTES TRATAMENTOS COM A FITOSSANIDADE (ALTURA DA PLANTA E NÚMERO DE FOLHAS) E A ABUNDÂNCIA FÚNGICA OBTIDA NA qPCR

A matriz numérica gerada pelas bandas da PCR-DGGE foi submetida a uma análise multidimensional não-métrica (N-MDS), utilizando o índice de Jaccard e o programa estatístico PAST, com o objetivo de correlacionar a estrutura da comunidade fúngica observada nos diferentes tratamentos com a fitossanidade (altura da planta e número de folhas) e a abundância fúngica obtida na qPCR (Figura 44). A análise de N-MDS mostrou que as amostras T1, inoculadas apenas com o fungo, se separaram de todos os outros tratamentos ( $P \leq 0,05$ ). As amostras provenientes dos tratamentos restantes mostraram uma forte tendência de agrupamento entre si, demonstrando mais uma vez a influência do inóculo bacteriano no agrupamento das amostras. Essa tendência foi confirmada pela análise estatística (PERMANOVA). Além disso, foi observada uma correlação clara entre a estrutura da comunidade fúngica nos tratamentos T2 a T7 e os parâmetros da planta (altura - PH e número de folhas - LN), enquanto T1 foi correlacionado com a abundância de fungos (FA) (Figura 44).



**Figura 44.** Análise gráfica N-MDS utilizando dissimilaridade de Bray-Curtis, baseada na matriz de bandas obtida na PCR-DGGE para a comunidade fúngica total das amostras dos tratamentos de T1 a T7. Foram utilizados parâmetros de saúde vegetal (altura da planta e número de folhas) e abundância de fungos determinada por qPCR como vetores para a análise do N-MDS. T1=F; T2=19+F; T3=76+F; T4=19+76+F; T5=F+19; T6=F+76; T7=F+19+76. F: inoculado com *P. destruens*; 19: *B. velezensis* T149-19; 76: *B. safensis* T052-76. PH = altura da planta, LN = número de folhas e FA = abundância de fungos.

## 7. DISCUSSÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são geralmente descritas como produtoras de uma ampla gama de antimicrobianos, muitos dos quais têm grande importância por sua ação contra fitopatógenos (ONGENA & JACQUES, 2008; FIRA *et al.*, 2018; SAXENA *et al.*, 2019). *Bacillus velezensis* é uma espécie que foi caracterizada em 2005, tendo sido originariamente pertencente à espécie *B. subtilis* que é um modelo para estudos dentro do gênero *Bacillus*. Por conta disso, assim como a espécie *B. subtilis*, a espécie *B. velezensis* vem sendo amplamente utilizada como modelo em pesquisas científicas relacionadas à produção de moléculas bioativas e cada vez mais aplicada na produção agrícola, por seu importante papel no controle de patógenos vegetais e seus efeitos de promoção de crescimento das plantas (QIAO *et al.*, 2014; RAHMA *et al.*,

2020). Já a espécie *Bacillus safensis* foi isolada e caracterizada inicialmente em 1999 e, desde então, diversos trabalhos vêm mostrando suas características benéficas contra importantes fitopatógenos, além da produção de diversos bioprodutos (ABDELLI *et al.*, 2019; RONG *et al.*, 2020).

As principais moléculas bioativas produzidas por espécies de *Bacillus* são peptídeos e lipopeptídeos sintetizados de forma não ribossômica, compostos policetídeos, bacteriocinas e sideróforos. Os lipopeptídeos das famílias da surfactina (liquisina e pumilacidina), da iturina (iturina, micosubtilina, bacilomicina e mojavensina) e da fengicina (fengicina e plipastatina) parecem ser os antimicrobianos mais prevalentes produzidos por estirpes de *Bacillus* (ONGENA & JACQUES, 2008; JACQUES, 2011; FIRA *et al.*, 2018). Beric e colaboradores (2012) demonstraram a presença de múltiplos *operons* biossintéticos codificantes para a síntese de lipopeptídeos não-ribossômicos, em um número considerável de isolados naturais de *Bacillus*. Várias estirpes de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. natto*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. safensis* já foram descritas como produtoras de lipopeptídeos com potencial para serem usados como agentes de biocontrole (ONGENA & JACQUES, 2008; FIRA *et al.*, 2018; GRADY *et al.*, 2019; RONG *et al.*, 2020).

No presente estudo, duas estirpes de *Bacillus* pertencentes às espécies *B. velezensis* e *B. safensis* estão sendo consideradas para o biocontrole da batata-doce, mais especificamente contra o agente causador da podridão do pé - o fungo *P. destruens*. Encontramos na literatura diversos trabalhos onde estirpes de *B. velezensis* são utilizadas no biocontrole de diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos em culturas de alta importância agrícola como batata, manga, abacate, mamão, citros, tomate, mirtilo, amora, framboesa, abobrinha, melão, pepino, melancia e outros (GALINDO *et al.*, 2013; BALDERAS-RUÍZ *et al.*, 2020; CUI *et al.*, 2020; e outros). Em relação ao uso de *B. safensis* como biocontrole, Rong e colaboradores (2020) utilizaram a estirpe *B. safensis* B-21 em um trabalho com mudas de arroz onde viram a inibição da brusone do arroz utilizando somente o sobrenadante da cultura ou o caldo da fermentação da bactéria.

No entanto, até onde sabemos, não há estudos disponíveis considerando o uso de *Bacillus* para o biocontrole em batata-doce, exceto nossos estudos anteriores (MARQUES *et al.*, 2015; MATEUS *et al.*, 2019), e são escassos os estudos envolvendo *B. safensis* como espécie produtora de antimicrobianos. Portanto, este estudo contribui

para o conhecimento sobre a capacidade dessas estirpes de *Bacillus* em inibir *P. destruens* e prevenir o aparecimento dos sintomas do mal-do-pé em experimentos com mudas de batata-doce. Além disso, o estudo também contribui com conhecimentos sobre os genes que codificam substâncias antimicrobianas que podem ser responsáveis pela inibição do fungo.

Esse estudo mostrou que a estirpe T149-19 codifica uma ampla gama de metabólitos secundários. A metodologia utilizada nos permitiu saber qual a similaridade de cada cluster biossintético com clusters gênicos que já são conhecidos, podendo, assim, ranquear as que possuem uma via metabólica mais completa, ou seja, os clusters que apresentam uma similaridade mais alta. Assim, após a anotação do genoma no software antiSMASH, foram identificadas 17 regiões contendo clusters codificantes de metabólitos secundários para *B. velezensis* T149-19. Dentre estes, foram identificados genes que codificam para substâncias das classes micosubtilina, bacileno, macrolactina, bacilibactina, bacilisina, kijanimicina, plantazolicina, fengicina, plipastatina, difucidina e surfactina no genoma de *B. velezensis* T149-19. No genoma de *B. safensis* T052-76 foram identificadas 13 regiões contendo clusters codificantes de metabólitos secundários. Dentre estes, foram identificados genes que codificam para substâncias das classes botromicina A, bacilisina, carotenoide, zwitermicina A, fator de morte da esporulação skfA, liquenisina, bacilibactina, fengicina e surfactina.

Na literatura também foi possível encontrar casos semelhantes aos achados nos genomas aqui estudados. Por exemplo, os genomas das estirpes *B. velezensis* CMRP 4490 e B-4 apresentaram agrupamentos de genes biossintéticos relacionados à síntese de moléculas com atividade antifúngica (ZHU *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2021). Chen e colaboradores (2018) demonstraram a presença de até 13 clusters gênicos responsáveis pela síntese de lipopeptídeos, como fengicina, iturina, surfactina, butirósina, plantazolicina, kijanimicina, bacilisina, difucidina, bacileno e bacileno B no genoma de *B. velezensis* estirpe LM2303.

Praticamente todas essas substâncias antifúngicas que são possivelmente produzidas por *B. velezensis* T149-19 e por *B. safensis* T052-76 têm potencial para inibir *P. destruens*, com exceção da botromicina A no genoma da bactéria *B. safensis* T052-76. Além das 17 regiões apontadas como codificantes por meio da comparação com o banco de dados, algumas regiões foram apontadas como não apresentando similaridade com

clusters conhecidos. No entanto, essas regiões podem codificar antimicrobianos importantes, mas que ainda não estão bem estabelecidos na literatura e/ou no banco de dados MIBig, que o software antiSMASH utiliza. Esse seria o caso da substância da classe do terpeno, por exemplo, encontrado na bactéria T149-19. Terpenos de origem vegetal, especialmente de óleos essenciais, tem atividade antifúngica e antibacteriana bem exploradas em estudos e com bastante literatura disponível, enquanto os de origem bacteriana necessitam de mais estudos (CAULIER *et al.*, 2019). Além disso, o uso simultâneo das duas estirpes em experimentos *in vivo* pode ter o potencial de aumentar o espectro de ação contra este ou mesmo contra outros fitopatógenos. Por exemplo, a surfactina é mais conhecida por suas poderosas propriedades biosurfactantes e sua fungitoxicidade limitada (ONGENA & JACQUES, 2008; PÉREZ-GARCIA, ROMERO & DE VICENTE, 2011). No entanto, a atividade sinérgica da surfactina com diferentes lipopeptídeos já foi demonstrada por Ongena & Jacques (2008).

Algo que é importante ressaltar é que a presença de diferentes genes codificadores de substâncias antimicrobianas em ambos os genomas de *Bacillus* não garante que esses genes estejam sendo expressos e, conseqüentemente, que as substâncias estejam sendo produzidas. Mais experimentos ainda serão necessários para provar a presença das substâncias após a introdução das bactérias no ambiente de raiz da batata-doce. Outra alternativa seria a caracterização das substâncias e sua produção em condições controladas, no laboratório, para só então aplicá-las em campo, nas mudas de batata-doce.

Como outros autores já relataram, mais de uma substância pode ser produzida e ser ativa na mesma estirpe de *Bacillus* (YUAN *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2016). Assim sendo, a partir do amplo espectro de classes de substâncias antimicrobianas encontradas nos genomas de *B. velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76, é bastante provável que algumas possam atuar *in vivo*.

Experimentos em vasos, em casa de vegetação, foram conduzidos para determinar se a bactéria seria capaz de proteger a planta da batata-doce da doença - inoculando a bactéria antes (60 DAP) e o fungo depois (120 DAP) e/ou para mitigar os sintomas da doença mal-do-pé - inoculando o fungo antes (60 DAP) e depois a bactéria (120 DAP). Em ambas as situações, todas as plantas inoculadas com bactérias (cada uma separadamente ou as duas bactérias juntas, em consórcio) apresentaram desempenho maior quanto a capacidade de sobrevivência das plantas na presença do fungo. Esses

achados depõem a favor de ambas as atividades (proteção das plantas e mitigação dos sintomas) realizadas pelas bactérias. Rong e colaboradores (2020) encontraram efeito semelhante utilizando *B. safensis* estirpe B21, constatando diminuição dos efeitos de doença fúngica em plantas de arroz.

Ainda durante a fase do experimento que analisou os parâmetros fisiológicos e de desenvolvimento das plantas em casa de vegetação, uma das observações mais interessantes foi a emissão de brotos laterais durante o crescimento das plantas tratadas com bactérias, em todas as condições de inoculação, antes ou depois do fungo. Além disso, outros efeitos significativos de promoção de crescimento também foram observados (maior número de folhas, plantas mais altas) em plantas tratadas com uma ou ambas as bactérias juntas, antes ou após a inoculação do fungo. Portanto, *B. velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76 podem ser potenciais agentes de biocontrole com capacidade de promoção do crescimento de plantas. A atividade antifúngica e a capacidade de promoção do crescimento da planta também foram demonstradas em *B. velezensis* LDO2 (CHEN *et al.*, 2019) e *B. velezensis* CMRP 4490 (TEIXEIRA *et al.*, 2021).

A resposta das comunidades bacterianas e fúngicas à inoculação das estirpes T052-76 e T149-19 em experimentos em vasos juntamente com o fungo também foi avaliada por métodos moleculares. Para a comunidade bacteriana, tanto a análise da DGGE, contendo todas as amostras, como a análise da PCoA, em que os tratamentos foram separados em dois grupos, mostraram que o tratamento T4 (19+76+F) foi o tratamento que mais influenciou a estrutura da comunidade bacteriana dentre as amostras inoculadas antes do fungo. Já para os tratamentos onde o fungo foi inoculado antes das bactérias, a PCoA apontou que o tratamento T1, inoculado apenas com o fungo, teve uma tendência de separação dos demais tratamentos, não sendo, portanto, observada influência significativa da inoculação das bactérias nos tratamentos onde o fungo foi inoculado antes. De modo geral, as amostras que contém o inóculo bacteriano tendem a se agrupar dentro de cada tratamento. Essa observação corrobora o que foi encontrado em nosso trabalho anterior (MATEUS *et al.*, 2019), no qual os inóculos bacterianos tem pouca e/ou influência transitória sobre a comunidade bacteriana da rizosfera da batata-doce. Resultado semelhante foi encontrado por Xiao e colaboradores (2018) em rizosfera de tomate. Os autores inocularam a estirpe Jdm1 de *B. cereus* e verificaram seus efeitos sobre

a comunidade bacteriana usando PCR-DGGE e viram que a inoculação não alterou permanentemente a comunidade bacteriana, que se recuperou, voltando a ficar semelhante à original, pouco tempo após a inoculação.

Observamos, na DGGE e na análise NMDS, que a estrutura da comunidade fúngica foi fortemente influenciada pela inoculação bacteriana, com as amostras inoculadas apenas com o fungo formando um grupo separado das amostras que continham inóculo bacteriano. Mateus *et al.* (2019) demonstraram anteriormente, utilizando apenas DGGE, que nenhuma das estirpes (T052-76 ou T149-19) teve um impacto persistente na estrutura da comunidade fúngica ao longo de seu experimento. No entanto, é importante ressaltar que nenhum fungo foi introduzido nos vasos com batata-doce, como ocorreu no presente estudo. Portanto, nossos resultados podem sugerir que o *P. destruens* pode ser sensível a um ou mais substâncias antimicrobianas produzidas pelas estirpes inoculadas, uma vez que só foi observado um impacto significativo da inoculação das bactérias quando *P. destruens* estava presente (estudo atual), efeito esse que não foi verificado quando a análise incluía apenas a comunidade fúngica indígena da batata-doce (no estudo de Mateus *et al.*, 2019)

A aplicação da metodologia de PCR em tempo real permitiu quantificar a comunidade fúngica nas amostras provenientes dos vasos com batata-doce com os diferentes inóculos utilizados no estudo. Utilizando um número de cópias conhecido da região ITS e comparando os valores em cada diluição com o valor das réplicas das amostras controle T1 (F) (inoculadas somente com o fungo), foi possível quantificar o número de cópias da região ITS e comparar os diferentes tratamentos. Assim, em comparação com T1 (F), houve uma tendência de diminuição do número de cópias da região ITS na maioria das amostras provenientes dos vasos inoculados com as bactérias *B. velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76, antes ou depois do fungo. Além disso, quando o número de cópias da região ITS foi analisado junto com os parâmetros utilizados para verificar a saúde das plantas durante o experimento, foi observada correlação clara entre a estrutura da comunidade fúngica nos tratamentos onde as bactérias foram inoculadas (em todas as condições), enquanto o tratamento que continha apenas o fungo foi correlacionado com a abundância de fungos. Em conjunto, estes resultados indicam que existe uma diminuição na abundância de fungos, possivelmente relacionado à ação antifúngica de alguma das substâncias identificadas nos genomas das

duas estirpes. Novos estudos, visando elucidar qual ou quais das substâncias encontradas são responsáveis pela inibição de *P. destruens* se fazem necessários, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com as mudas de batata-doce.

## 8. CONCLUSÃO

Com base no sequenciamento do genoma e na análise dos dados por comparação com outros genomas já explorados previamente, foi demonstrado que *B. velezensis* T149-19 e *B. safensis* T052-76 apresentam um amplo espectro de genes que codificam substâncias antimicrobianas em seus genomas. Os experimentos *in vivo* usando simultaneamente o fungo e as bactérias (cada uma em separado ou em consórcio) mostraram um maior desempenho de crescimento e uma maior capacidade de sobrevivência das plantas de batata-doce quando comparadas com as inoculadas apenas com o fungo. Portanto, ambas as estirpes de *Bacillus* podem ser consideradas agentes de biocontrole promissores para o controle biológico na produção agrícola. Os resultados aqui apresentados fornecem informações úteis que podem favorecer o desenvolvimento de um agente para biocontrole em batata-doce, protegendo esta importante cultura contra o mal-do-pé.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLI, F., JARDAK, M., ELLOUMI, J., STIEN, D., CHERIF, S., MNIF, S., AIFA, S. **Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4.** *Biodegradation*, 30(4):287-300, 2019. doi: 10.1007/s10532-018-09865-4.

ABRIOUEL, H., FRANZ, C.M., OMAR, N.B., GÁLVEZ, A. **Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 35(1): 201-232, 2011. doi: 10.1111/j.15746976.2010.00244.x.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA.** Plano Plurianual 2017-2020 – Ciclo 2017/2018, Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-de-agrotoxicos-relatorio-2017-e-2018.pdf/@download/file/Programa%20de%20An%C3%A1lise%20de%20Res%C3%ADduos%20de%20Agrot%C3%B3xicos%20-%20Relat%C3%B3rio%202017%20e%202018.pdf> [acessado em junho de 2021].

ARRIBAS, P., ANDÚJAR, C., BIDARTONDO, M.I., BOHMANN, K., COISSAC, É., CREER, S., DEWAARD, J.R., ELBRECHT, V., FICETOLA, G.F., GOBERNA, M., KENNEDY, S., KREHENWINKEL, H., LEESE, F., NOVOTNY, V., RONQUIST, F., YU, D.W., ZINGER, L., CREEDY, T.J., MERAMVELIOTAKIS, E., NOGUERALE, V., OVERCAST, I., MORLON, H., VOGLER, A.P., PAPADOPOULOU, A., EMERSON, B.C. **Connecting high-throughput biodiversity inventories: Opportunities for a site-based genomic framework for global integration and synthesis.** *Mol. Ecol.*, 30(5): 1120-1135, 2021. doi: 10.1111/mec.15797.

AZIZ, R.K., BARTELS, D., BEST, A.A., DEJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R.A., FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E.M., KUBAL, M., MEYER, F., OLSEN, G.J., OLSON, R., OSTERMAN, A.L., OVERBEEK, R.A., MCNEIL, L.K., PAARMANN, D., PACZIAN, T., PARRELLO, B., PUSCH, G.D., REICH, C., STEVENS, R., VASSIEVA, O., VONSTEIN, V., WILKE, A., ZAGNITKO, O. **The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.** *BMC Genomics*, 9: 75, 2008.

BAKER, M. **De novo genome assembly: what every biologist should know.** *Nat. Methods*, 9(4): 333-337, 2012. doi: 10.1038/nmeth.1935.

BALDERAS-RUIZ, K. A., BUSTOS, P., SANTAMARIA, R. I., GONZÁLEZ, V., CRISTIANO-FAJARDO, S. A., BARRERA-ORTÍZ, S., MEZO-VILLALOBOS, M., ARANDA-OCAMPO, S., GUEVARA-GARCÍA, Á. A., GALINDO, E., & SERRANO-CARREÓN, L. ***Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion.** *AMB Express*, 10(1): 163, 2020. doi: 10.1186/s13568-020-01101-8.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A.A., DVORKIN, M., KULIKOV, A.S., LESIN, V.M., NIKOLENKO, S.I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A.D., PYSHKIN, A.V., SIROTKIN, A.V., VYAHHI, N., TESLER, G., ALEKSEYEV, M.A., PEVZNER, P.A. **SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** *J. Comp. Biol.*, 19(5): 455-477, 2012. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.

BENITEZ, L.B. **Caracterização de peptídeos antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida.** Tese de Doutorado (Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 169f, 2010.

BERIĆ, T., KOJIC, M., STANKOVIĆ, S., TOPISIROVIC, L., DEGRASSI, G., MYERS, M., VENTURI, V., FIRA, D. **Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria.** *Food Technol. Biotechnol.*, 50: 25-31, 2012.

BLIN, K., SHAW, S., STEINKE, K., VILLEBRO, R., ZIEMERT, N., LEE, S.Y., MEDEMA, M.H., WEBER, T. **antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline.** *Nucleic Acids Res.*, 2;47(W1): W81-W87, 2019. doi: 10.1093/nar/gkz310.

BORRIS, R. **Towards a new generation of commercial microbial disease control and plant growth promotion products.** In: Principles of Plant-Microbe Interactions, Microbes for Sustainable Agriculture, ed. B. Lugtenberg, Berlin: Springer, 329-337, 2015.

CAULIER, S., NANNAN, C., GILLIS, A., LICCIARDI, F., BRAGARD, C., & MAHILLON, J. **Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group.** *Front. Microbiol.*, 10: 302, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00302.

CAVALCANTI, L.S., COELHO, R.S.B., PEREZ, J.O. **Reação de cultivares de batata-doce à podridão-do-pé, em condições de campo.** *Ciênc. Rural*, 32(4): 699-701, 2002.

CHEN, K., TIAN, Z., HE, H., LONG, C., JIANG, F. ***Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases.** *Biol. Control*, 151: 104419, 2020. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104419.

CHEN, K., TIAN, Z., LUO, Y., CHENG, Y., LONG, C. **Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against citrus green mold.** *Phytopathology*, 108: 1253-1262, 2018. doi: 10.1094/PHYTO-01-17-0032-R.

CHEN, L., SHI, H., HENG, J., WANG, D., BIAN, K. **Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2.** *Microbiol. Res.*, 218: 41-48, 2019. doi: 10.1016/j.micres.2018.10.002.

CHOWDHURY, S.P., HARTMANN, A., GAO, X.W., BORRIS, R. **Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review.** *Front. Microbiol.*, 6: 780, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.

CLARK, C.A., DAVIS, J.A., ABAD, J.A., CUELLAR, W.J., FUENTES, S., KREUZE, J.F., GIBSON, R.W., MUKASA, S.B., TUGUME, A.K., TAIRO, F.D., VALKONEN, J.P.T. **Sweet potato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases.** *Plant Dis.*, 96(2): 168-185, 2012.

CUI, L., YANG, C., WEI, L., LI, T., CHEN, X. **Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab.** *Biol. Control*, 141: 104156, 2020. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104156.

DE OLIVEIRA, C.A., COTA, L.V., MARRIEL, I.E., GOMES, E.A., DE SOUSA, S.M., LANA, U.G.P., DOS 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.** In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Milho e Sorgo nº 210, 20 p., Sete Lagoas-MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

EL SHEIKHA, A.F., RAY, R.C. **Potential impacts of bio-processing of sweet potato: Review.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57(3): 455-471, 2017. doi: 10.1080/10408398.2014.960909.

EL-METWALLY, S., HAMZA, T., ZAKARIA, M., HELMY, M. **Next-Generation sequence assembly: four stages of data processing and computational challenges.** *PLoS Comput. Biol.*, 9(12): e1003345, 2013.

ESCOBAR-ZEPEDA, A., VERA-PONCE DE LEÓN, A., SANCHEZ-FLORES, A. **The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics.** *Front. Genet.*, 6: 348, 2015. doi:10.3389/fgene.2015.00348.

FAO. **Faostat - Statistics Database.** Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>, [acessado em junho de 2021].

FASANELLA, C.C. **Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo.** (Tese de Doutorado em Ciências com ênfase em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

FIERER, N., JACKSON, J.A., VILGALYS, R., JACKSON, R. B. **Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7): 4117-4120, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.

FINKEL, O. M., CASTRILLO, G., HERRERA PAREDES, S., SALAS GONZÁLEZ, I., DANGL, J. L. **Understanding and exploiting plant beneficial microbes.** *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 38: 155-163, 2017. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.018.

FIRA, D., DIMKIĆ, I., BERIĆ, T., LOZO, J., STANKOVIĆ, S. **Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species.** *J. Biotechnol.*, 285: 44-55, 2018. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.

GAI, Y., MA, H., CHEN, X., ZHENG, J., CHEN, H., LI, H. **Stem blight, foot rot and storage tuber rot of sweet potato caused by *Plenodomus destruens* in China.** *J. Gen. Plant Pathol.*, 82: 181-185, 2016. doi:10.1007/s10327-016-0661-z.

GALINDO, E., SERRANO-CARREÓN, L., GUTIÉRREZ, C., ALLENDE, R., BALDERAS, K., PATIÑO, M., TREJO, M., WONG, M., RAYO, E., ISAURO, D., JURADO, C. **The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study.** *Elect. J. Biotechnol.*, 16: 5-5, 2013.

GARDES, M., BRUNS, T.D. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts.** *Mol. Ecol.*, 2(1): 113-118, 1993.

GRADY, E.N., MACDONALD, J., HO, M.T., WESELOWSKI, B., MCDOWELL, T., SOLOMON, O., RENAUD, J., YUAN, Z.C. **Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6.** *BMC Microbiol.*, 19(1): 5, 2019. doi: 10.1186/s12866-018-1380-8.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. **Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis.** *Palaeontol. Electron.*, 1: 9, 2001.

HEATHER, J.M., CHAIN, B. **The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA.** *Genomics*, 107(1): 1-8, 2016. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.

HEUER, H., WIELAND, J., SCHONFELD, J., SCHONWALDER, A., GOMES, N.C.M., SMALLA, K. “**Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis**” in *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* Horizon, ed. P. Rouchelle, (Wymondham, UK: Scientific Press), 177–190, 2001.

HUGHES, J. A., HOUGHTEN, S., ASHLOCK, D. **Restarting and recentering genetic algorithm variations for DNA fragment assembly: The necessity of a multi-strategy approach.** *Biosystems*, 150: 35-45, 2016. doi: 10.1016/j.biosystems.2016.08.001.

HUTCHINGS, M.I., TRUMAN, A.W., WILKINSON, B. **Antibiotics: past, present and future.** *Curr. Opin. Microbiol.*, 51: 72-80, 2019. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal – culturas temporárias e permanentes.** Vol. 46, 2019. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2019\\_v46\\_br\\_notas\\_tecnicas.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2019_v46_br_notas_tecnicas.pdf) [acessado em junho de 2021].

ISLAM, S., AKANDA, A.M., PROVA A., ISLAM, M.D.T., HOSSAIN, MD.M. **Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression.** *Front. Microbiol.*, 6: 1360, 2016b.

ISLAM, S.N., NUSRSAT, T., BEGUM, P., AHSAN, M. **Carotenoids and b-carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency.** *Food Chem.*, 199: 628-631, 2016a.

JACQUES, P. “**Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp.**” in *Microbiology*, ed. G. Soberón-Chávez, (Monographs, vol 20, Berlin: Springer), 2011.

JONGSTRA, R., MWANGI, M.N., BURGOS, G., ZEDER, C., LOW, J.W., MZEMBE, G., LIRIA, R., PENNY, M., ANDRADE, M.I., FAIRWEATHER-TAIT, S., ZUM FELDE, T., CAMPOS, H., PHIRI, K.S., ZIMMERMANN, M.B., WEGMÜLLER, R. **Iron Absorption from Iron-Biofortified Sweetpotato Is Higher Than Regular Sweetpotato in Malawian Women while Iron Absorption from Regular and Iron-Biofortified Potatoes Is High in Peruvian Women.** *J. Nutr.*, 150(12): 3094-3102, 2020. doi: 10.1093/jn/nxaa267.

KAMILOVA, F., OKON, Y., DE WEERT, S., HORA, K. **Commercialization of microbes: manufacturing, inoculation, best practice for objective field testing, and registration.** In: *Principles of Plant Microbe Interactions, Microbes for Sustainable Agriculture*, ed. B. Lugtenberg, Berlin: Springer, 319–327, 2015.

KEFI, A., BEN, I.S., KARKOUCH, I., RIHOUEY, C., AZAEIZ, S., BEJAOU, M., BELAID, R., COSETTE, P., JOUENNE, T., LIMAM, F. **Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(12): 1967-1976, 2015. doi: 10.1007/s11274-015-1943-x.

KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia, Volume 2: Doenças das plantas cultivadas.** 3. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

KREMER, F.S., ESLABÃO, M.R., DELLAGOSTIN, O.A., PINTO, L.D. **Genix: A new online automated pipeline for bacterial genome annotation.** *FEMS Microbiol. Lett.*, fnw263, 2016. doi: 10.1093/femsle/fnw263.

KUMAR, P.N., SWAPNA, T.H., REDDY, K.S., ARCHANA, K., NAGESHWAR, L., NALINI, S., KHAN, M.Y., HAMEEDA, B. **Draft Genome Sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain RHNK22, Isolated from Rhizosphere with Biosurfactant (Surfactin, Iturin, and Fengycin) and Antifungal Activity.** *Genome announc.*, 4(1): e01682-15, 2016. doi: 10.1128/genomeA.01682-15.

LACERDA, J.R.M. **Efeito da introdução de estirpes de *Bacillus* sp. produtoras de substâncias antimicrobianas na comunidade microbiana presente na rizosfera e na raiz de mudas de batata-doce (*Ipomoea batatas*).** 2016. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

LI, Y.G., GENG, X.B., JI, P.S., PAN, C.Q., WEI, S. **Isolation and evaluation of a *Bacillus methylotrophicus* strain for control of corn stalk rot.** *Biocontrol Sci. Techn.*, 26: 727–731, 2016.

LIN, S., HAMEED, A., LIU, Y., WEN, C., LAI, W., HSU, Y., YOUNG, C. ***Bacillus lycopersici* sp. nov., isolated from a tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.).** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65(7): 2085-2090, 2015. doi:10.1099/ijss.0.000223.

LIU, Y., TENG, K., WANG, T., DONG, E., ZHANG, M., TAO, Y., ZHONG, J. **Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize.** *J. Appl. Microbiol.*, 128: 242-254, 2020. doi: 10.1111/jam.14459.

LOPES, U. P., MICHEREFF, S. J. (ed.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos.** Universidade Federal e Rural de Pernambuco, 2018.

MARQUES, J.M., DA SILVA, T.F., VOLLU, R.E., BLANK, A.F., DING, G.C., SELDIN, L., SMALLA, K. **Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants.** *FEMS Microbiol. Ecol.* 88(2): 424-435, 2014.

MARQUES, K.R., TAVARES, A.T., LOPES, D.A.P.S., DOS SANTOS, G.R., MOMENTÉ, V.G., DO NASCIMENTO, I.R. **Resistência de genótipos de batata-doce ao mal-do-pé.** *Cultura Agronômica*, 27(2): 287-301, 2018.

MARQUES, J.M., DA SILVA, T.F., VOLLU, R.E., DE LACERDA, J.R.M., BLANK, A.F., SMALLA, K., SELDIN, L. **Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage.** *App. Soil Ecol.*, 96: 273-281, 2015.

MASSOL-DEYA, A.A., ODELSON, D.A., HICKEY, R.F., TIEDJE, J.M. **Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA).** In: Molecular Microbial Ecology Manual, 494pp. VAN DER ZIJPP, A.J., VAN ELSAS, J.D., DE BRUIJN, F. Netherlands: Springer, s3: 289-296, 1995. doi: 10.1007/978-94-011-0351-0\_20.

MATEUS, J.R., MARQUES, J.M., DAL'RIO, I., VOLLÚ, R.E., COELHO, M.R.R., SELDIN, L. **Response of the microbial community associated with sweet potato (*Ipomoea batatas*) to *Bacillus safensis* and *Bacillus velezensis* strains.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(4): 501-512, 2019. doi: 10.1007/s10482-018-1181-y.

MAXAM, A. M., GILBERT, W. **A new method for sequencing DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(2): 560–564, 1977.

MÉDIGUE, C., MOSZER, I. **Annotation, comparison and databases for hundreds of bacterial genomes.** *Res. Microbiol.*, 158: 724-736, 2007.

MENDES, L.S., PEREIRA, R.B., AMARO, G.B., PINHEIRO, J.B. **Reação de cultivares de batata-doce ao mal-do-pé.** In: Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2012.

MENEZES, E.L.A. **A Broca da batata-doce (*Eusepeles postfasciatus*): Descrição, bionomia e controle.** In: Circular Técnica da Embrapa Agrobiologia nº 6, p. 12. Seropédica, RJ, 2002.

MIKHAIL, M.S., ABDEL-ALIM, A.I., ABD-EL-KHAIR, H., ABDEL-GAIED, T. G., SHEREEN, A. M. **Host range and total cellular protein fingerprint of soft rot *Erwinia* isolated from some vegetables in Egypt.** *Plant Archives*, 19(1): 295-306, 2019.

MOHANRAJ, R., SIVASANKAR, S. **Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - a valuable medicinal food: A review.** *J. Med. Food*, 17(7): 1-9, 2014.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. **Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700, 1993.

NEELA, S., FANTA, S.W. **Review on nutritional composition of orange-fleshed sweet potato and its role in management of vitamin A deficiency.** *Food Sci. Nutr.*, 7(6), 1920–1945, 2019. doi:10.1002/fsn3.1063

NETO, A.R.S., SILVA, T.O, BLANK, A.F., SILVA, J.O., FILHO, R.N.A.F. **Produtividade de clones de batata doce em função de doses de nitrogênio.** *Horticultura Brasileira*, 35(3): 445-452, 2017. doi: 10.1590/s0102-053620170322.

NGUYEN, H.C., CHEN, C.C., LIN, K.H., CHAO, P.Y., LIN, H.H., HUANG, M.Y. **Bioactive Compounds, Antioxidants, and Health Benefits of Sweet Potato Leaves.** *Molecules*, 26(7): 1820, 2021. doi: 10.3390/molecules26071820.

NÜBEL, U., ENGELN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R.I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. **Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis.** *J. Bacteriol.*, 178 (19): 5636-5643, 1996.

OKADA, Y., YASUDA, K., SAKAI, T., ICHINOSE, K. **Sweet potato resistance to *Eusepeles postfasciatus* (Coleoptera: Curculionidae): larval performance adversely effected by adult's preference to tuber for food and oviposition.** *J. Econ. Entomol.*, 7(4): 1662-1673, 2014.

ONGENA, M., JACQUES, P. ***Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol.** *Trends Microbiol.*, 16: 115–125, 2008.

OVERBEEK, R., OLSON, R., PUSCH, G.D., OLSEN, G. J., DAVIS, J.J., DISZ, T., EDWARDS, R.A., GERDES, S., PARRELLO, B., SHUKLA, M., VONSTEIN, V., WATTAM, A.R., XIA, F., STEVENS, R. **The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST).** *Nucleic acids res.*, 42(Database issue): D206–D214, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1226.

PEREIRA, R.B, AMARO, G.B., RIBEIRO, M.C.V., PINHEIRO, J.B. **Reação de genótipos de batata-doce ao mal-do-pé (*Plenodomus destruens*).** In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, nº 122, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2014.

PEREIRA, R.B., FERNANDES, F.R., PINHEIRO, J.B. **Recomendações para manejo da podridão-do-pé em batata-doce.** In: Comunicado Técnico nº 79, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2011.

PÉREZ-GARCIA, A., ROMERO, D., DE VICENTE, A. **Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture.** *Curr. Opin. Biotech.* 22: 187–193, 2011.

PINHEIRO, J.B., RODRIGUES, C.S., CARVALHO, A.D.F., PEREIRA, R.B. **Nematoides na cultura da batata-doce.** In: Circular Técnica da Embrapa Hortaliças, nº 105. Brasília, DF, 2012.

QIAO, J.Q., WU, H.J., HUO, R., GAO, X.W., BORRIS, R. **Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum FZB42 engineered for improved action.** *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 1: 12, 2014.

RAHMA, A.A., SURYANTI, SOMOWIYARJO, S., JOKO, T. **Induced disease resistance and promotion of shallot growth by *Bacillus velezensis* B-27.** *Pak. J. Biol. Sci.*, 23(9): 1113-1121, 2020. doi: 10.3923/pjbs.2020.1113.1121.

REVA, O.N., LARISA, S.A., MWAKILILI, A.D., TIBUHWA, D., LYANTAGAYE, S., CHAN, W.Y., LUTZ, S., AHRENS, C.H., VATER, J., BORRIS, R. **Complete genome sequence and epigenetic profile of *Bacillus velezensis* UCMB5140 used for plant and crop protection in comparison with other plant-associated *Bacillus* strains.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(17): 7643-7656, 2020. doi: 10.1007/s00253-020-10767-w.

RICHARDSON, P. **Special issue: Next generation DNA sequencing.** *Genes*, 1(3): 385-387, 2010. doi:10.3390/genes1030385.

RONG, S., XU, H., LI, L., CHEN, R., GAO, X., XU, Z. **Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast.** *Pestic. Biochem. Physiol.*, 162:69-77, 2020. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.09.003.

ROTHBERG, J. M., HINZ, W., REARICK, T. M., SCHULTZ, J., MILESKI, W., DAVEY, M., *et al.* **An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing.** *Nature*, 348-352, 2011. doi: 10.1038/nature10242.

RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M.A., BARRELL, B. **Artemis: sequence visualization and annotation.** *Bioinformatics*, 16(10): 944-945, 2000.

SACHIN, N., TSANG, A., SHAANKER, R.U., DAYANANDAN, S. **Genome sequence resource of *Bacillus velezensis* EB14, a native endophytic bacterial strain with biocontrol potential against the poplar stem canker causative pathogen, *Sphaerulina musiva*.** *Phytopathology*, (1): PHYTO09200433A, 2021. doi: 10.1094/PHYTO-09-20-0433-A.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12): 5463-5467, 1977.

SAXENA, A.K., KUMAR, M., CHAKDAR, H., ANUROOPA, N., BAGYARAJ, D.J. ***Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition.** *J. Appl. Microbiol.*, 128(6): 1583-1594, 2019. doi: 10.1111/jam.14506.

SELDIN, L., DUBNAU, D. **Deoxyribonucleic acid homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans*, and other nitrogen-fixing *Bacillus* strains.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 35(2): 151-154, 1985.

SILVA, J.B.C, LOPES, C.A., MAGALHÃES, J.S. **Batata-doce (*Ipomoea batatas*).** In: Sistemas de Produção nº 6, versão eletrônica. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2008.

SMIT, E., LEEFLANG, P., GLANDORF, B., VAN ELSAS, J.D., WERNARS, K. **Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2614–2621, 1999.

SNYDER, A.B., WOROBO, R.W. **Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety.** *J. Sci. Food Agric.*, 94(1): 28-44, 2014.

STOICA, R., MOSCOVICI, M., TOMULESCU, C., CĂȘĂRICĂ, A., BĂBEANU, N., POPA, O. KAHRAMAN, H. **Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review.** *Rom. Biotechnol. Lett.*, 24: 1111-1119, 2019. doi: 10.25083/rbl/24.6/1111.1119.

SUMI, C.D., YANG, B.W., YEO, I.C., HAHM Y.T. **Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics.** *Can. J. Microbiol.*, 61(2):93-103, 2015. doi: 10.1139/cjm-2014-0613.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos/NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl., 161 p., Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011.

TEIXEIRA, G.M., MOSELA, M., NICOLETTO, M.L.A., RIBEIRO, R.A., HUNGRIA, M., YOUSSEF, K., HIGASHI, A.Y., MIAN, S., FERREIRA, A.S., GONÇALVES, L.S.A., PEREIRA, U.P., OLIVEIRA, A.G. **Genomic insights into the antifungal activity and plant growth-promoting ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490.** *Front. Microbiol.*, 15(11): 618415, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2020.618415.

TIWARI, R., KALRA, A., DAROKAR, M.P., CHANDRA, M., AGGARWAL, N., SINGH, A. K., KHANUJA, S.P.S. **Endophytic bacteria from *Ocimum sanctum* and their yield enhancing capabilities.** *Curr. Microbiol.*, 60: 167–171, 2010.

TIWARI, S., PRASAD, V., LATA, C. **Chapter 3 - *Bacillus*: plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment.** In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, ed. Elsevier, 1ª ed., 45-55, 2019. doi: 10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1.

VALENZUELA-RUIZ, V., ROBLES-MONTOYA, R.I., PARRA-COTA, F.I. SANTOYO G, DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA M, RODRÍGUEZ-RAMÍREZ R, DE LOS SANTOS-VILLALOBOS S. **Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico.** *3 Biotech.*, 9(11): 436, 2019. doi:10.1007/s13205-019-1972-5.

WEI, H., OKUNISHI, S., YOSHIKAWA, T., KAMEI, Y., DAWWODA, M.A., SANTANDER-DE LEON, S.M., NUÑAL, S.N., MAEDA, H. **Synergistic effect of photosynthetic bacteria and isolated bacteria in their antifungal activities against root rot fungi.** *Biocontrol Sci.*, 21(3): 173-7, 2016. doi: 10.4265/bio.21.173.

WHITE, T.J., BRUNS, T.D., LEE, S., TAYLOR, J. **Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes.** In: PCR Protocols: a Guide to Methods

and Applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). Academic Press, 315-322, 1990.

WIEDMANN, M., ZHANG, W. **Food microbiology and food safety: genomics of foodborne bacterial pathogens**. New York: Springer, 1<sup>a</sup> ed., 2011.

WILLIAMS, R., SOARES, F., PEREIRA, L., BELO, B., SOARES, A., SETIAWAN, A., BROWNE, M., NESBITT, H., ERSKINE, W. **Sweet potato can contribute to both nutritional and food security in Timor-Leste**. *Field Crops Res.*, 146: 38-43, 2013.

WU, L., WU, H.-J., QIAO, J., GAO, X., BORRISS, R. **Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants**. *Front. Microbiol.*, 6: 1395, 2015.

XIAO, L., WAN, J.W., YAO, J.H., FENG, H., WEI, L.H. **Effects of *Bacillus cereus* strain Jdm1 on *Meloidogyne incognita* and the bacterial community in tomato rhizosphere soil**. *3 Biotech.*, 8(8): 319, 2018. doi: 10.1007/s13205-018-1348-2.

XU, B. H., LU, Y. Q., YE, Z. W., ZHENG, Q.W., WEI, T., LIN, J.F., GUO, L.Q. **Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15**. *PLoS One*, 13(8): e0202893, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0202893.

XU, Z., ZHANG, R., WANG, D., QIU, M., FENG, H., ZHANG, N., SHEN, Q. **Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (9): 2941-2950, 2014.

YUAN, J., LI, B., ZHANG, N., WASEEM, R., SHEN, Q., HUANG, Q. **Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens**. *Agric. Food Chem.*, 60: 2976–2981, 2012.

ZENGZHI, S., BING, D., JINXI, H., SHAOZHEN, H., QINGCHANG, L., HONG, Z. **A genome-wide BAC-end sequence survey provides first insights into sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genome composition**. *BMC Genomics*, 17: 945, 2016. doi: 10.1186/s12864-016-3302-1

ZHU, Z., PENG, Q., MAN, Y., LI, Z., ZHOU, X., BAI, L., PENG, D. **Analysis of the antifungal properties of *Bacillus velezensis* B-4 through a bioassay and complete-genome sequencing**. *Front. Genet.*, 16(11): 703, 2020. doi: 10.3389/fgene.2020.00703.

## 10. ANEXOS

### 10.1. MEIOS DE CULTURA

- TSB (*Tryptic Soy Broth*, Difco)

---

TSB	40g
Água destilada q.s.p	1L

---

- TSA (*Trypticase Soy Agar*, Difco)

---

TSB	40g
Água destilada q.s.p	1L
Ágar	1,5% (p/v)

---

- BDA (Batata-Dextrose Agar, Difco)

---

BDA	39g
Água destilada q.s.p	1L

---

### 10.2. TAMPÕES

- Tampão TBE 10X concentrado

---

Tris base (Sigma)	107,6g
EDTA	7,3g
Ácido bórico	55g
Água destilada q.s.p.	1000ml
pH 8,2	

---

- Tampão TE 10X concentrado

Tris	1,21g
EDTA	0,37g
Água destilada q.s.p.	1L
pH 7,8	

- Tampão TAE 50X concentrado

Tris base (Sigma)	60,5g
Ácido acético glacial	14,28ml
EDTA (0,5M pH8,0)	25ml
Água destilada q.s.p.	250ml

Após o preparo as soluções foram esterilizadas por autoclave no período de 15min a 121°C e estocadas em temperatura ambiente.

### 10.3. INICIADORES

- Par de iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR para amplificação de parte do gene *rrs*

Iniciadores	Sequência	Referência
pA ( <i>forward</i> ) <sup>1</sup>	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	MASSOL-DEYA <i>et al.</i> , 1995
pH ( <i>reverse</i> ) <sup>2</sup>	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'	MASSOL-DEYA <i>et al.</i> , 1995

<sup>1</sup> Temperatura de desnaturação - TM = 66,93°C; <sup>2</sup> TM = 77,24°C.

- Par de iniciadores utilizados nas reações de *nested* PCR para amplificação de regiões intergênicas (ITS) para análise da comunidade fúngica total (1ª reação<sup>1,2</sup> e 2ª reação<sup>3,4</sup>)

Iniciadores	Sequência	Referência
EF4 <sup>1</sup> ( <i>forward</i> ) <sup>5</sup>	5' GGAAGGGRTGTATTTATTAG 3'	SMIT <i>et al.</i> , 1999
ITS4 <sup>2</sup> ( <i>reverse</i> ) <sup>6</sup>	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	GARDES & BRUNS, 1993
ITS 1f <sup>3</sup> ( <i>forward</i> ) <sup>7</sup>	Grampo GC*+5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3'	GARDES & BRUNS, 1993
ITS 2 <sup>4</sup> ( <i>reverse</i> ) <sup>8</sup>	5'GCTCGCTTCTTCATCGATGC 3'	WHITE <i>et al.</i> , 1990

\* 5'CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG 3'

<sup>5</sup> TM = 56°C; <sup>6</sup> TM = 67,35°C; <sup>7</sup> TM = 62,38°C; <sup>8</sup> TM = 73,14°C; TM (Grampo GC) = 110,73°C.

- Par de iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação de parte do gene *rrs* para análise da comunidade bacteriana total.

Iniciadores	Sequência	Referência
U968 ( <i>forward</i> ) <sup>1</sup>	grampo GC * + 5'ACCGCGAAGAACCTTAC 3'	NÜBEL <i>et al.</i> , 1996
L1401 ( <i>reverse</i> ) <sup>2</sup>	5' GCGTGTGTACAAGACCC 3'	NÜBEL <i>et al.</i> , 1996

\* 5'CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG 3'

<sup>1</sup> TM = 63,73°C; <sup>2</sup> TM = 63,52°C; TM (Grampo GC) = 110,73°C.

- Par de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real para amplificação da comunidade fúngica total.

Iniciadores	Sequência	Referência
ITS 1f ( <i>forward</i> ) <sup>1</sup>	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	FIERER <i>et al.</i> , 2005
5.8s ( <i>reverse</i> ) <sup>2</sup>	5' CGCTGCGTTCTTCATCG 3'	FIERER <i>et al.</i> , 2005

<sup>1</sup> Temperatura de desnaturação - TM = 62°C; <sup>2</sup> TM = 54 °C.

## 10.4. TRABALHOS E CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS GERADAS DURANTE O DOUTORADO

### 10.4.1 ARTIGOS COMO PRIMEIRA AUTORA

- ARTIGO 1 - Situação: Publicado

Antonie van Leeuwenhoek  
<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1181-y>



ORIGINAL PAPER

### **Response of the microbial community associated with sweet potato (*Ipomoea batatas*) to *Bacillus safensis* and *Bacillus velezensis* strains**

Jackeline Rossetti Mateus · Joana Montezano Marques · Isabella Dal’Rio · Renata Estebanez Vollú · Marcia Reed Rodrigues Coelho · Lucy Seldin 

#### **Abstract**

Sweet potato is a subsistence crop cultivated worldwide. Although it is generally considered tolerant to different diseases, it is quite susceptible to the fungus *Plenodomus destruens* that causes foot-rot disease. Plant growth-promoting bacteria associated with sweet potato remain poorly studied, but some *Bacillus* strains may have potential as biological control agents. Here, we evaluate the persistence of two bacterial strains—*Bacillus safensis* T052-76 and *Bacillus velezensis* T149-19—in pot experiments and assess their impact on indigenous bacterial and fungal communities associated with sweet potato. Numbers of cells of both strains introduced into pots remained stable in the rhizosphere of sweet potato over the 180-day experiment. Denaturing gradient gel electrophoresis based on the *rrs* gene encoding bacterial 16S rRNA and the fungal ribosomal internal transcribed spacer region showed that bands corresponding to the introduced strains were not detected in plant endosphere. PERMANOVA and non-metric multidimensional scaling statistical analyses showed that: (1) strain T052-76 altered the structure of the indigenous bacterial community (rhizosphere and soil) more than strain

T149-19; (2) T052-76 slightly altered the structure of the indigenous fungal community (rhizosphere and soil) and (3) strain T149-19 did not disturb the fungal community. Our results demonstrate the stability of both *Bacillus* strains in the sweet potato rhizosphere and, apart from the influence of *B. safensis* T052-76 on the bacterial community, their limited impact on the microbial community associated with this important crop plant.

**Keywords:** Sweet potato, *Bacillus safensis*, *Bacillus velezensis*, microbial community.

- **Artigo 2 - Situação: Submetido**

Editorial Assignment  
Original Research

**Bacillus velezensis T149-19 and Bacillus safensis T052-76 as potential biocontrol agents against foot rot disease in sweet potato**

Jackeline Rossetti Mateus, Isabella Dal'rio, Diogo De Azevedo Jurelevicius, Fabio Faria Da Mota, Joana Montezano Marques, Rommel Thiago Juca Ramos, Artur Luiz da Costa da Silva, Paulo Gagliardi and LUCY SELDIN



Frontiers in Microbiology  
Microbe and Virus Interactions with Plants

Submitted on  
19/04/2021

Editorial Assignment on  
19/04/2021

## Abstract

Sweet potato (*Ipomoea batatas*) is a perennial and drought-resistant plant, and its tuberous roots are rich in vitamins and carbohydrates, especially starch. Sweet potato is used for human consumption, animal feed, and various industrial products. However, the crop is susceptible to various pests and diseases, including foot rot disease caused by the phytopathogenic fungus *Plenodomus destruens*, which can cause the total loss of production. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species is widely disseminated in agrosystems, but specific biological agents against the foot rot disease-causing fungus is not yet available. Our previous studies showed that two *Bacillus* strains isolated from sweet potato roots – *B. safensis* T052-76 and *B. velezensis* T149-19 – were able to inhibit *P. destruens in vitro*, but data from *in vivo* experiments using simultaneously the fungus and the bacteria were missing. In this study, both strains were

shown to protect the plant from the disease and to mitigate the symptoms of foot rot disease in pot experiments. Total fungal community quantification using real-time PCR showed a significant decrease in the number of copies of the ITS gene when the bacteria were inoculated, compared to the control (with the fungus only). To determine the genes encoding antimicrobial substances likely to inhibit the fungus, their genomes were sequenced and annotated. Genes coding for mycosubtilin, bacillaene, macrolactin, bacillibactin, bacilysin, plantazolicin, plipastatin, difcidine, fengycin and surfactin were found in *B. velezensis* T149-19, while those coding for bacylisin, lichenysin, bacillibactin, fengycin and surfactin were found in *B. safensis* T052-76. Altogether, the data presented here contribute to advancing the knowledge for the use of these *Bacillus* strains as biocontrol products in sweet potato.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*; *Bacillus safensis*; *Plenodomus destruens*; foot rot disease; biocontrol; sweet potato

#### 10.4.2 ARTIGOS PUBLICADOS COMO CO-AUTORA



Biological Control  
Volume 152, January 2021, 104460



## A pipeline for the genetic improvement of a biological control agent enhances its potential for controlling soil-borne plant pathogens

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes <sup>a, c</sup> ✉, Maythsulene Inacio de Sousa Oliveira <sup>a</sup>, Jackeline Rossetti Mateus <sup>b</sup>, Lucy Seldin <sup>b</sup>, Valacia Lemes Silva-Lobo <sup>a</sup>, Denise Maria Guimarães Freire <sup>c</sup> ✉

<sup>a</sup> Embrapa Rice and Beans, Brazilian Agricultural Research Corporation, Santo Antônio de Goiás-GO 75375-000, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Genética Microbiana, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 14 July 2020, Revised 11 October 2020, Accepted 13 October 2020, Available online 15 October 2020.



# Resistome in Lake Bolonha, Brazilian Amazon: Identification of Genes Related to Resistance to Broad-Spectrum Antibiotics

Jorianne Alves<sup>1</sup>, Larissa Dias<sup>1</sup>, Jackeline Mateus<sup>2</sup>, Joana Marques<sup>1</sup>, Diego Graças<sup>1</sup>, Rommel Ramos<sup>1</sup>, Lucy Seldin<sup>2</sup>, Isabel Henriques<sup>3,4</sup>, Artur Silva<sup>1</sup> and Adriana Folador<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genômica e Bioinformática, Centro De Genômica e Biologia de Sistemas, Universidade Federal Do Pará, Belém, Brazil, <sup>2</sup> Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup> Center for Environmental and Marine Studies (CESAM), University of Aveiro, Aveiro, Portugal, <sup>4</sup> Department of Life Sciences, Faculty of Science and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

## Nitrogen Fixing and Phosphate Mineralizing Bacterial Communities in Sweet Potato Rhizosphere Show a Genotype-Dependent Distribution

by  Joana Montezano Marques<sup>1</sup> ✉,  Jackeline Rossetti Mateus<sup>2</sup> ✉,  Thais Freitas da Silva<sup>2</sup> ✉,  Camila Rattes de Almeida Couto<sup>2</sup> ✉,  Arie Fitzgerald Blank<sup>3</sup> ✉ and  Lucy Seldin<sup>2,\*</sup> ✉ 

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Genômica e Biologia de Sistemas, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, CEP 66.075-110, Belém, PA, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon S/N, CEP 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*Diversity* 2019, 11(12), 231; <https://doi.org/10.3390/d11120231>

Received: 23 October 2019 / Revised: 20 November 2019 / Accepted: 28 November 2019 / Published: 3 December 2019

(This article belongs to the Special Issue **Genetic Diversity of Soil Bacterial Communities**)

Short communication

## Cultivable bacterial communities associated with roots of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) with the potential to contribute to plant growth

Thais Freitas da Silva <sup>a</sup>, Renata Estebanez Vollú <sup>a</sup>, Beatriz do Carmo Dias <sup>a</sup>, Jackeline Rossetti Mateus de Lacerda <sup>a</sup>, Joana Montezano Marques <sup>a, b</sup>, Marília Martins Nishikawa <sup>c</sup>, Fátima Regina de Vasconcelos Goulart <sup>a</sup>, Celuta Sales Alviano <sup>a</sup>, Lucy Seldin <sup>a</sup>  

<sup>a</sup> Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

de Lacerda et al. *SpringerPlus* (2016) 5:828  
DOI 10.1186/s40064-016-2596-4



RESEARCH

Open Access

## Generally recognized as safe (GRAS) *Lactococcus lactis* strains associated with *Lippia sidoides* Cham. are able to solubilize/mineralize phosphate



Jackeline Rossetti Mateus de Lacerda<sup>1†</sup>, Thais Freitas da Silva<sup>1†</sup>, Renata Estebanez Vollú<sup>1</sup>, Joana Montezano Marques<sup>1,2</sup> and Lucy Seldin<sup>1,3\*</sup> 