

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Avaliação de bactérias selecionadas por ecologia reversa no crescimento
inicial do milho sob déficit hídrico**

Mirelly Jady Fernandes e Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

MIRELLY JADY FERNANDES E SILVA

Avaliação de bactérias selecionadas por ecologia reversa no crescimento inicial do milho sob déficit hídrico

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Mateus Ferreira Santana

Coorientadores: Polyana Pizzi Rotta
Mauricio Dutra Costa
Fábio Andrade Teixeira

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586a
2025

Silva, Mirelly Jady Fernandes e, 1997-
Avaliação de bactérias selecionadas por ecologia reversa no
crescimento inicial do milho sob déficit hídrico / Mirelly Jady
Fernandes e Silva. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (62 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Mateus Ferreira Santana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2025.

Referências bibliográficas: f. 39-46.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.839>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bactérias. 2. Rizosfera - Efeito das bactérias. 3. Milho -
Resistência à seca - Efeito das bactérias. I. Santana, Mateus
Ferreira, 1983-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.1757

MIRELLY JADY FERNANDES E SILVA

Avaliação de bactérias selecionadas por ecologia reversa no crescimento inicial do milho sob déficit hídrico

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de setembro de 2025.

Assentimento:

Mirelly Jady Fernandes e Silva
Autora

Mateus Ferreira Santana
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 15/01/2026 às 21:23:59 e pelo orientador em 16/01/2026 às 16:28:20. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **N6SY.U9ME.UT81** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, que sempre fazem de tudo pela minha felicidade e pela da minha irmã, vocês são o melhor lugar do mundo.

À minha irmã e amiga Mylena, que sempre melhora meu humor. À memória da minha avó Dedé, pelo apoio durante a graduação, pelo abundante amor que nos ofereceu.

Ao meu amor, Pedro, que divide a rotina comigo com companheirismo, bondade e compreensão, tornando o caminho mais leve.

Aos meus sogros, que sempre apoiam nossos estudos.

Aos meus tios Edmilson, Marilda e Uéber. Ao Gustavo, à Larissa, ao Arthur e ao Arthurzinho. Às minhas princesas que acabaram de chegar, Aura Liz e Catarina, a quem tenho todo o amor do mundo para compartilhar.

Aos meus amigos do Clube do Livro, ao Marcos, à Júlia, à Camila e aos amigos do Micolab e do LIVM, pelo companheirismo e incentivo constantes.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar esta pós-graduação e pelo ambiente que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos e ao Grupo de Genômica Eco-Evolutiva Microbiana, pelo acolhimento e pelos conhecimentos compartilhados. Ao Professor Mateus Ferreira Santana, pela orientação sempre solícita, pelo alto astral e pelo profissionalismo. Ao Luciano, pelas conversas, pelos ajustes que aprimoraram este trabalho e pela amizade. À Giovana, ao Guilherme e ao Osiel, por todo o apoio que me ofereceram.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SILVA, Mirelly Jady Fernandes e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2025. **Avaliação de bactérias selecionadas por ecologia reversa no crescimento inicial do milho sob déficit hídrico.** Orientador: Mateus Ferreira Santana. Coorientadores: Polyana Pizzi Rotta, Mauricio Dutra Costa e Fábio Andrade Teixeira.

Para garantir uma produtividade agropecuária eficiente e sustentável, diferentes estratégias vêm sendo estudadas. Sabe-se que a alimentação é um dos principais fatores que influenciam o desempenho animal; por outro lado, o período de seca é um desafio para a qualidade das culturas agrícolas. Uma estratégia para mitigar este problema é aproveitar a biodiversidade natural por meio da prospecção de microrganismos. Bactérias que habitam a rizosfera são capazes de auxiliar as plantas no enfrentamento da seca. No entanto, a seleção de microrganismos promotores de crescimento ainda é um processo pouco viável em larga escala. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo utilizar ferramentas de bioinformática baseadas em ecologia reversa para otimizar a seleção de microrganismos para promoção de crescimento de milho em déficit hídrico. No primeiro momento, 53 gêneros bacterianos com genomas depositados em bancos de dados públicos foram avaliados *in silico* quanto ao seu potencial em promover o crescimento do milho. Dos genomas avaliados, 12 gêneros apresentaram resultados para interações ecológicas positivas com a planta. Diante desses resultados, isolados representantes desses gêneros pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos e do Grupo de Ecologia eco-evolutiva Microbiana foram sequenciados. Após o sequenciamento, uma nova rodada de análises de ecologia reversa foi realizada, o que permitiu selecionar os isolados C90B, PE4A, SOY1 e SOY8 como os mais promissores. Os genomas de SOY1 e SOY8 revelaram BGCs relacionados à tolerância vegetal ao estresse abiótico, como o soluto compatível ectoína. Em PE4A, foram identificados todos os genes típicos de fixação biológica de nitrogênio. Já C90B exibiu uma diversidade de genes relacionados à neutralização do estresse oxidativo. No ensaio de germinação com redução de disponibilidade hídrica, PE4A e C90B elevaram a taxa de velocidade em -0,3 MPa. Já em -0,6 MPa, C90B e SOY8 se destacaram. No ensaio em casa de vegetação, 45 DAS, a inoculação promoveu o crescimento radicular sob déficit hídrico em 60% e 40% da CV. Ademais, SOY8 aumentou a massa seca de raiz em todas as condições, e sob 60% e 40% da CV, C90B e PE4A superaram o controle negativo. A ecologia reversa é uma abordagem recente, portanto pouco explorada na agricultura. Este trabalho demonstra seu potencial ao integrá-la a outras

ferramentas genômicas, permitindo a seleção de bioinsumos de forma mais eficiente e rápida.

Palavras-chave: déficit hídrico; rizosfera; prospecção microbiana; ecologia reversa

ABSTRACT

SILVA, Mirelly Jady Fernandes e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2025. **Evaluation of bacteria selected by reverse ecology on early maize growth under water deficit.** Adviser: Mateus Ferreira Santana. Co-advisers: Polyana Pizzi Rotta, Mauricio Dutra Costa and Fábio Andrade Teixeira.

Several strategies have been investigated to ensure efficient and sustainable agricultural and livestock productivity. Nutrition is one of the main factors influencing animal performance; however, the dry season represents a major challenge for maintaining the quality of agricultural crops. One effective strategy to mitigate this issue is to harness natural biodiversity by prospecting for microorganisms. Rhizosphere-inhabiting bacteria can help plants cope with drought stress. Nevertheless, the selection of plant growth-promoting microorganisms is not easily scalable. In this context, this study applied reverse-ecology-based bioinformatic tools to optimize the selection of microorganisms capable of promoting maize growth under water deficit conditions. First, 53 bacterial genera with publicly available genomes were evaluated *in silico* for their potential to promote maize growth. Among these, 12 genera demonstrated positive predicted ecological associations with plants. Based on these results, representative isolates from these genera belonging to the culture collections of the Laboratory of Molecular and Microbial Genetics and the Microbial Eco-evolutionary Ecology Group were selected for sequencing. Following sequencing, another round of reverse-ecology analyses enabled the identification of C90B, PE4A, SOY1, and SOY8 as the most promising isolates. The genomes of SOY1 and SOY8 contained BGCs associated with plant tolerance to abiotic stress, such as the compatible solute ectoine. In PE4A, all canonical genes required for biological nitrogen fixation were identified. C90B exhibited a diverse repertoire of genes involved in oxidative stress mitigation. In the germination assay under reduced water availability, PE4A and C90B increased the germination speed index at -0.3 MPa, whereas at -0.6 MPa, C90B and SOY8 were the most effective. The inoculation promoted root growth under water deficit at 60% and 40% WHC. Additionally, SOY8 increased root dry mass under all conditions, and at both 60% and 40% WHC, C90B and PE4A outperformed the negative controls. Reverse ecology is a recent and underexplored approach in agriculture. This study highlights its potential by integrating it with genomic analyses, enabling a more efficient and faster selection of microbial inoculants.

Keywords: water stress; rhizosphere; microbial prospecting; reverse

ecology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Impactos do déficit hídrico no milho	11
2.2 Qualidade nutricional das forragens	12
2.3 Promoção de crescimento vegetal e bioinoculantes	13
2.4 Ecologia reversa	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Abordagens de ecologia reversa para a seleção genômica de isolados bacterianos	17
3.2 Reativação e manutenção de cultura	18
3.3 Extração de DNA e sequenciamento genômico	18
3.4 Identificação dos isolados	19
3.5 Identificação de clusters de genes biossintéticos e predição funcional de genes	19
3.6 Tratamento de sementes	19
3.7 Ensaio de germinação	20
3.8 Promoção de crescimento vegetal em déficit hídrico	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Valor médio do suporte biossintético de gêneros de bactérias em relação a <i>Zea mays</i>	21
4.2 Ensaio de germinação	22
4.3 Seleção dos isolados bacterianos com os maiores valores de suporte biossintético obtidos em análises par a par entre genomas sequenciados e <i>Zea mays</i>	24
4.4 Perfil de clusters biossintéticos relacionados à tolerância ao estresse abiótico nos isolados	25
4.5 Análise filogenômica	26
4.6 Identificação de compostos relacionados a <i>seeds</i> suportadas	29
4.7 Anotação funcional da assimilação de nitrogênio	30
4.8 Perfil genômico de tolerância ao estresse abiótico dos isolados	31
4.9 Identificação de características gerais de promoção de crescimento	32
4.10 Promoção de crescimento em déficit hídrico	33
4.11 Ecologia reversa como abordagem de seleção de RPCP	37
5. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	47

1. INTRODUÇÃO

Garantir alta produtividade e segurança alimentar, preservando biodiversidade e solo, é um dos principais objetivos dos sistemas agropecuários modernos. No entanto, é necessário enfrentar desafios ambientais e econômicos (Çakmakçı *et al.*, 2023). Dentre os desafios ambientais, destaca-se o déficit hídrico que é um dos estressores abióticos mais severos para a fisiologia vegetal, que dificulta a captação de nutrientes pelas plantas e, consequentemente, compromete a produtividade (Kopeć, 2024). Dessa forma, é necessário otimizar o uso da água no contexto das mudanças climáticas, especialmente porque a demanda hídrica nos sistemas agrícolas corresponde a mais de dois terços do uso de água doce no mundo (Murtaza *et al.*, 2024).

No que diz respeito aos desafios econômicos, o Brasil depende da importação de fertilizantes, especialmente do NPK (nitrogênio, fósforo e potássio). O país responde por cerca de 6% da demanda global, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, da China e da Índia (Farias *et al.*, 2020). Somado a isso, o preço do nitrogênio, nutriente mais exigido pelas plantas, subiu mais de 12% no primeiro trimestre de 2025 e está constantemente sujeito a flutuações, devido ao elevado custo de produção e às instabilidades políticas (World Bank, 2025).

Para superar esses desafios, pesquisadores têm estudado melhorias na fertilização do solo, irrigação, melhoramento genético e modernização das práticas agronômicas em geral. Uma estratégia promissora é aproveitar a biodiversidade natural, utilizando rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP). As RPCP têm o potencial de aumentar a eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas, reduzir a dependência de insumos químicos e atenuar os efeitos de estresses bióticos e abióticos (Gómez-Godínez *et al.*, 2023).

Na cultura da soja, o Brasil tem usufruído de benefícios ambientais e econômicos da fixação biológica de nitrogênio (FBN), por meio da inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* spp. em leguminosas. No período entre 2019 e 2020, a utilização de FBN em substituição a N-ureia economizou mais de 15 bilhões de dólares e reduziu a emissão de gases de efeito estufa. A expectativa é que os bons resultados obtidos com a FBN sejam estendidos a outras culturas agrícolas (Telles *et al.*, 2023).

Em um estudo conduzido com um bioinoculante de *Priestia aryabhattai* (basônimo: *Bacillus aryabhattai*), desenvolvido especificamente para mitigar os efeitos

da seca, sementes de milho foram inoculadas e, após o estabelecimento das plântulas, estas foram submetidas a déficit hídrico e alta salinidade. As plantas inoculadas apresentaram melhores trocas gasosas, maior taxa de assimilação de CO₂ e condutância estomática (Castelo Sousa *et al.*, 2023). Em outro estudo, a inoculação com *Priestia aryabhatai* aumentou a produtividade do milho sob diferentes níveis de irrigação e sugeriu que a bactéria oferece proteção à planta, promovendo o desenvolvimento radicular (Shahid *et al.*, 2022).

Contudo, o isolamento de RPCP é limitado por microrganismos ainda não cultiváveis e pelo longo processo de prospecção microbiana até a formulação do biofertilizante, o que é demorado e, consequentemente, pouco viável em larga escala (Ibáñez *et al.*, 2023). Com os avanços da genômica, tornaram-se possíveis novas abordagens para acelerar o processo de seleção de RPCP, utilizando ferramentas de bioinformática que elucidam aspectos funcionais dos genes de promoção do crescimento em plantas, vias metabólicas e estudos independentes de cultivo. Essas técnicas permitem descobrir interações ainda desconhecidas e investigar um grande número de microrganismos simultaneamente (Priya *et al.*, 2021).

A ecologia reversa, portanto, é uma abordagem que utiliza informações genômicas para inferir sobre potenciais trocas metabólicas entre organismos. Inicialmente, foi testada para interações planta-patógeno (Levy; Borenstein, 2012) e, atualmente, vem sendo estudada em pesquisas na área agrícola (Gonçalves *et al.*, 2022). Neste contexto, este estudo utiliza a ecologia reversa integrada a outras ferramentas de prospecção genômica para selecionar bactérias que promovam o crescimento do milho forrageiro sob baixa disponibilidade de água.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Impactos do déficit hídrico no milho

Na produção animal, plantas forrageiras mais bem nutridas são consideradas de alta qualidade e fornecem maior nutrição para o gado, promovendo melhora na saúde e no desempenho animal (Katoch, 2023). O milho (*Zea mays*) é uma forragem com excelente aproveitamento, podendo ser utilizado como grão, silagem de planta inteira ou na formulação de rações e subprodutos industriais (Erenstein *et al.*, 2022). Essa cultura possui uma janela de plantio recomendada pelo Zoneamento Agrícola de Risco Climático (ZARC), do Ministério da Agricultura e Pecuária, que normalmente ocorre entre os meses de outubro e dezembro, coincidindo com o início do período chuvoso (Zoneamento Agrícola de Risco Climático [s.d.]). Isso porque a escassez de água prejudica todas as fases do desenvolvimento do milho (Deribe, 2025) e reduz a resposta da planta à adubação nitrogenada (Donovan *et al.*, 2025), sendo estes os principais fatores limitantes para a produção de milho (Flynn *et al.*, 2023).

Especialmente durante a germinação, o déficit hídrico dificulta o estabelecimento das plântulas, visto que a hidratação é essencial para a ativação das enzimas hidrolíticas que degradam as reservas da semente. Dessa forma, em períodos de seca, é comum observar alta mortalidade de mudas (Miransari; Smith, 2014; Rida *et al.*, 2021). O primeiro órgão a ser afetado pela redução na disponibilidade de água é a raiz, que detecta alterações no potencial hídrico e modifica o potencial de pressão nas células radiculares. Sob estresse leve a moderado, as raízes realizam ajustes osmóticos e tendem a aumentar o seu crescimento de forma exploratória em busca de água e nutrientes. Desse modo, a raiz adia os efeitos do déficit hídrico na parte aérea (Kou *et al.*, 2022). Observa-se a alteração da proporção parte aérea-raiz, na qual o número de folhas, comprimento e área foliar são reduzidos enquanto ocorre o crescimento radicular (Cheng *et al.*, 2021). Além disso, aspectos fisiológicos são comprometidos durante a seca, tais como a taxa fotossintética, a assimilação de CO₂ e a eficiência de uso da água. Sendo assim, o milho apresenta menor crescimento vegetativo, modificação no desenvolvimento das raízes e redução da massa seca (Deribe, 2025).

A resposta fisiológica vegetal imediata para a maioria dos estresses abióticos ocorre antes mesmo da identificação do tipo de estresse e é semelhante em diferentes casos de perturbação. Primeiro, a alteração no potencial osmótico no apoplasto é

percebida por proteínas da membrana plasmática, o que dispara uma cascata de sinalizações intracelulares. Logo, a concentração de Ca^{2+} citosólico e a produção controlada de espécies reativas de oxigênio (ROS) são aumentadas. Em conjunto com outros sinalizadores, induzem a biossíntese de ácido abscísico (ABA), responsável por promover o controle da abertura estomática (Bhattacharya, 2021).

Durante a resposta das plantas à seca, ABA se liga a receptores que induzem a ativação de canais iônicos, causando perda de turgor na folha e redução da abertura estomática. Consequentemente, a captação de CO_2 é limitada e a assimilação fotossintética reduzida (Blatt *et al.*, 2017). Induzida pelos altos níveis de ABA, a célula aumenta a biossíntese de proteínas do tipo LEA (proteínas abundantes na embriogênese tardia) que protegem a célula contra a agregação de proteínas devido ao estresse osmótico, antioxidantes e solutos compatíveis que atuam na proteção da integridade celular. Assim, ocorre o acúmulo intracelular de prolina, soluto compatível mais bem estudado na fisiologia vegetal, que favorece a osmorregulação, protege a atividade enzimática e proteínas de membrana (Renzetti *et al.*, 2024), além de promover a aclimação da planta (Yan *et al.*, 2025).

As respostas fisiológicas logo se traduzem em respostas morfológicas com a redução do crescimento vegetal. A escassez de água no início do crescimento pode prejudicar todas as outras fases do desenvolvimento do milho (Song *et al.*, 2019). Além disso, a água é essencial para a manutenção da turgidez durante todo o período vegetativo, principalmente porque os tecidos do sistema radicular ainda estão frágeis e são mais sensíveis a agentes estressores (Haj Sghaier *et al.*, 2022).

2.2 Qualidade nutricional das forragens

Com o aumento populacional, a demanda por alimentos ricos em proteínas de alto valor biológico se torna prioridade. Uma dieta animal balanceada é essencial para sustentar uma produção pecuária eficiente. A disponibilidade de forragens de alta qualidade não apenas atende às demandas nutricionais do gado, melhorando saúde e reprodução, mas também contribui para a produtividade do setor (Franco *et al.*, 2021).

Vários fatores são capazes de influenciar os parâmetros de qualidade das plantas forrageiras, como temperatura, fertilidade do solo e disponibilidade de água. A família botânica também importa na avaliação de qualidade nutricional; as gramíneas geralmente apresentam menor teor de proteína bruta, digestibilidade reduzida e maiores

teores de fibra e lignina em comparação com as leguminosas. Existem muitos indicadores de qualidade das forragens, incluindo principalmente proteína bruta (PB), rendimento de massa seca, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro (Chand *et al.*, 2022).

Para assegurar que as forragens atendam às necessidades alimentares do animal, é importante compreender os indicadores nutricionais e melhorar as práticas de manejo pré e pós-colheita (Katoch, 2023). Muitas vezes o foco do mercado recai sobre o rendimento em biomassa, secundarizando a qualidade nutricional, que é essencial para a eficiência da produção pecuária (Battenfield *et al.*, 2016). Contudo, em períodos de secas, a qualidade nutricional das forragens diminui e são requeridos maiores aportes de suprimento alimentício para bovinos cuja base da dieta são forragens de gramíneas (Katoch, 2023).

A formulação de dietas com um teor adequado de proteína bruta é essencial, pois, além de fornecer aminoácidos essenciais para o crescimento, desenvolvimento, reprodução e lactação, também fornece aportes de nitrogênio para bactérias fermentadoras presentes no rúmen. No entanto, o excesso de proteína pode ser economicamente desvantajoso e resultar em problemas ambientais devido à excreção excessiva de nitrogênio. Contudo, as dietas baseadas em gramíneas, que geralmente apresentam menor teor de proteína bruta, exigem suplementação (Bist *et al.*, 2023). Os principais estudos estão relacionados à biofortificação agrônômica, utilizando técnicas de melhoramento genético para selecionar cultivares forrageiras mais adequadas à produção animal. Outras abordagens, como o consórcio de gramíneas e leguminosas e a biotecnologia na prospecção de microrganismos benéficos, também vêm sendo exploradas para melhorar a disponibilidade e a absorção de nutrientes no solo (Cakmak *et al.*, 2018).

2.3 Promoção de crescimento vegetal e bioinoculantes

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) são bactérias benéficas que colonizam a superfície radicular e as áreas do solo próximas às raízes. Elas promovem o crescimento vegetal, auxiliando na aquisição e assimilação de nutrientes, melhorando a estrutura do solo e modulando moléculas extracelulares, como hormônios, metabólitos secundários, antibióticos e compostos sinalizadores (De Andrade *et al.*, 2023). As RPCP também atuam auxiliando as plantas na tolerância a

estresses bióticos e abióticos. Em períodos de seca, as RPCP promovem a liberação de fitormônios e protegem a raiz contra a dessecação (Singh *et al.*, 2024).

Os mecanismos de ação das RPCP são categorizados em diretos e indiretos. Os mecanismos diretos afetam especificamente o desenvolvimento da planta. Incluem a biofertilização, como, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, na qual microrganismos convertem nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia, processo que viabiliza a assimilação do nutriente pelas plantas. Outro mecanismo direto é a produção de hormônios vegetais, como auxinas e citocininas, que estimulam o crescimento radicular e facilitam a exploração do ambiente em busca de nutrientes e água (Figueiredo *et al.*, 2016; Etesami *et al.*, 2020).

Já os mecanismos indiretos não afetam inicialmente o crescimento e o desenvolvimento da planta, mas reduzem e previnem fatores que os limitam, diminuindo a incidência de doenças e atenuando os efeitos de estresses, como, por exemplo, o auxílio na tolerância a estresses bióticos e abióticos, em que as RPCP disponibilizam nas áreas próximas às raízes osmólitos, exopolissacarídeos e enzimas antioxidantes que são aproveitados pelas plantas em períodos de seca para a proteção do conteúdo celular. Outro exemplo de mecanismo indireto é a rizorremediação, realizada por meio da degradação de poluentes do solo pelas PGPR (Vejan *et al.*, 2016).

Bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Clostridium*, *Rhodospirillum* e *Rhizobium* são as mais utilizadas como bioinoculantes em culturas agrícolas (Rosenblueth *et al.*, 2018). Um inoculante que tem ganhado notoriedade em pesquisas no mundo todo é o *Azospirillum brasilense*, por benefícios associados a várias culturas agrônômicas, como milho, trigo, arroz, sorgo, plantas forrageiras, entre outras (Santos *et al.*, 2021). No capim-braquiária, *A. brasilense* (estirpes Ab-V5 e Ab-V6) forneceu o equivalente a 58 kg N ha⁻¹, além de melhorias em aspectos fisiológicos e agrônômicos, como maior condutância estomática, eficiência no uso de água e melhor exploração do ambiente, observadas por meio de alterações morfológicas em plantas inoculadas, como o aumento do comprimento das raízes e da densidade dos pelos radiculares (Bourscheidt *et al.*, 2023).

Sob efeito de estresses abióticos, como salinidade e déficit hídrico, o inoculante *Priestia aryabhattai* (anteriormente classificado como *Bacillus aryabhattai*) se destaca pela síntese de exopolissacarídeos, osmólitos compatíveis e pela formação de biofilmes ao redor das raízes, contribuindo para a retenção de água nos períodos de seca

e na proteção de proteínas celulares em solos salinos (Agunbiade *et al.*, 2024; Castelo Sousa *et al.*, 2023). Além disso, *Bacillus aryabhattai* foi o primeiro bioinoculante comercial destinado a reduzir os efeitos do déficit hídrico em plantas, registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), e é um dos únicos produtos disponíveis no mercado para essa finalidade (Embrapa, 2025).

As RPCP são selecionadas por meio de testes em laboratório, que incluem o cultivo em meios específicos e/ou a inoculação direta na planta, com subsequente monitoramento do crescimento vegetal (Backer *et al.*, 2018). Tradicionalmente, o microrganismo é isolado, cultivado e identificado por meio de técnicas moleculares, como, por exemplo, o sequenciamento. Depois, realizam-se testes bioquímicos e ensaios sobre os mecanismos de promoção do crescimento vegetal em laboratório, como a solubilização de fosfato, a produção de fitormônios e a tolerância a condições adversas, geralmente em meios de cultura específicos. As etapas que finalizam a prospecção microbiana de RPCP são os ensaios de crescimento das plantas inoculadas em estufa e, posteriormente, em campo. Após a prospecção, o biofertilizante passa por extensas análises de formulação e estabilidade, é novamente submetido a testes em campo e a etapas de regulamentação e fiscalização da segurança do produto antes de ser comercializado (Chaudhary *et al.*, 2020).

Contudo, os ensaios de promoção de crescimento vegetal conduzidos em laboratório nem sempre predizem o desempenho dos microrganismos em condições de campo. Isso ocorre porque os meios artificiais podem criar ambientes favoráveis que não refletem a complexidade físico-química e biológica do solo, ou porque determinados isolados apresentam baixa competitividade e, conseqüentemente, não expressam efeito agrônômico significativo em condições reais (Sharma *et al.*, 2013). Além disso, embora as técnicas tradicionais de triagem sejam úteis, elas permanecem restritas pelo delineamento experimental, pela capacidade operacional e pelo número de isolados que podem ser avaliados simultaneamente. Nesse contexto, é interessante investigar abordagens capazes de acelerar a identificação de candidatos promissores, permitindo análises genômicas em larga escala e otimizando o processo de seleção de bioinsumos antes da etapa de avaliação em campo.

2.4 Ecologia reversa

A ecologia reversa é uma abordagem que une análises genômicas e ferramentas de biologia de sistemas para inferir sobre interações ecológicas entre organismos dentro de suas comunidades. Esta abordagem utiliza modelagens de redes metabólicas complexas, indica funcionalidade ecológica e pode ser empregada para prever alterações ambientais (Borenstein *et al.*, 2009; Levy; Borenstein, 2012).

Muitas ferramentas de ecologia reversa utilizam algoritmos baseados em "seeds", que são definidas como um conjunto de compostos adquiridos de forma exógena. Esses compostos geram interações entre redes metabólicas e seus ambientes, fornecendo informações sobre o ambiente bioquímico de cada espécie analisada. Além disso, esses conjuntos de "seeds" sustentam a reconstrução metabólica das espécies e permitem análises que vão desde análises par a par feitas pelo programa NetSeed e NetCooperate até análises em grande escala, como as realizadas pelo programa RevEcoR, no qual é possível inserir dados de entrada para múltiplas análises simultâneas (Cao *et al.*, 2016).

No contexto dessa abordagem, o suporte biossintético é um índice calculado a partir da troca de metabólitos entre espécies, baseado nos compostos que os organismos analisados produzem e que beneficiam o metabolismo um do outro. Esse suporte reflete o grau de dependência metabólica entre os organismos. Já o índice de complementaridade se refere às capacidades metabólicas que se complementam em uma comunidade. Por fim, o índice de competição metabólica é derivado da sobreposição de vias metabólicas, indicando alta competição quando organismos realizam atividades metabólicas similares (Cao *et al.*, 2016; Levy; Borenstein *et al.*, 2012).

A ecologia reversa, portanto, baseia-se na topologia das redes metabólicas e identifica diversos padrões de interação entre microrganismos, hospedeiros e funções ecológicas relacionadas ao microbioma (Cao *et al.*, 2016; Levy; Borenstein, 2012). A aplicação de estruturas de ecologia reversa permite o estudo de comunidades microbianas em áreas como a saúde, agricultura e meio ambiente.

Pesquisas de diversas áreas têm obtido sucesso ao utilizar a abordagem. Bhattacharjee *et al.* (2024) utilizaram estruturas de ecologia reversa para investigar o microbioma de uma bebida indiana com propriedades anticancerígenas, observando interações complementares entre o microbioma e o intestino humano. Bernstein e colaboradores (2019) exploraram as capacidades biossintéticas de metabólitos de mais

de 400 microrganismos orais humanos.

A utilização dessas ferramentas computacionais para analisar interações microbianas tem se mostrado útil também em pesquisas na agricultura, ajudando a entender melhor a dinâmica entre microrganismos e plantas. Ofaim *et al.* (2017) utilizaram estruturas de redes metabólicas para explorar as funções microbianas na rizosfera de trigo e pepino. Por sua vez, Gonçalves *et al.* (2022) estudaram as interações metabólicas entre o patógeno *Candidatus Liberibacter*, seus hospedeiros cítricos e o vetor psílideo, descobrindo vias metabólicas envolvidas e revelando relação de dependência metabólica entre o patógeno, a planta e o vetor. Em outro estudo, a modelagem metabólica e dados metagenômicos de Campos Rupestres foram empregados por meio de uma abordagem de ecologia reversa para construir uma comunidade microbiana sintética para melhorar características agrônômicas das culturas (Gonçalves *et al.*, 2023). Apesar dos avanços, a ecologia reversa é uma abordagem nova, portanto pouco explorada (Takemoto *et al.*, 2017) nos sistemas agropecuários, especialmente na seleção de bioinsumos à base de microrganismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Abordagens de ecologia reversa para a seleção genômica de isolados bacterianos

As bactérias foram isoladas de solo rizosférico do Cerrado e pertencem à coleção do Grupo de Genômica Eco-evolutiva Microbiana (GGEM) e Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos (LGMM), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (Bioagro/UFV). Os isolados foram previamente classificados por gênero com base em sequenciamento do gene 16S rRNA. Os genes codificadores de proteínas associados à Ortologia KEGG (KOs) de 53 gêneros foram recuperados utilizando genomas disponíveis no JGI Integrated Microbial Genomes Microbiomes. Adicionalmente, a ferramenta KofamKOALA (Aramaki *et al.*, 2020), com valor de *e-value* ajustado para 0,0001, foi utilizada para atribuir KOs aos arquivos de proteínas obtidos do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os genomas foram analisados no CheckM 1.0.13 (Parks *et al.*, 2015), filtrados por completude igual ou superior a 90% e contaminação inferior a 5%. Os KOs foram submetidos ao RevEcoR no ambiente R

(Cao *et al.*, 2016) e o arquivo de saída contendo grafos dirigidos foi utilizado no módulo Python do Netcooperate (Levy *et al.*, 2015) para calcular suporte biossintético. Seleccionamos as pontuações de suporte biossintético $\geq 0,5$, porque geralmente é o valor observado em bactérias promotoras de crescimento vegetal, como o caso de *Azospirillum brasilense* GCF_007827425.1 e *Priestia aryabhatai* GCF_002688605.1, que serviram como referência nas análises *in silico*. Primeiro, contrastamos todas as espécies de cada gênero bacteriano baixadas do JGI e NCBI com *Zea mays* (GCF_902167145.1) (Tabela S1). Depois, analisamos os genomas dos isolados sequenciados pertencentes à nossa bacterioteca diretamente com o genoma do milho.

3.2 Reativação e manutenção de cultura

Os isolados foram cultivados em meio R2A, composto por amido solúvel (0,5 g L⁻¹), casaminoácido (0,5 g L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g L⁻¹), glicose (0,5 g L⁻¹), MgSO₄.7 H₂O (0,05 g L⁻¹), peptona bacteriológica (0,5 g L⁻¹), piruvato de sódio (0,3 g L⁻¹) e K₂HPO₄ (0,3 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,5 (adaptado de Reasoner; Geldreich, 1985). Após incubação a 28 °C, sob agitação de 180 rpm durante 48 h, as bactérias foram padronizadas para os experimentos em 1×10^8 UFC mL⁻¹.

3.3 Extração de DNA e sequenciamento genômico

Dos 53 gêneros da coleção do GGEM, foram selecionados 12 gêneros por ecologia reversa para o sequenciamento genômico com bons suportes biossintéticos em relação ao milho. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, da Promega Corporation, conforme as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e a quantificação foi feita com espectrofotômetro no Nanodrop 2000c da Thermo Fisher Scientific.

O DNA genômico foi sequenciado utilizando a plataforma Illumina da CD Genomics. Depois, a qualidade das sequências foi verificada pelo FASTQC (Andrews, 2010), sendo aplicado o parâmetro Phred 20 para o corte nas leituras. Os adaptadores e sequências de baixa qualidade foram removidos pelo Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), utilizando os seguintes parâmetros (5': LEADING:15, 3': TRAILING:15, MINLEN:50, SLIDINGWINDOW:4:20). Enfim, os dados filtrados foram submetidos a uma montagem de novo utilizando o SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012). A qualidade das

montagens resultantes foi avaliada com as ferramentas QUAST 5.3.0 (Gurevich *et al.*, 2013) e CheckM 1.0.13 (Parks *et al.*, 2015); já a anotação genômica foi feita pelo Prokka (Seemann, 2014).

3.4 Identificação dos isolados

O alinhamento concatenado foi feito pelo CheckM 1.0.13 e a árvore filogenômica construída pelo IQ-TREE v2.4.0 (Nguyen *et al.*, 2015), no parâmetro TEST e bootstrap Ultrafast 1000 (Minh *et al.*, 2020), executado pela Plataforma Cipres <https://www.phylo.org/>. A análise digital de hibridização DNA-DNA (DDH) foi calculada pelo GGDC (<https://ggdc.dsmz.de/>) e a similaridade calculada pelo FastANI. A classificação de espécies seguiu o padrão determinado pela lista de nomes procarióticos com posição na nomenclatura (LPSN) (<https://www.bacterio.net/>).

3.5 Identificação de clusters de genes biossintéticos e predição funcional de genes

Os clusters de genes biossintéticos (BGCs) foram identificados utilizando o antiSMASH (Medema *et al.*, 2011). As características de promoção de crescimento vegetal foram identificadas pelo PLaBAs (Patz *et al.*, 2021) em todos os isolados sequenciados. Uma análise mais específica foi feita no PGPg_Finder (Pellegrinetti *et al.*, 2024) e suas funções metabólicas foram registradas utilizando os bancos de dados do KEGG Compound (<https://www.genome.jp/kegg/compound/>) e MetaCyc (<https://metacyc.org/>).

3.6 Tratamento de sementes

A superfície das sementes de milho híbrido Bm 855 Pro2 foi desinfestada por imersão em peróxido de hidrogênio 5% durante 20 minutos, seguidos de cinco enxágues em água destilada estéril (Drechsel; Baldani, 2006). As sementes permaneceram imersas por 1 hora na cultura padronizada e, em seguida, foram secas ao ar na cabine de segurança biológica. Os resultados foram comparados com tratamentos contendo o isolado do inoculante comercial Acta Ary® (1×10^8 UFC mL⁻¹ *Bacillus aryabhattai* CMAA 1363). O controle positivo foi cultivado em R2A sólido e padronizado em 1×10^8 UFC mL⁻¹. Neste trabalho, o inoculante comercial é chamado de *Priestia aryabhattai* em razão da reclassificação da nomenclatura da espécie (Gupta *et al.*, 2020).

3.7 Ensaio de germinação

O experimento de germinação de sementes foi conduzido com os isolados após a seleção com base nos gêneros bacterianos. Foram selecionados apenas os isolados cujo crescimento foi classificado como rápido (até 48 h). O experimento foi realizado segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), durante 7 dias, utilizando três folhas de papel Germitest umedecidas com solução equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Foram distribuídas 25 sementes de milho em cada placa de Petri. Para aplicar o déficit hídrico, a concentração de PEG 6000 foi ajustada conforme proposto por Michel & Kaufmann (1973): $\Psi \text{ (bar)} = -1,18 \times 10^{-2} C - 1,18 \times 10^{-4} C^2 + 2,67 \times 10^{-4} C T + 8,39 \times 10^{-7} C^2 T$, na qual C é a concentração de PEG em g/kg de água e T é a temperatura em °C. Foram considerados dois níveis de déficit, leve e moderado (-0,3 MPa e -0,6 MPa), e a água deionizada foi utilizada como controle (0 MPa). Os cálculos da velocidade de germinação foram propostos por Maguire (1962), em que: $IVG = \sum Gi/ti$, sendo Gi o número de sementes germinadas no dia e ti o tempo de experimento em dias. Duas contagens foram realizadas, no quarto e no último dia de experimento.

3.8 Promoção de crescimento vegetal em déficit hídrico

O solo coletado de uma área de barranco foi cedido pela UEPE Campo Experimental Prof. Diogo Alves de Melo – Vale da Agronomia/UFV (20°46'04.6"S 42°52'12.7"W) foi triturado em uma peneira, homogeneizado e entregue às análises físico-químicas do Departamento de Solos/UFV. O solo utilizado nos experimentos foi misturado à areia na proporção de 2:1. A análise granulométrica detectou 0,150 kg/kg de areia grossa, 0,285 kg/kg de areia fina, 0,056 kg/kg de silte e 0,509 kg/kg de argila, cuja classificação textural foi argila. A classe de água disponível (AD) identificada foi AD6, 1,75 mm/cm. A densidade do solo é de 1,07 g/cm³. Já os parâmetros químicos identificaram o pH em água de 6,85; 32,0 mg/dm³ de P; 71 mg/dm³ de K; 9,30 mg/dm³ de Na; 4,01 cmolc/dm³ de Ca²⁺; 1,13 cmolc/dm³ de Mg²⁺; 0,00 cmolc/dm³ de Al³⁺; H+Al de 1,2 cmolc/dm³; SB: 5,36 cmolc/dm³; a CTC efetiva: 5,36 cmolc/dm³; a CTC a pH 7,0: 6,56 cmolc/dm³; MO: 1,60 dag/kg; e P-Rem de 26,8 mg L⁻¹.

Os isolados C90B, PE4A e SOY8 que se destacaram nas análises de ecologia reversa e na triagem de germinação foram selecionados para o experimento de crescimento em déficit hídrico em vasos com volume de 4 dm³. O ensaio foi conduzido

por 45 dias, entre setembro e novembro de 2024, com três diferentes níveis de disponibilidade hídrica: 40%, 60% e 100%. Três sementes foram semeadas por vaso, inseridas à profundidade de aproximadamente 5 cm. Após 10 dias, foi feito um desbaste, mantendo apenas uma planta por vaso. O cultivo foi monitorado por 45 dias após a semeadura.

Ao final do experimento, as raízes e a parte aérea foram separadas e secas em estufa à temperatura de 65 °C até atingirem peso constante para a obtenção da massa seca. Foram medidos parâmetros de crescimento, como comprimento da planta, comprimento da raiz, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz. A determinação da capacidade de retenção de água nos vasos foi feita por meio da pesagem dos vasos secos. Em seguida, eles foram encharcados e, após o escoamento do excesso de água, foram pesados novamente. Além disso, 100 g de amostras secas homogeneizadas de todas as partes da planta, de cada tratamento, foram enviadas para o Laboratório de Análises de Alimentos – DTA, para determinação de proteína bruta (PB) pelo método Kjeldahl (Bradstreet, 1954).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Valor médio do suporte biossintético de gêneros de bactérias em relação a *Zea mays*

A busca por genomas de acesso público abrangeu 9.911 genomas completos correspondentes a 53 gêneros bacterianos distribuídos entre os isolados disponíveis na coleção do GGEM. Seleccionamos 12 gêneros para sequenciamento genômico (Tabela S1). No entanto, isolados de crescimento lento ou com suspeita de contaminação foram retirados do estudo, resultando em 8 gêneros para análises posteriores (Tabela 1). O gênero *Klebsiella* obteve a maior média de suporte biossintético, seguido por *Duganella*, *Kosakonia* e *Dyella* (Tabela 1) (Tabela S1). As médias variaram entre $0,207 \pm 0,045$, que foi obtida pelo gênero *Rugosimonospora*, até $0,548 \pm 0,012$, obtido por *Klebsiella*.

Priestia, um gênero utilizado na agricultura principalmente em períodos de seca (Abiala *et al.*, 2022), obteve uma nota baixa na análise ($0,411$) (Tabela S1). Considerando que a ecologia reversa se baseia em genes centrais para prever a interação metabólica entre organismos (Arevalo *et al.*, 2019). A exclusão de *Priestia* da análise

pode significar que o destaque de bactérias desse gênero na promoção de crescimento vegetal seja explicado por genes acessórios. Outra possibilidade é que a maioria das espécies do gênero não possui uma boa pontuação biossintética quando analisadas com o milho. Como foi utilizada a média aritmética para determinar o suporte biossintético dos gêneros, um excesso de valores baixos tende a “puxar” a média para baixo (Manikandan, 2011).

Por outro lado, outros gêneros bacterianos reconhecidos na agricultura como promotores de crescimento vegetal, como *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* (Rosenblueth *et al.*, 2018), obtiveram pontuações biossintéticas altas, 0,548, 0,528, 0,534, respectivamente (Tabela S1). Sugerindo assim que esses microrganismos são capazes de sintetizar metabólitos que o milho utiliza no próprio metabolismo, mas não é capaz de sintetizar. Vale ressaltar que o valor de 0,5 utilizado como referência não constitui uma padronização, sendo resultado de observações realizadas em análises com RPCP.

Tabela 1 – Suporte biossintético de gêneros bacterianos obtidos a partir da comparação par a par entre cada espécie e *Zea mays*

Suporte Biossintético	Gêneros	Nº de genomas	Isolado representante
$0,548 \pm 0,012$	<i>Klebsiella</i>	510	PE4A
$0,512 \pm 0,016$	<i>Bosea</i>	57	C48A
$0,545 \pm 0,032$	<i>Duganella</i>	84	C35A
$0,537 \pm 0,023$	<i>Dyella</i>	48	225D, P12A
$0,521 \pm 0,014$	<i>Variovorax</i>	12	P56A
$0,500 \pm 0,013$	<i>Cupriavidus</i>	138	C90B
$0,504 \pm 0,023$	<i>Novosphingobium</i>	14	SOY1, SOY8
$0,545 \pm 0,016$	<i>Kosakonia</i>	15	S02D

Dados retirados a partir da análise feita no *NetCooperate* em 2024.

4.2 Ensaio de germinação

Os isolados pertencentes aos gêneros selecionados por ecologia reversa foram avaliados *in vivo* quanto ao potencial de promover a germinação de sementes do milho (Figura 1) e velocidade de germinação (Figura 2). O efeito dos isolados na germinação depende do nível do déficit hídrico. Nas sementes que receberam apenas água, não houve diferença estatística no percentual de germinação e velocidade entre o controle

positivo, o controle sem inoculação e os isolados (Figuras 1 e 2). Já no potencial osmótico (Ψ_s) = -0,3 MPa, o número de sementes germinadas foi maior em PE4A e no controle positivo, que chegaram a apresentar 85% de germinação sob essa condição de déficit hídrico. O isolado C90B não apresentou diferença estatística em relação aos melhores resultados, os quais, juntamente com P12A e SOY8, diferiram do controle sem inoculação. Além de elevarem o percentual germinativo, PE4A e C90B, junto ao controle positivo, também favoreceram uma maior velocidade de germinação nas sementes (Figura 2). Curiosamente, P12A e SOY8 promoveram a germinação (Figura 1), mas demoraram mais (Figura 2). Por outro lado, 225D e P56A reduziram em mais de 40% sua taxa de germinação nessa condição, apresentando resultado semelhante ao tratamento sem inoculação (Figuras 1 e 2).

Em condição de déficit hídrico moderado (Ψ_s = -0,6 MPa), as sementes inoculadas com C90B, SOY8 e com o controle positivo germinaram em maior número e com maior rapidez. O percentual de germinação das sementes inoculadas com P12A e PE4A também superou o controle sem inoculação (Figura 1). A aplicação de PEG6000, em dois diferentes níveis de potencial osmótico, influenciou significativamente o percentual de germinação das sementes de milho ($p < 0,05$), piorando o aspecto das sementes. Nessa condição, foi observada uma dificuldade das plantas em desenvolver o hipocótilo e os cotilédones não foram bem formados para a maioria dos isolados. Ainda assim, SOY8 apresentou um bom desenvolvimento da raiz primária e algumas raízes secundárias (Figura S1).

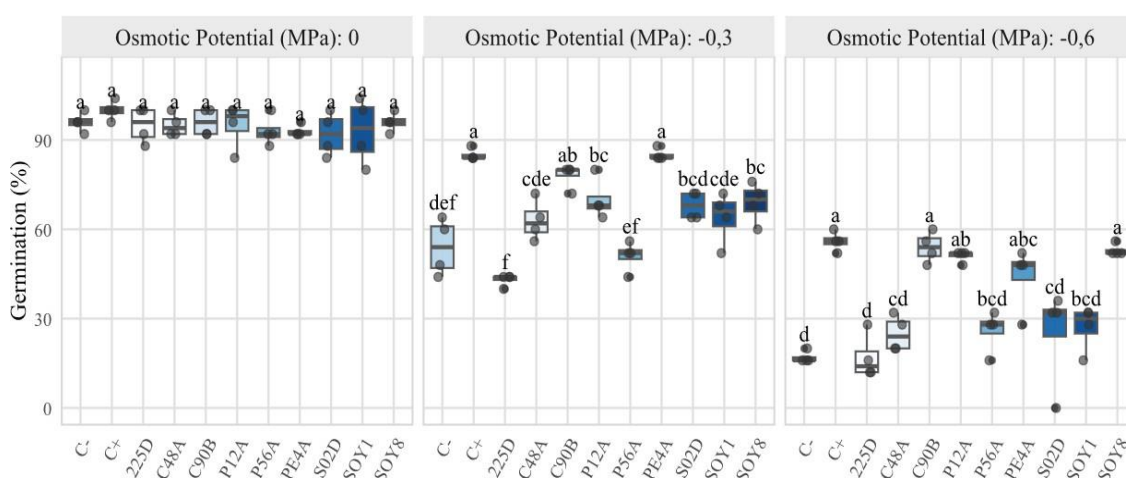


Figura 1. Taxa de germinação de sementes de milho sob três níveis de potencial osmótico (0, -0,3 e -0,6 MPa) em resposta à inoculação com diferentes isolados bacterianos. C-: controle sem inoculação; C+: controle positivo (inoculante comercial *Priestia aryabhattai*). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas.

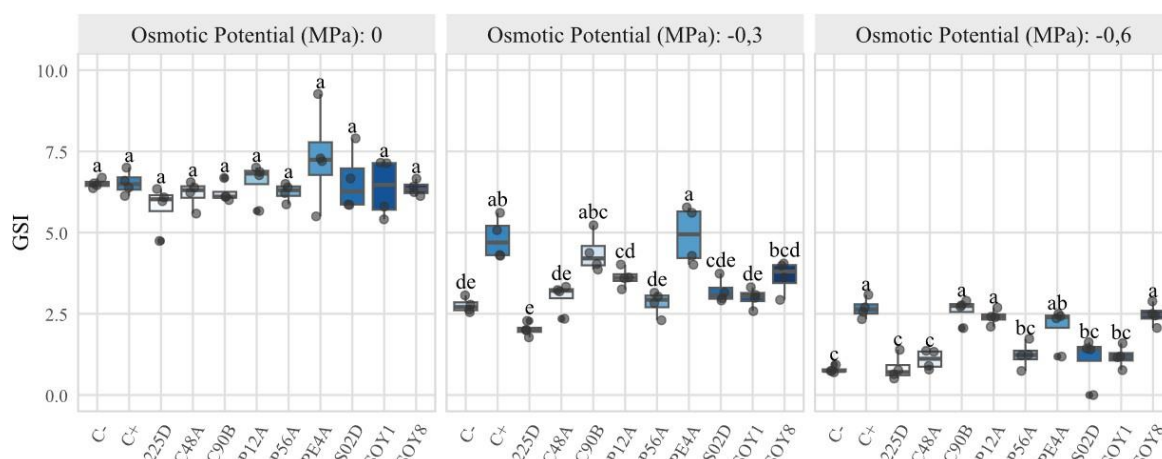


Figura 2. Velocidade de germinação de sementes de milho sob três níveis de potencial osmótico (0, -0,3 e -0,6 MPa) em resposta à inoculação com diferentes isolados bacterianos. C-: controle sem inoculação; C+: controle positivo (inoculante comercial *Priestia aryabhattai*). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas.

4.3 Seleção dos isolados bacterianos com os maiores valores de suporte biossintético obtidos em análises par a par entre genomas sequenciados e *Zea mays*

O sequenciamento genômico possibilitou uma análise de ecologia reversa mais específica. C90B e PE4A exibiram suporte biossintético superior ao de *P. aryabhattai*, com valores de 0,536 e 0,517, respectivamente. Já os isolados SOY1 e SOY8 apresentaram suporte biossintético de 0,500, mesmo valor observado para *P. aryabhattai*. O maior suporte biossintético foi observado no genoma de referência, *A. brasilense* (0,561). Por outro lado, os isolados 225D, C48A, P12A e S02D apresentaram valores inferiores a 0,500. A classificação taxonômica pelo GTDB-Tk atribuiu, no mínimo, o gênero aos genomas avaliados. Na primeira análise, S02D estava classificada como *Kosakonia*; após o sequenciamento genômico, foi reclassificada como *Microbacterium* (Tabela 2).

Tabela 2 – Suporte biossintético dos isolados contrastados com *Zea mays*

Isolados	Suporte biossintético	Classificação taxonômica (GTDB-Tk)
-	0,561	<i>Azospirillum brasilense</i>
PE4A	0,536	<i>Klebsiella michiganensis</i>
C90B	0,517	<i>Cupriavidus</i>
SOY1	0,500	<i>Novosphingobium</i>
SOY8	0,500	<i>Novosphingobium</i>
-	0,500	<i>Priestia aryabhatai</i>
P12A	0,495	<i>Dyella</i>
C48A	0,477	<i>Bosea</i>
225D	0,468	<i>Dyella</i>
S02D	0,441	<i>Microbacterium</i>

Dados retirados a partir da análise feita no *NetCooperate* em 2024.

4.4 Perfil de clusters biossintéticos relacionados à tolerância ao estresse abiótico nos isolados

A análise do perfil de metabólitos secundários foi realizada com isolados selecionados. Entre os compostos observados, destacamos um BGC com 83% de identidade a nível de DNA com o cluster do soluto compatível ectoína, encontrado nos isolados SOY1 e SOY8. No genoma C90B foi identificado um BGC com 36% de identidade, com arilpolienos. Enquanto PE4A exibiu um BGC com 100% de identidade com arilpolienos, pigmentos amarelos, semelhantes a carotenoides que atuam na proteção da célula contra o estresse oxidativo (Schöner *et al.*, 2016).

Adicionalmente, foram identificados outros BGCs frequentes nesse tipo de análise, amplamente distribuídos entre os isolados, como os terpenos, homoserina lactona, peptídeos não ribossomais (NRPSs), peptídeos ribossomais (como *RiPP-like*, peptídeos *lasso*, tiopeptídeos, lanthipeptídeos e LAPs) associados a uma diversidade de funções, como sinalização, defesa celular e atividade antimicrobiana (Dror *et al.*, 2023) (Figura 3).

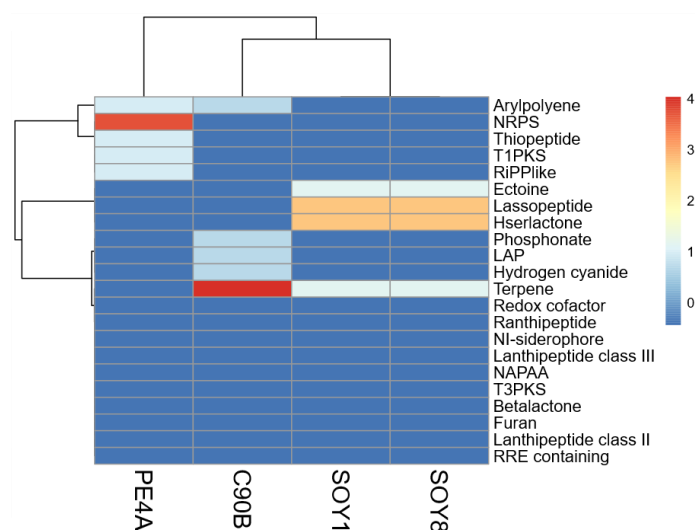


Figura 3. Mapa de calor de todos os BGCs previstos pelo antiSMASH nos genomas dos isolados.

4.5 Análise filogenômica

O isolado PE4A foi identificado como *Klebsiella michiganensis*, cujo ANI com *K. michiganensis*^T é de 98,66% (Figura 4). Os isolados SOY1 e SOY8 foram identificados como *Novosphingobium*, assumindo um clado exclusivo na árvore filogenômica (Figura 5). O par dos genomas exibiu um ANI de 99,29%, ausência de diferenças no conteúdo G+C e a hibridização DNA-DNA calculada apresentou a probabilidade de 98,3% de serem da mesma espécie. A separação do clado sugere também que se trata de uma espécie ainda não descrita. Além disso, nenhum outro genoma apresentou ANI $\geq 95\%$, quando contrastados com SOY1 e SOY8. A espécie mais próxima observada é *Novosphingobium clariflavum*, que foi alocada em 100% das construções da árvore ao lado dos isolados. O ANI entre SOY1, SOY8 e *N. clariflavum*^T (GCF_026420865.1) é 89,73% e 89,78%, respectivamente (Figura 5). Já a árvore filogenômica de C90B não exibiu um posicionamento claro no clado. O isolado foi agrupado com *Cupriavidus agavae*, *C. metallidurans* e *C. pauculus*. O maior ANI de C90B foi com *C. agavae* (86,60%). O DDH entre essas espécies inferior a 70 indica que C90B se trata de uma nova espécie (Jain *et al.*, 2018) (Figura 6). O modelo utilizado em todas as árvores foi Q.yeast+F+I+G4.

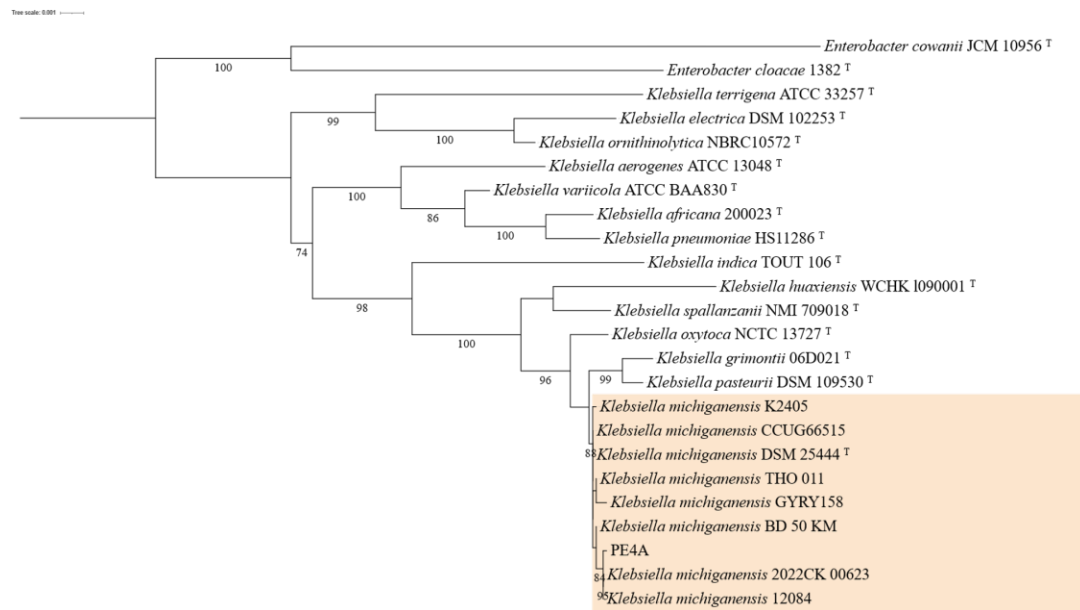


Figura 4. Árvore filogenômica do gênero *Klebsiella* baseada no método de máxima verossimilhança. O isolado PE4A foi agrupado no clado destacado. Os suportes nos nós referem-se ao valor de *bootstrap* com 1.000 réplicas. Apenas valores iguais ou superiores a 70 estão representados.

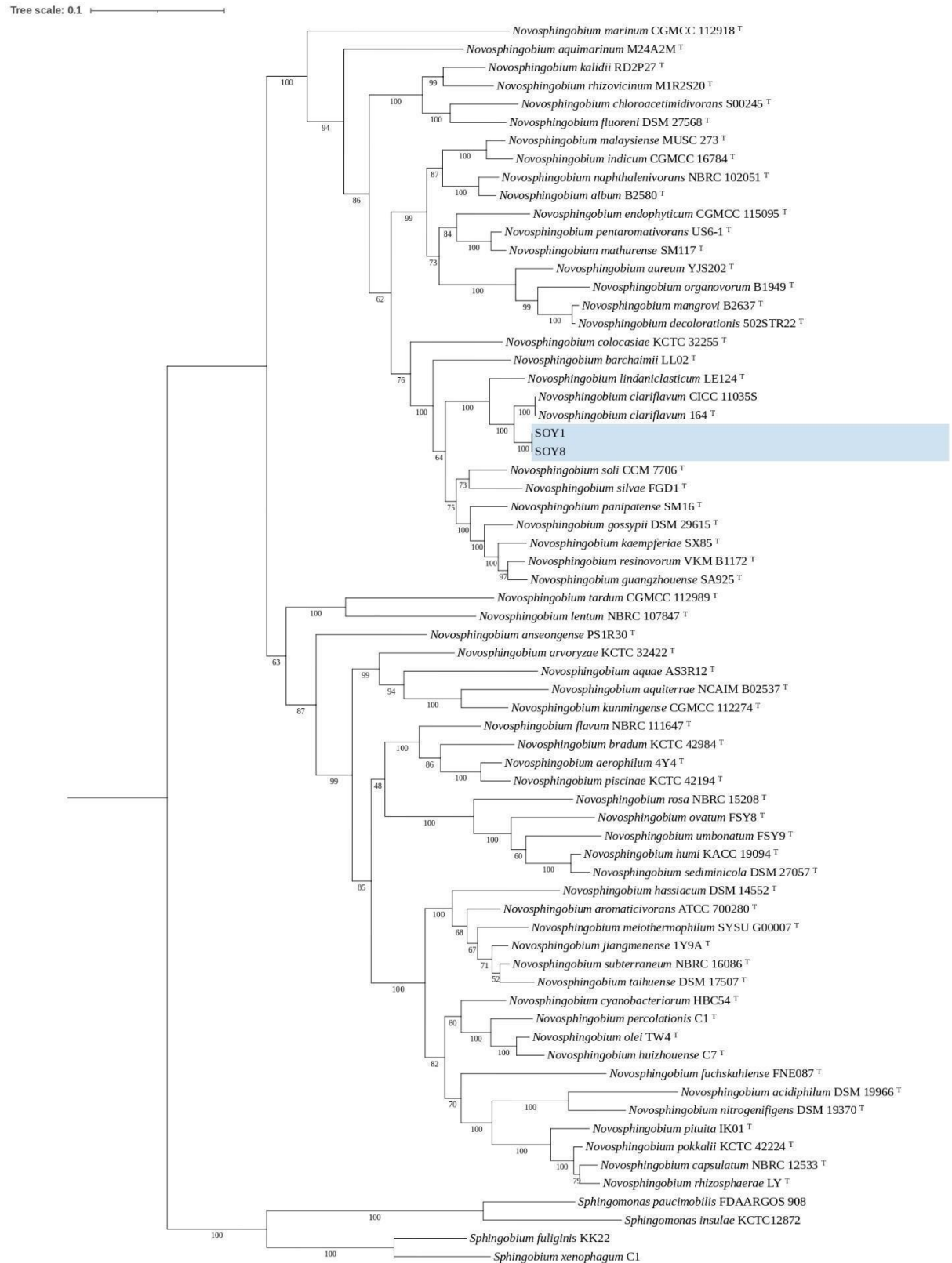


Figura 5. Árvore filogenômica do gênero *Novosphingobium* baseada no método de máxima verossimilhança. Os isolados SOY1 E SOY8 foram agrupados no clado destacado. Os suportes nos nós referem-se ao valor de *bootstrap* com 1.000 réplicas. Apenas valores iguais ou superiores a 70 estão representados.

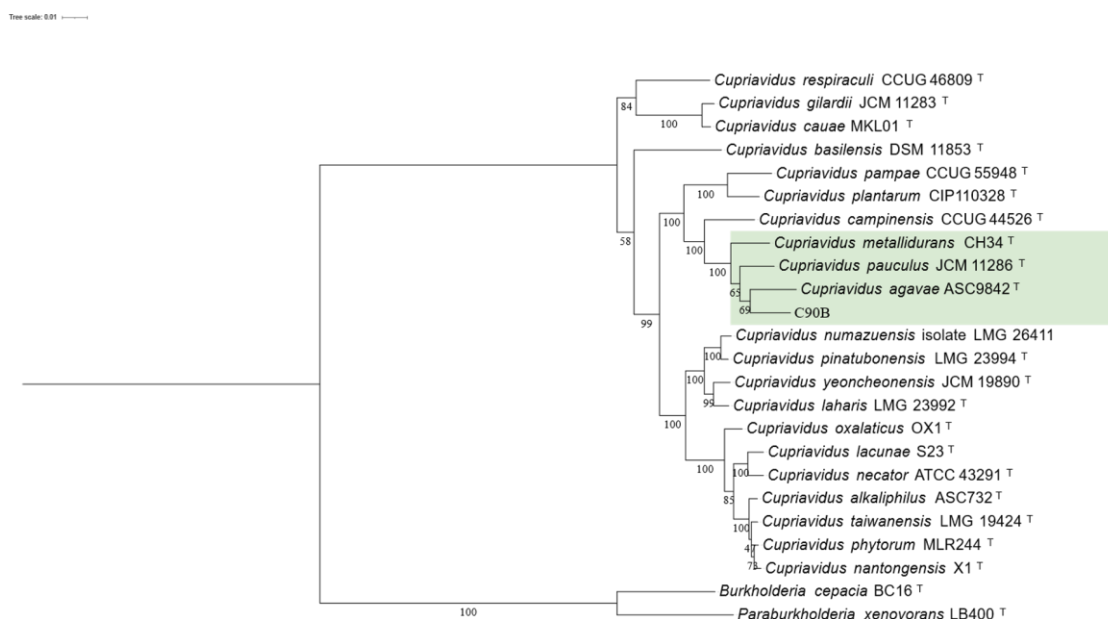


Figura 6. Árvore filogenômica do gênero *Cupriavidus* baseada no método de máxima verossimilhança. O isolado C90B foi agrupado no clado destacado. Os suportes nos nós referem-se ao valor de bootstrap com 1.000 réplicas. Apenas valores iguais ou superiores a 70 estão representados.

4.6 Identificação de compostos relacionados a *seeds* suportadas

Identificamos 234 *seeds* suportadas provenientes da interação entre isolados com maiores pontuações biossintéticas e *Zea mays*. O *seed set* contendo 45 compostos compartilhados pelos isolados C90B, PE4A, SOY1 e SOY8 inclui em sua maioria intermediários metabólicos da biossíntese de carboidratos, lipídeos e aminoácidos (Figura 7). Entre eles, encontramos um precursor de AIA, a indol-3-acetamida (IAM), composto que interage com a auxina e o ácido abscísico e atua como regulador negativo do crescimento vegetal (Sánchez-Parra *et al.*, 2021) (Sun *et al.*, 2023). A expressão de IAM ainda está relacionada com o desencadeamento da resposta ao estresse hídrico (Pérez-Alonso *et al.*, 2021).

Curiosamente, muitos compostos relacionados ao metabolismo de xenobióticos estavam presentes em todos os conjuntos, assim como compostos que conferem vantagens competitivas aos microrganismos. O isolado PE4A, no entanto, apresentou mais particularidades em seu *seed set*. Por fim, identificamos cianato em C90B, o que sugere que esse isolado pode utilizar uma via alternativa de assimilação de nitrogênio (Mooshammer *et al.*, 2021) (Figura 2).

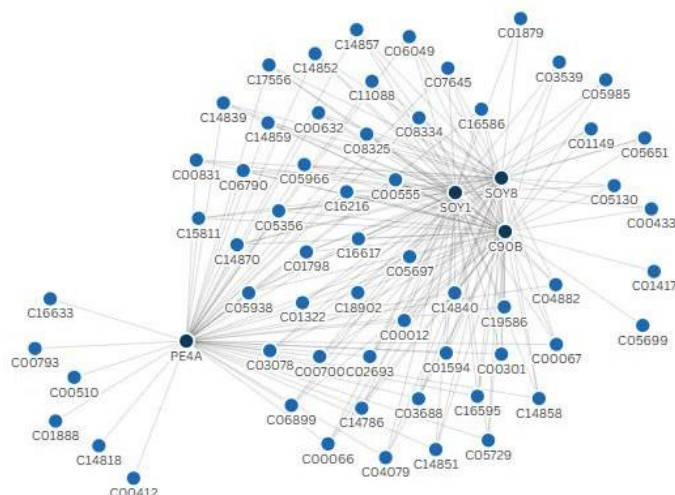
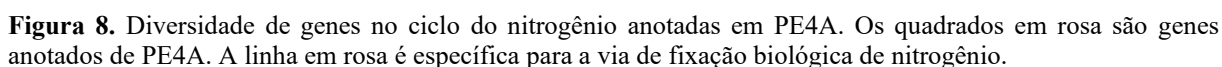


Figura 7. Rede de *supported seeds* obtidas pelo NetCooperate. Os compostos estão em azul e os isolados em cinza. As conexões ao centro representam o *seed set* comum entre os isolados C90B, PE4A, SOY1 e SOY8. Já nas extremidades é possível ver algumas *seeds* exclusivas, sem conexão com outros isolados.

4.7 Anotação funcional da assimilação de nitrogênio

Assim como ocorre em *Azospirillum brasilense*, uma PGPR conhecida por conter genes essenciais para a fixação biológica de nitrogênio (Quiviger et al., 1982), o isolado PE4A também apresentou o conjunto de genes definidos por Dos Santos et al. (2012) como essenciais para a predição computacional da FBN (Figura 8). A análise em PE4A identificou uma diversidade de genes relacionados ao ciclo do nitrogênio, vias alternativas de assimilação e fixação de nitrogênio atmosférico que incluem doadores de elétrons: *nifJ*, *nifF*, genes reguladores e responsáveis pela montagem e ativação da nitrogenase: *nifM*, *nifV*, *nifQ*, *nifS*, *nifU*, *nifW*, *nifZ*, *rpoN*, *ntrB*, *ntrC*, *glnK*, *glnB*, *glnD*, *glnE* (Halbleib; Ludden, 2000) (Figura 8). Entre outros genes de assimilação e transporte do amônio, *glnA*, *gltB*, *gltD*, *amtB*, também encontrados em C90B (Goss et al., 2001). Somado a isso, observamos o resultado positivo no teste *in vitro* com limitação de nitrogênio, sugerindo que PE4A é capaz de fixar nitrogênio atmosférico (Figura S2).

Genes típicos da FBN não foram encontrados nos outros isolados (Figura S2). No entanto, o C90B foi capaz de crescer em meio NFb e inclusive obteve resultado positivo até três dias antes dos demais. A análise funcional de genes sugere que C90B assimile o nitrogênio por meio de uma via alternativa que utiliza a hidrolase *cynS* para converter cianato em amônia e dióxido de carbono. A amônia, por sua vez, é prontamente assimilada por microrganismos do solo (Mooshammer et al., 2021).



A presença dos genes *proA*, *proB*, *proC* sugere que todos os isolados sejam capazes de acumular o osmoprotetor prolina, utilizando formas diferentes de biossíntese e importação do osmólito (Figura 9). Uma permease *proY* sugere que PE4A seja capaz de importar a prolina para dentro da célula por meio de proteínas de membrana. Já na anotação dos isolados SOY1, SOY8, encontramos Ocd, uma enzima que converte ornitina em prolina, uma rota alternativa que permite a síntese de prolina a partir da via de biossíntese da arginina (Jensen, 2013). Identificamos, ainda, genes da biossíntese de ectoína *ectA*, *ectB*, *ectC* e *ectD* em todos os genomas, inclusive em SOY1 e SOY8 encontramos 8 cópias do regulador transcricional da ectoína *doeX*. Foram anotados, ainda, genes relacionados ao metabolismo de glicina-betaína em todos os isolados. Em relação aos genes de estresse oxidativo, 25,5% foram encontrados em PE4A, 22% em SOY1 e SOY8 e 30,5% em C90B. Esse último exibiu um conjunto diversificado de proteínas detoxificadoras. A maior parte dos genes de tolerância a altas temperaturas foi encontrada em SOY1 e SOY8. Já PE4A possui mais genes para tolerância a baixas

temperaturas. C90B ainda exibiu maior quantidade de genes para neutralizar estresses salinos e estresse de acidificação (Figura 9).

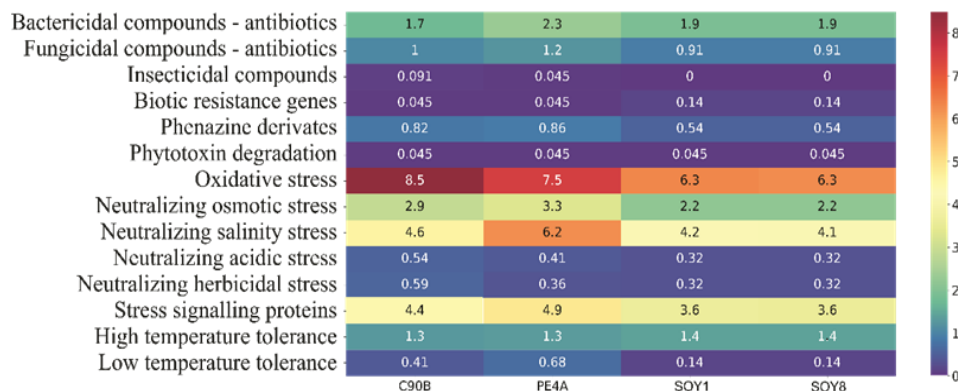


Figura 9. Contagem normalizada de genes de tolerância ao estresse biótico e abiótico dos isolados anotados pelo PGPg_finder.

4.9 Identificação de características gerais de promoção de crescimento

O perfil de anotação funcional e genes identificou 7445 PGPTs distribuídos entre C90B, PE4A, SOY1 e SOY8, relacionados com mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento vegetal. Adicionalmente, a busca considerou também os casos em que os genes apareciam repetidamente no mesmo genoma. A anotação revelou alguns destaques em termos de quantidade de genes em relação aos outros isolados. PE4A combinou diferentes mecanismos de promoção de crescimento. Genes relacionados à degradação de xenobióticos e biorremediação foram encontrados em maior quantidade em C90B (Figura 10).

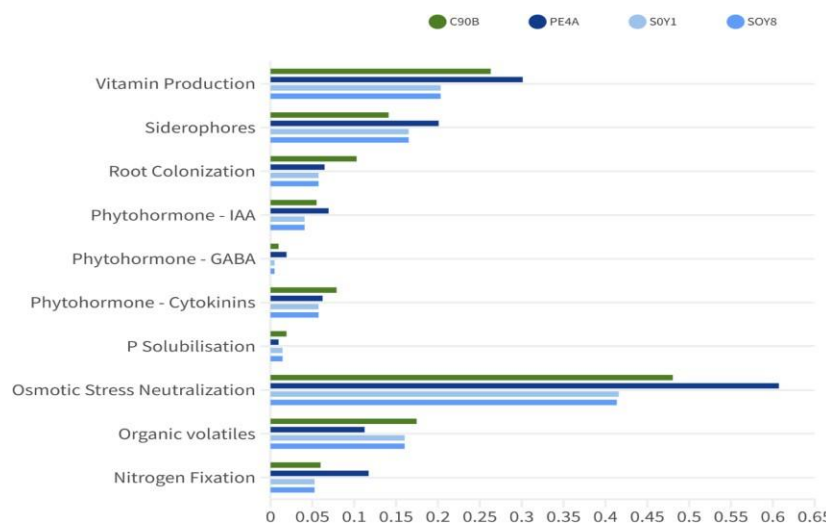


Figura 10. Contagem normalizada de PGPTs identificados a partir da anotação no PLABase. Características associadas à promoção do crescimento vegetal, agrupadas em dez categorias: produção de vitaminas, sideróforos, fitormônios: AIA, GABA e citocininas, solubilização de fósforo, neutralização de estresse osmótico.

4.10 Promoção de crescimento em déficit hídrico

A resposta das plantas depende do nível de disponibilidade hídrica. Sob a condição de 100% da capacidade do vaso (CV), os isolados não influenciaram o diâmetro do colmo, o comprimento e a massa seca da parte aérea, assim como não alteraram o comprimento radicular, uma vez que nenhum dos tratamentos diferiu estatisticamente do controle negativo (C-) ($p > 0,05$) (Figuras 11–14). Houve significância estatística apenas para a massa seca da raiz ($p < 0,05$), na qual o isolado SOY8 diferiu do controle sem inoculação (C-) (Figura 15).

Nos tratamentos com 60% da CV, a inoculação promoveu crescimento radicular em 51% em comparação ao controle não inoculado (C-) (Figura 14). Sob essa condição, a inoculação com SOY8 promoveu o aumento do peso seco da raiz do milho. Por outro lado, não houve diferença estatística em relação ao diâmetro do colmo e altura da parte aérea nas plantas inoculadas (Figuras 11 e 12).

Com a redução da disponibilidade de água, os efeitos da inoculação tornaram-se mais evidentes. Em 40% da CV, o comprimento da raiz das plantas inoculadas foi diferente do controle sem inoculação, sendo que o isolado SOY8 se destacou por não se diferenciar do controle positivo. Já PE4A e C90B ocuparam uma posição intermediária sem diferença estatística entre eles (Figura 14). Os isolados SOY8 e PE4A promoveram o aumento do peso seco da raiz e não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 15). Não houve diferença estatística na parte aérea das plantas (Figuras 11 – 13).

Dessa forma, SOY8 se destacou por apresentar aumento do comprimento e da massa seca radicular sob déficit hídrico, além de superar o controle não inoculado mesmo em condições de maior disponibilidade hídrica (100% da CV). Já C90B e PE4A apresentaram uma resposta mais dependente do aparecimento do estresse (Figura 16).

Contudo, os resultados apoiam que a inoculação bacteriana favoreceu inicialmente o desenvolvimento do sistema radicular do milho em fase inicial de desenvolvimento, sob condição de déficit hídrico. Essa diferença é descrita na literatura, na qual as alterações na raiz tendem a surgir primeiro, uma vez que esse órgão atua como um sensor ao perceber o déficit hídrico (Kou *et al.*, 2022). Apesar de este estudo explorar apenas o crescimento inicial do milho, é importante destacar que o crescimento da raiz pode melhorar a capacidade da planta de explorar o solo, favorecendo maior absorção de água, manutenção da hidratação e sustentação do tecido radicular, o que pode levar

ao adiamento dos efeitos do déficit hídrico na parte aérea das plantas (Singh *et al.*, 2024).

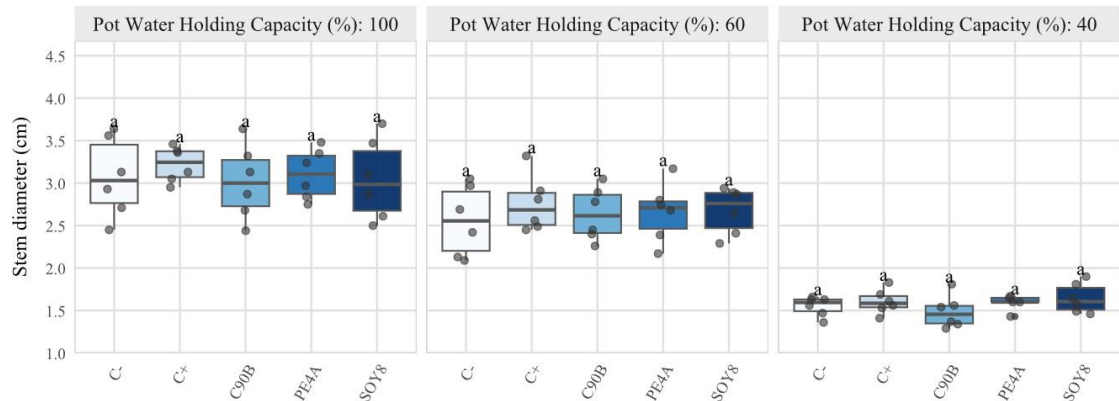


Figura 11. Efeito da inoculação com os isolados C90B, PE4A e SOY8 sobre o diâmetro do colmo do milho, 45 dias após a semeadura, avaliados em três níveis de capacidade de retenção de água no solo: 100%, 60% e 40% (da esquerda para a direita). Tratamentos controle: C- (sem inoculação) e C+ (*P. aryabhattai*). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey, a um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

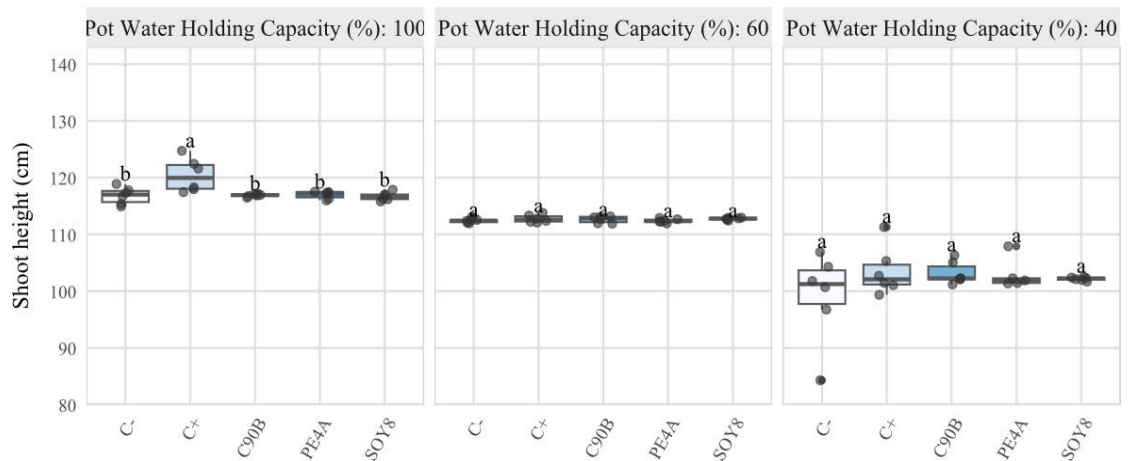


Figura 12. Efeito da inoculação com os isolados C90B, PE4A e SOY8 sobre o comprimento da parte aérea do milho, 45 dias após a semeadura, avaliados em três níveis de capacidade de retenção de água no solo: 100%, 60% e 40% (da esquerda para a direita). Tratamentos controle: C- (sem inoculação) e C+ (*P. aryabhattai*). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey, a um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

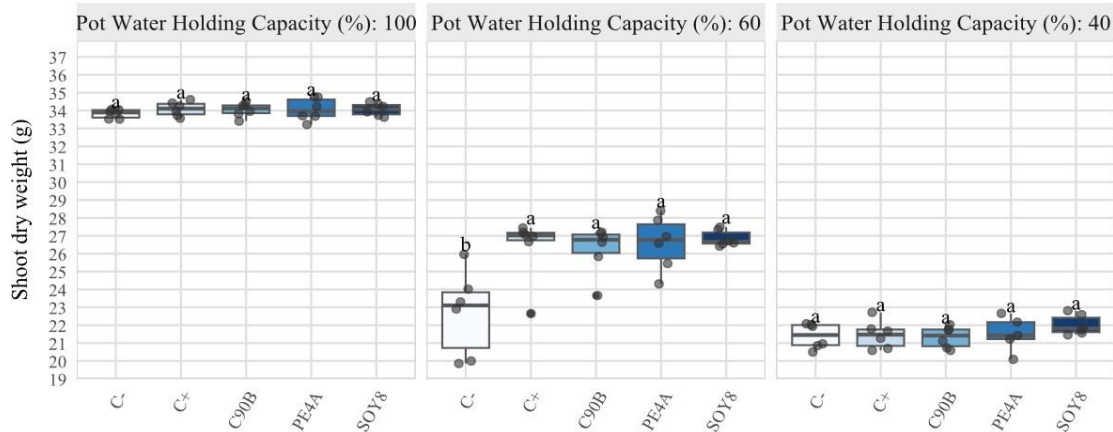


Figura 13. Efeito da inoculação com os isolados C90B, PE4A e SOY8 sobre a massa seca da parte aérea do milho, 45 dias após a semeadura, avaliados em três níveis de capacidade de retenção de água no solo: 100%, 60% e 40% (da esquerda para a direita). Tratamentos controle: C- (sem inoculação) e C+ (*P. aryabhattai*). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey, $\alpha = 0,05$.

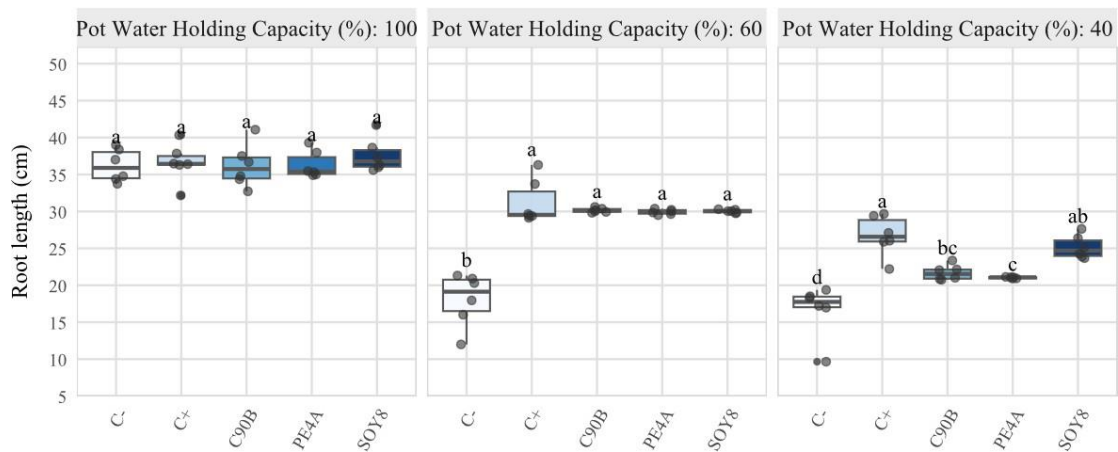


Figura 14. Efeito da inoculação com os isolados C90B, PE4A e SOY8 sobre o comprimento da raiz do milho, 45 DAS, avaliados em três níveis de capacidade de retenção de água no solo: 100%, 60% e 40% (da esquerda para a direita). Tratamentos controle: C- (sem inoculação) e C+ (*P. aryabhattai*). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey, $\alpha = 0,05$.

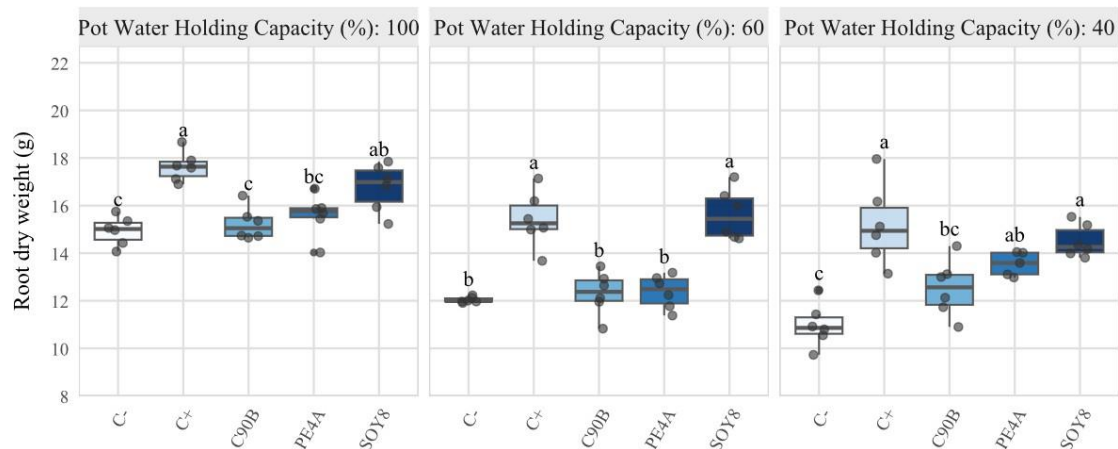


Figura 15. Efeito da inoculação com os isolados C90B, PE4A e SOY8 sobre a massa seca da raiz do milho, 45 dias após a semeadura, avaliados em três níveis de capacidade de retenção de água no solo: 100%, 60% e 40% (da esquerda para a direita). Tratamentos controle: C- (sem inoculação) e C+ (*P. aryabhattai*). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme o teste de Tukey, $\alpha = 0,05$.

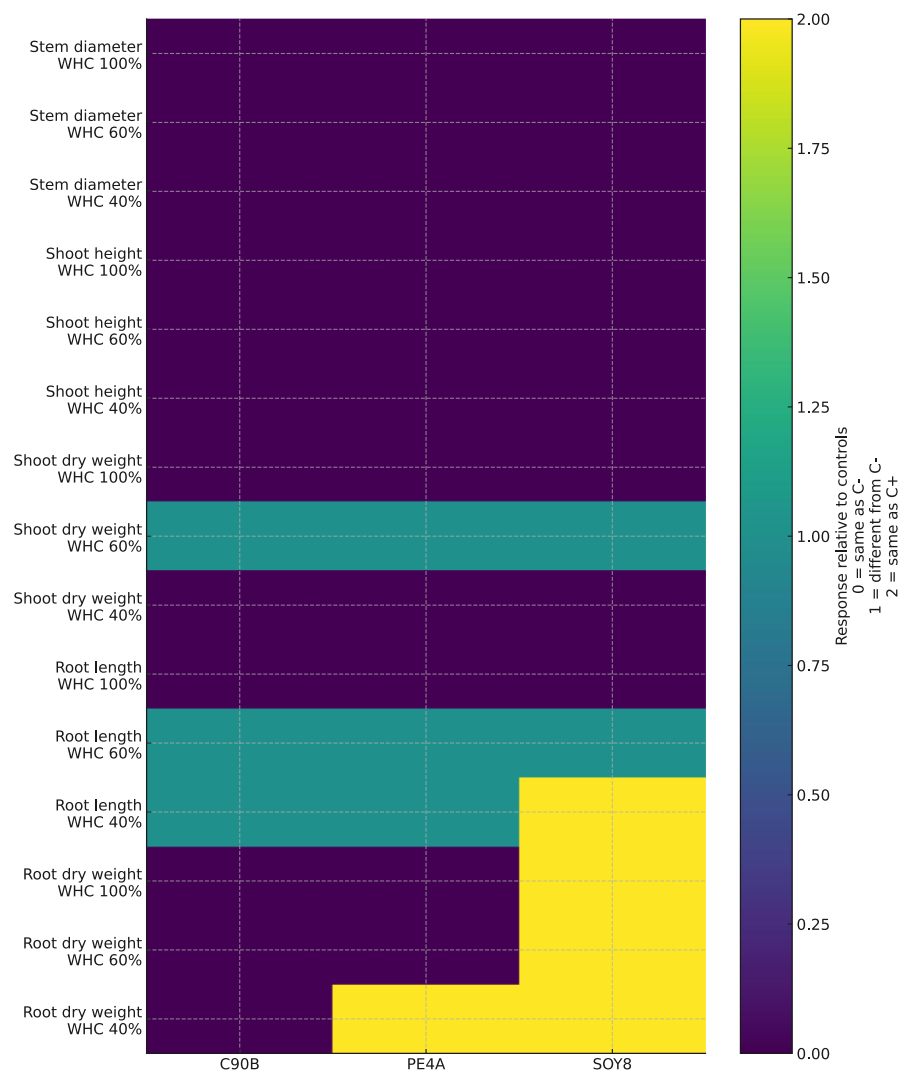


Figura 16. Mapa de calor da resposta das plantas inoculadas com os isolados C90B, PE4A e SOY8 sob diferentes níveis de capacidade de vaso (CV/WHC: 100%, 60% e 40%). As cores representam o desempenho relativo de cada isolado em comparação ao controle negativo (C-) e ao controle positivo (C+). O valor 0 indica desempenho igual ao C-, 1 indica diferença significativa em relação ao C-, e 2 indica desempenho semelhante ao C+.

Em relação ao teor de proteína bruta (PB) das plantas inoculadas, não houve diferenças estatísticas significativas (Figura S3). As plantas foram analisadas aos 45 dias após a semeadura. Em milho, o teor de proteína bruta costuma variar mais intensamente em estágios posteriores, quando ocorre maior acúmulo de biomassa e intensificação do metabolismo do nitrogênio. Portanto, é provável que, caso existam diferenças entre tratamentos, elas só sejam observadas em avaliações realizadas em períodos mais avançados do desenvolvimento da planta.

4.11 A ecologia reversa como abordagem de seleção de RPCP

A abordagem de ecologia reversa pode direcionar a seleção de RPCP. Gonçalves *et al.*, 2024, utilizaram a ferramenta genômica para obter um consórcio que aumentou o crescimento da raiz e parte aérea da soja. Nossa seleção também identificou microrganismos capazes de promover a germinação e o crescimento das raízes do milho sob redução da disponibilidade de água. As raízes são essenciais para a captação de água e nutrientes, sobretudo no período de seca, sendo o primeiro órgão a ser afetado pela indisponibilidade hídrica. Nossos resultados sugerem o início de uma resposta da planta. Além disso, a anotação funcional indica que os isolados possuem muitos genes de tolerância à seca. Portanto, são necessários estudos posteriores em outras fases do crescimento do milho, utilizando também a expressão gênica para confirmar os achados.

O isolado SOY8 se mostrou promissor tanto nos experimentos com PEG6000 (Figuras 1 e 2) quanto nos experimentos sob redução da disponibilidade da água (Figuras 11 a 16). Embora as análises filogenômicas tenham agrupado SOY1 e SOY8 no mesmo clado (Figura 5), os resultados mostraram uma diferença em relação ao potencial de promoção de crescimento entre os isolados (Figuras 1, 12, 13, 14 e 15). A análise filogenômica confirmou o gênero *Novosphingobium* para SOY1 e SOY8 e sugeriu que se trata de uma nova espécie (Figura 5). Alguns estudos relacionam espécies de *Novosphingobium* com a tolerância das plantas ao estresse abiótico, por meio do alívio do estresse salino em citrus (Vives-Peris *et al.*, 2018), melhorando o crescimento do trevo em solo contaminado com hidrocarbonetos (Rodriguez-Conde *et al.*, 2016) (Molina *et al.*, 2021) e na rizomediação do solo (Lee *et al.*, 2023).

O gênero *Cupriavidus* correspondente ao isolado C90B vem sendo estudado quanto à capacidade de remover metais pesados, favorecendo o crescimento de diversas espécies de plantas (Ramandi *et al.*, 2024). A espécie *Klebsiella michiganensis*, do isolado PE4A, também está relacionada na literatura com resistência e promoção de crescimento em plantas em solos contaminados (Chen *et al.*, 2022). A ecologia reversa, portanto, não favorece especificamente a seleção de bactérias tolerantes ao estresse abiótico ou com determinado fenótipo desejado, mas identifica metabólitos que a planta precisa captar do ambiente e que podem ser produzidos pelos microrganismos. Aliar essa ferramenta a outros estudos genômicos, como a prospecção funcional de genes, é uma abordagem ainda pouco utilizada nos estudos agrícolas. Entretanto, a ecologia reversa neste tipo de estudo tem potencial para otimizar a seleção de RPCP.

5. CONCLUSÃO

A seleção baseada na pontuação de suporte biossintético mostrou-se eficiente em identificar microrganismos promotores de crescimento vegetal. Os isolados priorizados por essa abordagem incluíram espécies já reconhecidas por atuarem como promotoras de crescimento, além de revelarem novas espécies, como os isolados SOY1 e SOY8, pertencentes ao gênero *Novosphingobium*. Os resultados experimentais demonstraram que os microrganismos selecionados foram capazes de estimular a germinação de sementes de milho híbrido e o crescimento das raízes sob déficit hídrico, alcançando desempenho semelhante ao de isolados comerciais.

Dessa forma, a abordagem utilizada não apenas recuperou microrganismos com atividades já descritas na literatura, mas também identificou novos candidatos com potencial biotecnológico. Assim, esta dissertação reforça que análises genômicas aplicadas à seleção de bioinsumos, como a ecologia reversa, podem otimizar a triagem de microrganismos promotores de crescimento vegetal, contribuindo para soluções sustentáveis na agricultura.

REFERÊNCIAS

- ABIALA, Moses *et al.* Rhizosphere *Priestia* species altered cowpea root transcriptome and enhanced growth under drought and nutrient deficiency. **Planta**, v. 257, n. 1, p. 11, 2022.
- AGUNBIADE, Victor Funso *et al.* Isolation and Characterization of Plant-Growth-Promoting, Drought-Tolerant Rhizobacteria for Improved Maize Productivity. **Plants**, v. 13, n. 10, p. 1298, 2024.
- AMEEN, Muaz *et al.* The role of endophytes to combat abiotic stress in plants. **Plant Stress**, v. 12, p. 100435, 2024.
- ANDREWS, S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Cambridge: Babraham Bioinformatics, 2010.
- ARAMAKI, Takuya *et al.* KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. **Bioinformatics**, v. 36, n. 7, p. 2251–2252, 2020.
- AREVALO, Philip *et al.* A Reverse Ecology Approach Based on a Biological Definition of Microbial Populations. **Cell**, v. 178, n. 4, p. 820–834.e14, 2019.
- BACKER, R. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.
- BANKEVICH, Anton *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BATTENFIELD, S. D. *et al.* Genomic Selection for Processing and End-Use Quality Traits in the CIMMYT Spring Bread Wheat Breeding Program. **The Plant Genome**, v. 9, n. 2, p. plantgenome2016.01.0005, 2016.
- BHATTACHARJEE, S. *et al.* Biochemical and microbial meta-profiling reveal the anti-cancer efficacy of Eu—an endemic traditional brew of the Toto tribe from India. **Bulletin of the National Research Centre**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 14, 2024.
- BHATTACHARYA, Amitav. Effect of Soil Water Deficit on Growth and Development of Plants: A Review. In: BHATTACHARYA, Amitav (Ed.). **Soil Water Deficit and Physiological Issues in Plants**. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 393–488.
- BIST, R. B. *et al.* Ammonia emissions, impacts, and mitigation strategies for poultry production: A critical review. **Journal of Environmental Management**, v. 328, p. 116919, 2023.
- BLATT, Michael R.; BRODRIBB, Tim J.; TORII, Keiko U. Small Pores with a Big Impact. **Plant Physiology**, v. 174, n. 2, p. 467–469, 2017.
- BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BORENSTEIN, E.; FELDMAN, M. W. Topological Signatures of Species Interactions in Metabolic Networks. **Journal of Computational Biology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 191–200, 2009.

BOURSCHEIDT, M. L. B. *et al.* Highlighting the benefits of biological nitrogen fixation on agronomic, physiological, and nutritive value traits of brachiariagrass. **European Journal of Agronomy**, v. 143, p. 126730, 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398 p.

CAKMAK, I.; KUTMAN, U. B. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. **European Journal of Soil Science**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 172–180, 2018.

ÇAKMAKÇI, R.; SALIK, M. A.; ÇAKMAKÇI, S. Assessment and Principles of Environmentally Sustainable Food and Agriculture Systems. **Agriculture**, v. 13, n. 5, p. 1073, 2023.

CAO, Y. *et al.* RevEcoR: an R package for the reverse ecology analysis of microbiomes. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 294, 2016.

CASTELO SOUSA, Henderson *et al.* *Bacillus aryabhattai* Mitigates the Effects of Salt and Water Stress on the Agronomic Performance of Maize under an Agroecological System. **Agriculture**, v. 13, n. 6, p. 1150, 2023.

CHAND, S. *et al.* Agronomical and breeding approaches to improve the nutritional status of forage crops for better livestock productivity. **Grass and Forage Science**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 11–32, 2022.

CHAUDHARY, Twinkle *et al.* Techniques for improving formulations of bioinoculants. **3 Biotech**, v. 10, n. 5, p. 199, 2020.

CHEN, Liang *et al.* Effects of plant growth-promoting rhizobacteria *Klebsiella michiganensis* TS8 and *Lelliottia jeotgali* MR2 on the growth and cadmium uptake of *Arabidopsis thaliana* under cadmium stress. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 1915–1928, 2022.

CHENG, Minghui *et al.* Effects of Soil Water Deficit at Different Growth Stages on Maize Growth, Yield, and Water Use Efficiency under Alternate Partial Root-Zone Irrigation. **Water**, v. 13, n. 2, p. 148, 2021.

DE ANDRADE, L. A. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. **Microorganisms**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 1088, 2023.

DERIBE, Habtamu. Review on Effects of Drought Stress on Maize Growth, Yield and Its Management Strategies. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 56, n. 1, p. 123–143, 2025.

DIXON, Ray; KAHN, Daniel. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DONOVAN, Tyler C. *et al.* Nitrogen and water availability affect soil nitrogen mineralization and maize nitrogen uptake dynamics. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 130, n. 3, p. 387–405, 2025.

DOS SANTOS, Patricia C. *et al.* Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 162, 2012.

DOS SANTOS, Roberta Mendes *et al.* Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 2020.

DRECHSEL, M. M.; BALDANI, V. L. D. **Métodos de desinfestação superficial para obtenção de sementes de milho livres de microrganismos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. (Comunicado Técnico, 175).

DROR, Barak; JURKEVITCH, Edouard; CYTRYN, Eddie. Global-scale analysis reveals distinct patterns of non-ribosomal peptide and polyketide synthase encoding genes in root and soil bacterial communities. **Soil Ecology Letters**, v. 5, n. 1, p. 38–45, 2023.

EMBRAPA. **Bactéria encontrada no mandacaru vira bioproduto que promove tolerância à seca em plantas**. 2025. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/60941801/bacteria-encontrada-no-mandacaru-vira-bioproduto-que-promove-tolerancia-a-seca-em-plantas>. Acesso em: 5 out. 2025.

ERENSTEIN, Olaf *et al.* Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security**, v. 14, n. 5, p. 1295–1319, 2022.

ETESAMI, H.; ADL, S. M. Can interaction between silicon and non–rhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinity–stressed legumes? A review. **Rhizosphere**, v. 15, p. 100229, 2020.

FARIAS, P. I. V. *et al.* The Fertilizer Industry in Brazil and the Assurance of Inputs for Biofuels Production: Prospective Scenarios after COVID-19. **Sustainability**, [S. l.], v. 12, n. 21, p. 8889, 2020.

FIGUEIREDO, M. do V. B. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action. In: CHOUDHARY, D. K.; VARMA, A. (org.). **Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants**. Singapore: Springer Nature, 2016. p. 23–37.

FLYNN, Nora E. *et al.* High N availability decreases N uptake and yield under limited water availability in maize. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 14269, 2023.

FRANCO, M. O. *et al.* Nutritional performance and metabolic characteristics of cattle fed tropical forages with protein and starch supplementation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20190487, 2021.

GÓMEZ-GODÍNEZ, Lorena Jacqueline *et al.* A Look at Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Plants**, v. 12, n. 8, p. 1668, 2023.

GONÇALVES, O. S. *et al.* Uma estrutura de ecologia reversa para descobrir a potencial interação metabólica entre espécies de ‘*Candidatus Liberibacter*’, hospedeiros cítricos e vetor psílideo. **Gene**, [S. l.], v. 837, p. 146679, 2022.

GONÇALVES, O. S.; CREEVEY, C. J.; SANTANA, M. F. Designing a synthetic microbial community through genome metabolic modeling to enhance plant–microbe interaction. **Environmental Microbiome**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 81, 2023.

GONÇALVES, O. S.; FERNANDES, A. S.; SANTANA, M. F. The Reverse Ecology-Based Approach to Design a Bacterial Consortium as Soybean Bioinoculant. **Current Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 421, 2024.

GOSS, Thomas J.; PEREZ-MATOS, Ana; BENDER, Robert A. Roles of Glutamate Synthase, *gltBD*, and *gltF* in Nitrogen Metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6607–6619, 2001.

GREAVES, Geneille E.; WANG, Yu-Min. Yield response, water productivity, and seasonal water production functions for maize under deficit irrigation water management in southern Taiwan. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 353–365, 2017.

GUPTA, Radhey S. *et al.* Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robert murraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753–5798, 2020.

GUREVICH, Alexey *et al.* QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.

HAI SGHAIER, Asma *et al.* The Effects of Temperature and Water on the Seed Germination and Seedling Development of Rapeseed (*Brassica napus* L.). **Plants**, v. 11, n. 21, p. 2819, 2022.

HALBLEIB, Cale M.; LUDDEN, Paul W. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1081–1084, 2000.

IBÁÑEZ, Ana *et al.* From Lab to Field: Biofertilizers in the 21st Century. **Horticulturae**, v. 9, n. 12, p. 1306, 2023.

JAIN, Meeta *et al.* Water Deficit Stress Effects and Responses in Maize. In: HASANUZZAMAN, Mirza *et al.* (Orgs.). **Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 129–151.

JENSEN, Jaide Vold Korgaard; WENDISCH, Volker Fritz. Ornithine cyclodeaminase-based proline production by *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 63, 2013.

KANEHISA, Minoru *et al.* KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and

drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 2017.

KATOCH, R. Forage Nutritional Quality Management. *In*: KATOCH, R. (Ed.). **Techniques in Forage Quality Analysis**. Singapore: Springer Nature, 2023. p. 211–221.

KATUMBA, George L.; TRAN, Hung; HENDERSON, Jeffrey P. The *Yersinia* High-Pathogenicity Island Encodes a Siderophore-Dependent Copper Response System in Uropathogenic *Escherichia coli*. **mBio**, v. 13, n. 1, p. e02391-21, 2022.

KOPEĆ, Przemysław. Climate Change—The Rise of Climate-Resilient Crops. **Plants**, v. 13, n. 4, p. 490, 2024.

KOU, Xinyue; HAN, Weihua; KANG, Jian. Responses of root system architecture to water stress at multiple levels: A meta-analysis of trials under controlled conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1085409, 2022.

LEE, Soo Yeon; LEE, Yun-Yeong; CHO, Kyung-Suk. Effect of *Novosphingobium* sp. CuT1 inoculation on the rhizoremediation of heavy metal-and diesel-contaminated soil planted with tall fescue. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 6, p. 16612–16625, 2023.

LEVY, Roie; BORENSTEIN, Elhanan. Reverse Ecology: from systems to environments and back. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 751, p. 329–345, 2012.

LEVY, Roie *et al.* NetCooperate: a network-based tool for inferring host-microbe and microbe-microbe cooperation. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 164, 2015.

MAGUIRE, James D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176–177, 1962.

MANIKANDAN, S. Measures of central tendency: The mean. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 140–142, 2011.

MEDEMA, Marnix H. *et al.* antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Web Server issue, p. W339–W346, 2011.

MI, Na *et al.* Differential responses of maize yield to drought at vegetative and reproductive stages. **Plant, Soil and Environment**, v. 64, n. 6, p. 260–267, 2018.

MICHEL, Burlyn E.; KAUFMANN, Merrill R. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, n. 5, p. 914–916, 1973.

MINH, Bui Quang *et al.* IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 2020.

MIRANSARI, Mohammad; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110–121, 2014.

- MOLINA, Lázaro *et al.* Clover Root Exudates Favor *Novosphingobium* sp. HR1a Establishment in the Rhizosphere and Promote Phenanthrene Rhizoremediation. **mSphere**, v. 6, n. 4, p. e00412-21, 2021.
- MOOSHAMMER, Maria *et al.* Cyanate is a low abundance but actively cycled nitrogen compound in soil. **Communications Earth & Environment**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2021.
- MURTAZA, Ghulam *et al.* The impact of biochar addition on morpho-physiological characteristics, yield and water use efficiency of tomato plants under drought and salinity stress. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 356, 2024.
- NGUYEN, Lam-Tung *et al.* IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.
- OFAIM, S. *et al.* Analysis of Microbial Functions in the Rhizosphere Using a Metabolic-Network Based Framework for Metagenomics Interpretation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, 2017.
- PARKS, Donovan H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 2015.
- PATZ, S. *et al.* **PLaBAs**: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. 2021.
- PELLEGRINETTI, Thierry Alexandre *et al.* PGPg_finder: A comprehensive and user-friendly pipeline for identifying plant growth-promoting genes in genomic and metagenomic data. **Rhizosphere**, v. 30, p. 100905, 2024.
- PÉREZ-ALONSO, Marta-Marina *et al.* Endogenous indole-3-acetamide levels contribute to the crosstalk between auxin and abscisic acid, and trigger plant stress responses in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 459–475, 2021.
- PRIYA, P.; ANEESH, B.; HARIKRISHNAN, K. Genomics as a potential tool to unravel the rhizosphere microbiome interactions on plant health. **Journal of Microbiological Methods**, v. 185, p. 106215, 2021.
- QUIVIGER, Bernadette *et al.* Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, v. 64, n. 7, p. 495–502, 1982.
- RAMANDI, Alireza *et al.* *Cupriavidus metallidurans*: a species-non-specific and multifaceted plant growth-promoting bacteria. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 1197, 2024.
- REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1–7, 1985.
- RENZETTI, Marco; FUNCK, Dietmar; TROVATO, Maurizio. Proline and ROS: A Unified Mechanism in Plant Development and Stress Response? **Plants**, v. 14, n. 1, p. 2, 2024.

RIDA, Soumeiya *et al.* Genetics of Germination and Seedling Traits under Drought Stress in a MAGIC Population of Maize. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1786, 2021.

RODRIGUEZ-CONDE, Sara *et al.* Degradation of phenanthrene by *Novosphingobium* sp. HS2a improved plant growth in PAHs-contaminated environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 24, p. 10627–10636, 2016.

ROSENBLUETH, Mónica *et al.* Nitrogen Fixation in Cereals. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

SAH, R. P. *et al.* Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2944, 2020.

SÁNCHEZ-PARRA, Beatriz *et al.* Accumulation of the Auxin Precursor Indole-3-Acetamide Curtails Growth through the Repression of Ribosome-Biogenesis and Development-Related Transcriptional Networks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 2040, 2021.

SCHÖNER, Tim A. *et al.* Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 247–253, 2016.

SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SHAHID, Mohammad *et al.* Stress-Tolerant Endophytic Isolate *Priestia aryabhattai* BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Enhanced Salt Tolerance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 17, p. 10883, 2022.

SHARMA, Seema B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SINGH, Devendra *et al.* Prospecting the Potential of Plant Growth-Promoting Microorganisms for Mitigating Drought Stress in Crop Plants. **Current Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 84, 2024.

SONG, Libing; JIN, Jiming; HE, Jianqiang. Effects of Severe Water Stress on Maize Growth Processes in the Field. **Sustainability**, v. 11, n. 18, p. 5086, 2019.

SUN, Ping *et al.* The role of indole derivative in the growth of plants: A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1120613, 2023.

TAKEMOTO, K.; AIE, K. Limitations of a metabolic network-based reverse ecology method for inferring host–pathogen interactions. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 278, 2017.

TELLES, Tiago Santos; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, p. 103158, 2023.

TURC, Olivier; TARDIEU, François. Drought affects abortion of reproductive organs by exacerbating developmentally driven processes via expansive growth and hydraulics. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 13, p. 3245–3254, 2018.

VEJAN, P. *et al.* Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. **Molecules**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

VIVES-PERIS, Vicente; GÓMEZ-CADENAS, Aurelio; PÉREZ-CLEMENTE, Rosa María. Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 11, p. 1557–1569, 2018.

WORLD BANK. **Commodity Markets Outlook, April 2025**. Washington, DC: World Bank, 2025. Licença: Creative Commons Attribution CC BY 3.0 IGO.

YAN, Lei *et al.* Exogenous proline enhances salt acclimation in soybean seedlings: Modifying physicochemical properties and controlling proline metabolism through the ornithine-glutamate dual pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 294, p. 118012, 2025.

ZHANG, Huihui *et al.* Response of Maize Yield Components to Growth Stage-Based Deficit Irrigation. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 6, p. 3244–3252, 2019.¹

ZI, Xuejing *et al.* Prolonged drought regulates the sil²age quality of maize (*Zea mays* L.): Alterations in fermentation microecology. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1075407, 2022.

ZONEAMENTO Agrícola de Risco Climático. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/riscos-seguro/programa-nacional-de-zoneamento-agricola-de-risco-climatico/zoneamento-agricola>. Acesso em: 23 jan. 2025.³

APÊNDICE

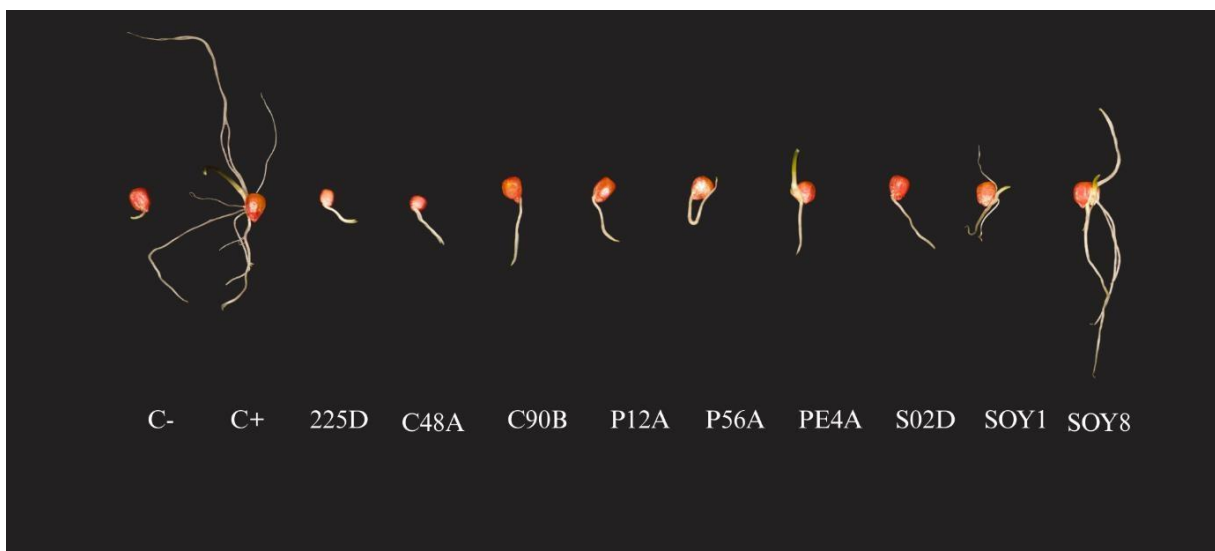


Figura S1. Germinação do milho híbrido Bm 855 Pro2, aos sete dias, sob déficit hídrico induzido por PEG 6000 (- 0,6 MPa). Controle negativo: sementes não inoculadas; controle positivo: sementes inoculadas com *Priestia aryabhattai*.



Figura S2. Ensaio de fixação biológica de nitrogênio em meio Nfb. Da esquerda para a direita: o primeiro tubo corresponde ao controle negativo, sem inoculação; em seguida, os isolados SOY1, SOY8, PE4A e C90B; por fim, o controle positivo com *Priestia aryabhattai*.

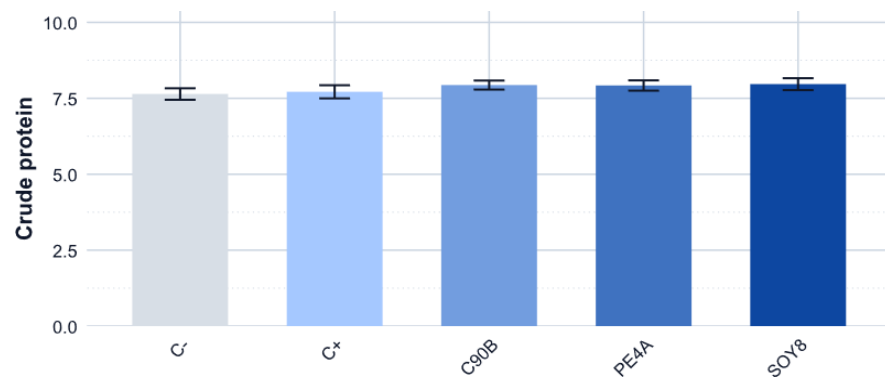


Figura S3. Determinação média da proteína bruta do milho 45 DAS dos três níveis de disponibilidade hídrica (40%, 60% e 100%) em resposta à inoculação com diferentes isolados bacterianos. C-: milho híbrido Bm 855 Pro2 não inoculado; C+: milho híbrido Bm 855 Pro2 inoculado com *Priestia aryabhatai*. ANOVA: $F(4,84)=0,64$, $p=0,636$. Dunnett vs C-: $p = 0,526$.

Tabela S1. Filtragem de isolados para sequenciamento genômico segundo o suporte biossintético por gênero

Genero	Nº de genomas públicos	Suporte biossintético	Genoma sequenciado	Isolados selecionados
<i>Acinetobacter</i>	286	0,421		
<i>Actinoallomurus</i>	4	0,421		
<i>Agrobacterium</i>	198	0,479		
<i>Aminibacterium</i>	3	0,339		
<i>Arthrobacter</i>	458	0,339		
<i>Aureimonas</i>	33	0,488		
<i>Bosea</i>	57	0,512	C48A	+
<i>Brevibacillus</i>	93	0,376		
<i>Caballeronia</i>	57	0,463		
<i>Calidifontibacillus</i>	2	0,289		
<i>Caulobacter</i>	85	0,504	**PARNA 23/22	
<i>Cohnella</i>	38	0,384		
<i>Cupriavidus</i>	138	0,500	C90B	+
<i>Diaminobutyricibacter</i>	1	0,401		
<i>Duganella</i>	84	0,545	C35A	+
<i>Dyella</i>	48	0,537	225D, P12A	+
<i>Heyndrickxia</i>	73	0,372		
<i>Intrasporangium</i>	6	0,364		
<i>Kitasatospora</i>	5	0,434		

<i>Klebsiella</i>	510	0,548	PE4A	+
<i>Kosakonia</i>	15	0,545	S02D	+
<i>Leifsonia</i>	34	0,421		
<i>Luteimicrobium</i>	53	0,335		
<i>Massilia</i>	15	0,42		
<i>Mesorhizobium</i>	4	0,471		
<i>Methylobacterium</i>	99	0,479		
<i>Methylobacterium</i>	553	0,488		
<i>Microbacterium</i>	209	0,388		
<i>Micromonospora</i>	37	0,438		
<i>Microvirga</i>	441	0,479		
<i>Moraxella</i>	244	0,306		
<i>Mycolicibacterium</i>	44	0,413		
<i>Neobacillus</i>	16	0,421		
<i>Niallia</i>	178	0,430		
<i>Nocardioides</i>	3216	0,372		
<i>Novosphingobium</i>	263	0,504	SOY1, SOY8	+
<i>Oceanobacillus</i>	45	0,388		
<i>Paenibacillus</i>	24	0,388		
<i>Paenothrobacter</i>	30	0,331		
<i>Pandorea</i>	14	0,496		
<i>Phenylobacterium</i>	8	0,492		

<i>Prescottella</i>	97	0,388		
<i>Pseudomonas</i>	692	0,5	**PE1/6	
<i>Pullulanibacillus</i>	3	0,455		
<i>Rugosimonospora</i>	6	0,207		
<i>Silvimonas</i>	4	0,281		
<i>Sinomonas</i>	4	0,388		
<i>Sphingobium</i>	40	0,499		
<i>Stenotrophomonas</i>	44	0,488		
<i>Streptomyces</i>	249	0,438		
<i>Terrabacter</i>	12	0,397		
<i>Variovorax</i>	12	0,521	P56A	+
* <i>Azospirillum</i>	100	0,548	-	
* <i>Bradyrhizobium</i>	541	0,528	-	
* <i>Priestia</i>	20	0,411	-	
* <i>Rhizobium</i>	251	0,534	-	
*** <i>Kaistia</i>	15	0,512	P10/14	
*** <i>Paraburkholderia</i>	100	0,523	P12/2 , P5/10 , P5/22, P22/3R, P23/34, P P12/2 , P23/8 P5/10 , P5/22, P22/3R, P23/34	

Notas: *Genomas de microrganismos empregados na agricultura foram incluídos na análise como referência para a pontuação biossintética.

**Em testes anteriores de curva de crescimento, o isolado apresentou crescimento lento, exigindo mais de 48 horas para atingir fase exponencial.

***Inconsistência entre o 16S e o gênero identificado no genoma completo e ou contaminação de isolados.

Tabela S1 – Compostos relacionados a *supported seeds* por isolado

Bactéria	Nº KEGG	Composto	Anotação funcional
C90B	C00433	2,5-Dioxopentanoate	metabolismo de ácidos dicarboxílicos.
	C01149	4-Trimethylammonibutanol	Intermediário na biossíntese de carnitina.
	C00555	4-Aminobutyraldehyde	Metabolismo de GABA e poliaminas.
	C05130	Imidazole-4-acetaldehyde	Intermediário na degradação de histamina.
	C05985	2-Propynal	Aldeído reativo; intermediário/químico alquilante.
	C16216	3-Oxostearoyl-CoA	Intermediário da β -oxidação de ácidos graxos.
	C00412	Stearoyl-CoA	Acil-CoA C18:0 para síntese/ β -oxidação de lipídios.
	C00510	Oleoyl-CoA	Acil-CoA C18:1 para síntese de membranas e β -oxidação.
	C16614	6-Methylmercaptapurine	Antagonista de purinas; metabólito de tiopurinas.
	C05697	Selenate	Fonte inorgânica de selênio para vias redox/selenoproteínas.
	C00700	XTP	Nucleotídeo análogo (xantosina trifosfato) no metabolismo de purinas.
		6-Mercaptopurine ribonucleoside	Metabólito ativo que inibe a síntese de purinas e pode incorporar
	C16617	triphosphate	em RNA.
	C18902	Methylselenic acid	Espécie de selênio com atividade redox/antioxidante.
	C05938	L-4-Hydroxyglutamate semialdehyde	Intermediário na degradação de 4-hidroxiprolina.
	C00986	1,3-Diaminopropane	Poliamina; produto/precursor na via de espermidina.
	C00491	L-Cystine	Reserva oxidada de cisteína; pontes dissulfeto/homeostase redox.
	C15532	N-Acetyl-L-citrulline	Intermediário relacionado ao ciclo da ureia/ metabolismo do N.

C00012	Peptide	Metabolismo de aminoácidos.
C03078	4-Guanidinobutanamide	Derivado guanidínico; ligado ao metabolismo de arginina/creatina.
C02693	(Indol-3-yl)acetamide	Intermediário da biossíntese de auxina (IAA) em plantas/bactérias.
C05651	5-Hydroxykynurenine	Intermediário da via da quinurenina (triptofano).
C00632	3-Hydroxyanthranilate	Precursor de NAD ⁺ na via do triptofano.
C01594	Linamarin	Glicosídeo cianogênico de defesa vegetal (libera cianeto).
C08334	Lotaustralin	Glicosídeo cianogênico de defesa vegetal (libera cianeto).
C08325	Amygdalin	Glicosídeo cianogênico; defesa vegetal.
C01798	D-Glucoside	Glicosídeo de D-glicose; forma de transporte/armazenamento de metabólitos.
C05966	15(S)-HPETE	Intermediário de eicosanoides; sinalização inflamatória.
C05356	5(S)-HPETE	Precursor de leucotrienos (via 5-LOX).
C01322	RX	Símbolo genérico de substrato/reagente orgânico (R-X).
C14870	2-Bromoacetaldehyde	Aldeído alquilante reativo; intermediário tóxico.
C11088	1,2-Dibromoethane	Agente alquilante industrial; tóxico/carcinogênico.
C06790	Trichloroethene	Solvente industrial; contaminante ambiental.
C14840	Bromobenzene-2,3-oxide	Epóxido reativo (metabólito de bromobenzeno); toxicidade hepática.
C14857	1,1-Dichloroethylene epoxide	Epóxido reativo de 1,1-DCE; tóxico hepato/renal.
C14858	2,2-Dichloroacetaldehyde	Aldeído clorado reativo; potencial citotóxico.
C14859	Chloroacetyl chloride	Agente acilante para síntese orgânica; altamente irritante.
C14839	Bromobenzene-3,4-oxide	Epóxido reativo de bromobenzeno; formador de adutos.

C19586	Aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide	Metabólito que forma adutos de DNA; carcinógeno potente.
C14852	Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol	Intermediário rumo ao diol-epóxido carcinogênico.
C14851	Benzo[a]pyrene-4,5-oxide	Epóxido reativo de BaP; formador de adutos.
C14786	(1R,2S)-Naphthalene 1,2-oxide	Arene-óxido reativo de naftaleno; tóxico.
C07645	Aldophosphamide	Metabólito de ciclofosfamida; precursor de fosforamida-mostarda.
C05729	R-S-Cysteinylglycine	Intermediário da via do ácido mercaptúrico (degradação de conjugados de GSH).
C11907	dTDP-4-oxo-6-deoxy-D-glucose	Intermediário na biossíntese de L-ramnose bacteriana.
C17556	di-trans,poly-cis-Undecaprenyl phosphate	Carreador lipídico de açúcares na síntese de peptidoglicano/LPS.
C04882	UDP-MurNAc-pentapeptídeo	Precursor citosólico do peptidoglicano (UDP-MurNAc-pentapeptídeo).
C00301	ADP-ribose	Sinalização celular (PARylation) e reparo de DNA.
C00227	Acetyl phosphate	Intermediário de alta energia; doador de fosfato e regulador em bactérias.
C06049	N-Formylderivatives	Derivados N-formil; intermediários em formilação de biomoléculas (ex.: fMet).
C00067	Formaldehyde	Aldeído tóxico; intermediário do metabolismo C1; necessita desintoxicação.
C06899	Chloral hydrate	Sedativo; metabolizado a tricloroetanol.
C16586	2-Phenyl-1,3-propanediol monocarbamate	Derivado carbamato com efeito sedativo/ansiolítico (relacionado a meprobamato).

		4-Hydroxy-5-phenyltetrahydro-1,3-oxazin-2-one	Heterociclo do tipo oxazina; intermediário/fármaco relacionado a carbamatos.
		C15811 [Enzyme]-cysteine	Cisteína do sítio ativo enzimático (nucleófilo catalítico).
		C03688 Apo-[acyl-carrier protein]	Forma apo do ACP antes de receber 4'-fosfopanteteína.
		C00066 tRNA	RNA transportador; entrega aminoácidos na tradução.
		C01417 Cyanate	Agente carbamilante; subproduto do metabolismo da ureia.
		C00831 Pantetheine	Precursor do CoA e do braço 4'-fosfopanteteína do ACP.
		C04079 N-((R)-Pantothenoyl)-L-cysteine	Intermediário na biossíntese de coenzima A.
S0Y1 e SOY8		C00433 2,5-Dioxopentanoate	metabolismo de ácidos dicarboxílicos.
		C01149 4-Trimethylammoniobutanol	Intermediário na biossíntese de carnitina.
		C00555 4-Aminobutyraldehyde	metabolismo de GABA e poliaminas.
		C05130 Imidazole-4-acetaldehyde	Intermediário na degradação de histamina.
		C05985 2-Propynal	Aldeído reativo; intermediário/químico alquilante.
		C01613 Stachyose	Oligossacarídeo (RFO) de transporte/armazenamento de carbono em plantas.
		C16216 3-Oxostearoyl-CoA	Intermediário da β -oxidação de ácidos graxos.
		C00412 Stearoyl-CoA	Acil-CoA C18:0 para síntese/ β -oxidação de lipídios.
		C00510 Oleoyl-CoA	Acil-CoA C18:1 para síntese de membranas e β -oxidação.
		C05697 Selenate	Fonte inorgânica de selênio para vias redox/selenoproteínas.
		C00700 XTP	Nucleotídeo análogo (xantosina trifosfato) no metabolismo de purinas.

C16617	6-Mercaptopurine ribonucleoside triphosphate	Metabólito ativo que inibe a síntese de purinas; pode incorporar em RNA.
C16635	5'-Deoxy-5-fluorocytidine	Análogo de nucleosídeo; pró-fármaco/precursor de 5-FU (antimetabólito).
C18902	Methylselenic acid	Espécie de selênio com atividade redox/antioxidante.
C05938	L-4-Hydroxyglutamate semialdehyde	Intermediário na degradação de 4-hidroxiprolina.
C00012	Peptide	Metabolismo de aminoácidos.
C03078	4-Guanidinobutanamide	Derivado guanidínico ligado ao metabolismo de arginina/creatina.
C02693	(Indol-3-yl)acetamide	Intermediário da biossíntese de auxina (IAA) em plantas/bactérias.
C05651	5-Hydroxykynurenine	Intermediário da via da quinurenina (triptofano).
C00632	3-Hydroxyanthranilate	Precursor de NAD ⁺ na via do triptofano.
C01594	Linamarin	Glicosídeo cianogênico de defesa vegetal (libera cianeto).
C08334	Lotaustralin	Glicosídeo cianogênico de defesa vegetal (libera cianeto).
C08325	Amygdalin	Glicosídeo cianogênico; defesa vegetal.
C01798	D-Glucoside	Glicosídeo de D-glicose; transporte/armazenamento de metabólitos.
C05966	15(S)-HPETE	Intermediário de eicosanoides; sinalização inflamatória.
C05356	5(S)-HPETE	Precursor de leucotrienos (via 5-LOX).
C01879	5-Oxoproline	Pirroglutamato; intermediário do ciclo γ -glutamil (glutathione).
C01322	RX	Símbolo genérico de substrato/reagente orgânico (R-X).
C14870	2-Bromoacetaldehyde	Aldeído alquilante reativo; intermediário tóxico.
C11088	1,2-Dibromoethane	Agente alquilante industrial; tóxico/carcinogênico.

C06790	Trichloroethene	Solvente industrial; contaminante ambiental.
C14840	Bromobenzene-2,3-oxide	Epóxido reativo (metabólito de bromobenzeno); toxicidade hepática.
C14857	1,1-Dichloroethylene epoxide	Epóxido reativo de 1,1-DCE; tóxico hepato/renal.
C14858	2,2-Dichloroacetaldehyde	Aldeído clorado reativo; potencial citotóxico.
C14859	Chloroacetyl chloride	Agente acilante para síntese orgânica; altamente irritante.
C14839	Bromobenzene-3,4-oxide	Epóxido reativo de bromobenzeno; formador de adutos.
C19586	Aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide	Metabólito que forma adutos de DNA; carcinógeno potente.
C14852	Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol	Intermediário rumo ao diol-epóxido carcinogênico.
C14851	Benzo[a]pyrene-4,5-oxide	Epóxido reativo de BaP; formador de adutos.
C14786	(1R,2S)-Naphthalene 1,2-oxide	Arene-óxido reativo de naftaleno; tóxico.
C07645	Aldophosphamide	Metabólito de ciclofosfamida; precursor de fosforamida-mostarda.
C05729	R-S-Cysteinylglycine	Intermediário da via do ácido mercaptúrico (degradação de conjugados de GSH).
C17556	di-trans,poly-cis-Undecaprenyl phosphate	Carreador lipídico de açúcares na síntese de peptidoglicano/LPS.
C04882	UDP-MurNAc-pentapeptídeo	Precursor citosólico do peptidoglicano (UDP-MurNAc-pentapeptídeo).
C00301	ADP-ribose	Sinalização celular (PARylation) e reparo de DNA.
C06049	N-Formylderivatives	Derivados N-formil; intermediários em formilação de biomoléculas (ex.: fMet).
C00067	Formaldehyde	Aldeído tóxico; intermediário do metabolismo C1; requer desintoxicação.

	C06899	Chloral hydrate	Sedativo; metabolizado a tricloroetanol.
	C16586	2-Phenyl-1,3-propanediol monocarbamate	Derivado carbamato com efeito sedativo/ansiolítico (rel. a meprobamato).
	C16595	4-Hydroxy-5-phenyltetrahydro-1,3-oxazin-2-one	Heterociclo tipo oxazina; intermediário/fármaco relacionado a carbamatos.
	C15811	[Enzyme]-cysteine	Cisteína do sítio ativo enzimático (nucleófilo catalítico).
	C03688	Apo-[acyl-carrier protein]	Forma apo do ACP antes de receber 4'-fosfopanteteína.
	C00066	tRNA	RNA transportador; entrega aminoácidos na tradução.
	C06126	Digalactosylceramide	Glicosfingolípido de membrana; papel estrutural e de sinalização.
	C05689	Se-Methyl-L-selenocysteine	Aminoácido de selênio dietético; precursor de metilselenol/antioxidante.
	C00831	Pantetheine	Precursor do CoA e do braço 4'-fosfopanteteína do ACP.
	C04079	N-((R)-Pantothenoyl)-L-cysteine	Intermediário na biossíntese de coenzima A.
PE4A	C00555	4-Aminobutyraldehyde	metabolismo de GABA e poliaminas.
	C01613	Stachyose	Oligossacarídeo (RFO) de transporte/armazenamento de carbono em plantas.
	C16216	3-Oxostearoyl-CoA	Intermediário da β -oxidação de ácidos graxos.
	C16614	6-Methylmercaptapurine	Antagonista de purinas; metabólito de tiopurinas.
	C05697	Selenate	Fonte inorgânica de selênio para vias redox/selenoproteínas.
	C00700	XTP	Análogo nucleotídico (xantosina trifosfato) no metabolismo de purinas.

	6-Mercaptopurine ribonucleoside triphosphate	Metabólito ativo que inibe a síntese de purinas; pode incorporar em RNA.
C16617		
C16633	5-Fluorouridine	Análogo de uridina; antimetabólito que se incorpora ao RNA.
C16635	5'-Deoxy-5-fluorocytidine	Pró-fármaco/precursor de 5-FU; antimetabólito.
C18902	Methylselenic acid	Espécie de selênio com atividade redox/antioxidante.
C05938	L-4-Hydroxyglutamate semialdehyde	Intermediário na degradação de 4-hidroxiprolina.
C01888	Aminoacetone	Intermediário da treonina/glicina; pode gerar metilglioxal reativo.
C00986	1,3-Diaminopropane	Poliamina; produto/precursor da via da espermidina.
C00491	L-Cystine	Forma oxidada de cisteína; pontes dissulfeto/homeostase redox.
C05699	L-Selenocystathionine	Análogo selênio da cistationina; intermediário de selenoaminoácidos.
C03539	S-Ribosyl-L-homocysteine	Intermediário da reciclagem de SAH e precursor de AI-2 (quorum sensing).
C00793	D-Cysteine	Aminoácido D; metabolismo bacteriano e fonte de sulfeto.
C15532	N-Acetyl-L-citrulline	Intermediário ligado ao ciclo da ureia/metabolismo do nitrogênio.
C00012	Peptide	Metabolismo de aminoácidos.
C03078	4-Guanidinobutanamide	Derivado guanidínico ligado ao metabolismo de arginina/creatina.
C02693	(Indol-3-yl)acetamide	Intermediário da biossíntese de auxina (IAA) em plantas/bactérias.
C00632	3-Hydroxyanthranilate	Precursor de NAD ⁺ na via do triptofano.
C01594	Linamarin	Glicosídeo cianogênico de defesa vegetal (libera cianeto).
C08334	Lotaustralin	Glicosídeo cianogênico de defesa vegetal (libera cianeto).
C08325	Amygdalin	Glicosídeo cianogênico; defesa vegetal.

C01798	D-Glucoside	Glicosídeo de D-glicose; transporte/armazenamento de metabólitos.
C05966	15(S)-HPETE	Intermediário de eicosanoides; sinalização inflamatória.
C05356	5(S)-HPETE	Precursor de leucotrienos (via 5-LOX).
C01322	RX	Símbolo genérico de substrato/reagente orgânico (R-X).
C14870	2-Bromoacetaldehyde	Aldeído alquilante reativo; intermediário tóxico.
C11088	1,2-Dibromoethane	Agente alquilante industrial; tóxico/carcinogênico.
C06790	Trichloroethene	Solvente industrial; contaminante ambiental.
C14840	Bromobenzene-2,3-oxide	Epóxido reativo de bromobenzeno; toxicidade hepática.
C14857	1,1-Dichloroethylene epoxide	Epóxido reativo de 1,1-DCE; tóxico hepato/renal.
C14858	2,2-Dichloroacetaldehyde	Aldeído clorado reativo; potencial citotóxico.
C14859	Chloroacetyl chloride	Agente acilante para síntese orgânica; altamente irritante.
C14839	Bromobenzene-3,4-oxide	Epóxido reativo de bromobenzeno; formador de adutos.
C19586	Aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide	Metabólito que forma adutos de DNA; carcinógeno potente.
C14852	Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol	Intermediário rumo ao diol-epóxido carcinogênico.
C14851	Benzo[a]pyrene-4,5-oxide	Epóxido reativo de BaP; formador de adutos.
C14786	(1R,2S)-Naphthalene 1,2-oxide	Arene-óxido reativo de naftaleno; tóxico.
C07645	Aldophosphamide	Metabólito de ciclofosfamida; precursor de fosforamida-mostarda.
C05729	R-S-Cysteinylglycine	Intermediário da via do ácido mercaptúrico (degradação de conjugados de GSH).
C11907	dTDP-4-oxo-6-deoxy-D-glucose	Intermediário na biossíntese de L-ramnose bacteriana.
C17556	di-trans,poly-cis-Undecaprenyl phosphate	Carreador lipídico de açúcares na síntese de peptidoglicano/LPS.

C04882	UDP-MurNAc-pentapeptídeo	Precursor citosólico do peptidoglicano (UDP-MurNAc-pentapeptídeo).
C00301	ADP-ribose	Sinalização celular (PARylation) e reparo de DNA.
C00227	Acetyl phosphate	Intermediário de alta energia; doador de fosfato/regulador em bactérias.
C06049	N-Formylderivatives	Derivados N-formil; intermediários em formilação de biomoléculas (ex.: fMet).
C00067	Formaldehyde	Aldeído tóxico; intermediário do metabolismo C1; requer desintoxicação.
C06899	Chloral hydrate	Sedativo; metabolizado a tricloroetanol.
C16586	2-Phenyl-1,3-propanediol monocarbamate	Derivado carbamato com efeito sedativo/ansiolítico (rel. a meprobamato).
C16595	4-Hydroxy-5-phenyltetrahydro-1,3-oxazin-2-one	Heterociclo tipo oxazina; intermediário/fármaco relacionado a carbamatos.
C15811	[Enzyme]-cysteine	Cisteína do sítio ativo enzimático (nucleófilo catalítico).
C03688	Apo-[acyl-carrier protein]	Forma apo do ACP antes de receber 4'-fosfopanteteína.
C14818	Fe ²⁺	Íon ferroso; cofator redox em muitas enzimas (heme/centros Fe-S).
C00066	tRNA	RNA transportador; entrega aminoácidos na tradução.
C06126	Digalactosylceramide	Glicosfingolípídeo de membrana; função estrutural e sinalização.
C05689	Se-Methyl-L-selenocysteine	Aminoácido de selênio dietético; precursor de metilselenol/antioxidante.
C00831	Pantetheine	Precursor do CoA e do braço 4'-fosfopanteteína do ACP.

C04079 N-((R)-Pantothenoyl)-L-cysteine

Intermediário na biossíntese de coenzima A.