

**MIRELE LOPES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL,  
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS PELO *Bacillus toyonensis* BAC 3151  
E CARACTERIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pBt52**

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*.

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani  
Mateus Ferreira Santana

**VIÇOSA-MINAS GERAIS**

**2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa – Campus Viçosa**

T

S586a Silva, Mirele Lopes da, 1993-  
2019 Avaliação da promoção de crescimento vegetal, controle de fitopatógenos  
pelo *Bacillus toyonensis* BAC 3151 e caracterização do plasmídeo pBt52 /  
Mirele Lopes da Silva. - Viçosa, MG, 2019.  
92f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Bacillus toyonensis*. 2. Micro-organismos - Controle biológico. 3. Feijão  
- Crescimento. 4. Plasmídeos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.362

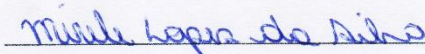
**MIRELE LOPES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL,  
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS PELO *Bacillus toyonensis* BAC 3151  
E CARACTERIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pBt52**

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*.

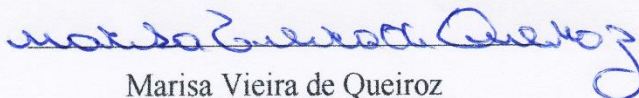
APROVADA: 24 de julho de 2019.

Assentimento:



Mirele Lopes da Silva

Autora



Marisa Vieira de Queiroz

Orientadora

## DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado as pessoas que estiveram ao meu lado ao longo de toda vida: meus pais Divino e Mileide. Também dedico aos meus irmãos Tiago e Mateus, que não mediram esforços para me dar apoio. Ao meu namorado João Paulo, que sempre acreditou em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos diárias e por estar presente em cada decisão tomada em todos os momentos da minha vida.

À toda minha família, em primeiro lugar a minha avó Angelina, por ser um exemplo de mulher guerreira. Aos meus pais, Divino e Mileide, por me apoiarem e incentivarem todos os dias e por me proporcionar os melhores momentos da minha vida. Aos meus irmãos, Tiago e Mateus, pelo apoio e amizade. E ao meu namorado João Paulo, por ser um humano incrível, por acreditar em mim e por sempre segurar a “barra”, te amo muito.

À minha querida professora e orientadora Marisa Vieira de Queiroz pelo exemplo como pessoa e profissional, pelos ensinamentos, pelos incentivos e por ter acreditado que seria capaz de executar este trabalho.

Aos meus coorientadores Mateus e Hilário, por aceitar fazer parte do projeto, pelo incentivo de explorar novas áreas e pelos ensinamentos.

As minhas amigas, “as gatonas”, pela amizade sincera, por serem mulheres guerreiras e minha inspiração, amo muito vocês.

Aos meus amigos do LGMF, pela amizade, pelo convívio diário no laboratório, pelos conselhos e por sempre conseguirem arrancar sorrisos quando a minha vontade era de chorar.

Ao Leandro, Marlon, Michele, Giarlã, Fernando, Thomás, Isabel e Bianca pela amizade e ajuda com análises de dados de bioinformática e com análises das minhas amostras de bacteriocina.

Ao professor José Eustáquio pelos ensinamentos e conselhos que fizeram grande diferença na execução e obtenção dos meus resultados.

Aos funcionários do BIOAGRO pela colaboração e ajuda para manter nosso ambiente de trabalho agradável e organizado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e aos professores pela contribuição em minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e também a FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos demais que, de alguma forma, colaboraram com o meu trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos!

*“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”. (Paulo Freire)*

## **BIOGRAFIA**

MIRELE LOPES DA SILVA, filha de Divino Lopes da Silva e Mileide Aparecida do Carmo Silva, nasceu em 26 de março de 1993, em Viçosa-MG, Brasil.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2017.

Em agosto de 2017, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em julho de 2019.

## RESUMO

SILVA, Mirele Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Avaliação da promoção de crescimento vegetal, controle de fitopatógenos pelo *Bacillus toyonensis* BAC 3151 e caracterização do plasmídeo pBt52.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Mateus Ferreira Santana.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, sendo o país o maior produtor. Além desse cenário, o feijão é um grão importante para o consumo humano. O aumento da produtividade e redução dos custos de produção tem sido associados com o uso de micro-organismos que possam ser integrados ao manejo. Alguns micro-organismos podem promover o crescimento das plantas por mecanismos diretos e indiretos como, por exemplo, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de compostos orgânicos voláteis, produção de enzimas hidrolíticas e controle de patógenos. O feijoeiro comum, assim como os demais vegetais, também é colonizado por micro-organismos endofíticos e por micro-organismos fitopatogênicos. Estudos sobre a diversidade tanto de fungos quanto de bactérias endofíticas cultiváveis do feijoeiro já foram realizados. A diversidade de bactérias endofíticas foi mapeada em três cultivares de *P. vulgaris* e apresentou diferenças de distribuição entre as classes Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacilli. Na classe Bacilli foi isolada uma cepa de *Bacillus toyonensis*, que apresenta um repertório de genes para a produção de vários antimicrobianos, como por exemplo as bacteriocinas. Alguns desses genes de bacteriocinas foram localizados em um plasmídeo pBt52 da bactéria *B. toyonensis* BAC 3151 que foi caracterizado e explorado. O perfil de plasmídeos de *B. toyonensis* BAC 3151 foi analisado neste estudo, a fim de atribuir as funções biológicas desconhecidas, pois muitos plasmídeos controlam propriedades importantes, tais como, resistência a antibióticos, utilização de fontes de carbono alternativas e produção de antimicrobianos. Neste estudo foi confirmada a presença do plasmídeo e foram caracterizados todos os genes. O plasmídeo pBt52 transporta gene que codifica bacteriocina, um gene que confere resistência ao antibiótico teicoplanina e vários genes responsáveis pela manutenção e mecanismos de conjugação deste plasmídeo. Além disso, foi avaliado se *B. toyonensis* BAC 3151 poderia promover o crescimento vegetal de plantas de feijoeiro, por ser um micro-organismos endofítico. O *B. toyonensis* BAC 3151 apresentou a capacidade de fixar nitrogênio, produzir diversas enzimas hidrolíticas (quitinase, protease e amilase) e compostos orgânicos voláteis, e também promoveu um aumento de 31,5 % e 33,6 % do comprimento das raízes e da massa seca das raízes do feijoeiro, respectivamente. Além disso, apresentou 95,2 % e 87,5 %

de atividade de antagonismo *in vitro* e *in vivo* ao patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, reduziu a severidade da antracnose no feijoeiro, causada pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, em 39,3 % e não apresentou atividade de antagonismo ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Portanto, neste trabalho foi demonstrado os benefícios dessa interação hospedeiro-endófito, na qual o *B. toyonensis* BAC 3151 tem potencial no controle de doenças fúngicas e de promover o crescimento do feijoeiro.

Palavras-chave: *Bacillus toyonensis* BAC 3151. Micro-organismos. Controle biológico. Promoção de crescimento. Plasmídeo.

## ABSTRACT

SILVA, Mirele Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Evaluation of plant growth promotion, control of phytopathogens by *Bacillus toyonensis* BAC 3151 and characterization of plasmid pBt52.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisors: Hilário Cuquetto Mantovani and Mateus Ferreira Santana.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a crop of great economic importance to Brazil, being the country the largest producer. In addition to this scenario, beans are an important grain for human consumption. Increased productivity and reduced production costs have been associated with the use of microorganisms that can be integrated with management. Some microorganisms can promote plant growth through direct and indirect mechanisms such as nitrogen fixation, siderophores production, phosphate solubilization, production of volatile organic compounds, production of hydrolytic enzymes and pathogen control. Common bean, like other vegetables, is also colonized by endophytic microorganisms and phytopathogenic microorganisms. Studies on the diversity of both fungus and cultivable endophytic bacteria in bean plants have already been carried out. The diversity of endophytic bacteria was mapped in three cultivars of *P. vulgaris* and presented distribution differences between the classes *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Bacilli*. In the *Bacilli* class, a strain of *Bacillus toyonensis* was isolated, which has a gene repertoire for the production of various antimicrobials, such as bacteriocins. Some of these bacteriocin genes were located in a pBt52 plasmid of the bacterium *B. toyonensis* BAC 3151 that was characterized and explored. The plasmid profile of *B. toyonensis* BAC 3151 was analyzed in this study to attribute unknown biological functions because many plasmids control important properties such as antibiotic resistance, use of alternative carbon sources and antimicrobial production. In this study the presence of the plasmid was confirmed and all genes were characterized. Plasmid pBt52 carries a gene that encodes bacteriocin, a gene that confers resistance to the teicoplanin antibiotic, and several genes responsible for the maintenance and conjugation mechanisms of this pBt52 plasmid. In addition, it was evaluated whether *B. toyonensis* BAC 3151 could promote plant growth of common bean plants as an endophytic microorganism. *B. toyonensis* BAC 3151 showed the ability to fix nitrogen, produce various hydrolytic enzymes (chitinase, protease and amylase) and volatile organic compounds, and also promoted an increase of 31.5% and 33.6 % of root length and dry mass of common bean roots, respectively. In addition, it presented 95.2% and 87.5% antagonism activity in vitro and in vivo to the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. It reduced the severity of anthracnose in common bean caused by *Colletotrichum lindemuthianum*

by 39.3% and showed no antagonistic activity to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Therefore, this work demonstrated the benefits of this host-endophyte interaction, in which *B. toyonensis* BAC 3151 has the potential to control fungal diseases and promote bean growth.

Keywords: *Bacillus toyonensis* BAC 3151. Microorganisms. Biological control. Growth promotion. Plasmid.

## SUMÁRIO

Introdução Geral.....	14
Revisão Bibliográfica .....	16
Cultura do feijão .....	16
Doenças do feijoeiro comum.....	19
Micro-organismos endofíticos.....	21
O gênero <i>Bacillus</i> .....	23
<i>Bacillus toyonensis</i> .....	24
REFERÊNCIAS .....	25
Capítulo 1: O plasmídeo pBt52 da bactéria endofítica do feijoeiro comum <i>Bacillus toyonensis</i> BAC 3151 transporta gene que codifica bacteriocina Columbicina A e gene que confere resistência a teicoplanina .....	32
RESUMO.....	32
Introdução.....	32
Material e Métodos.....	34
Micro-organismo e condições de crescimento .....	34
Número de acesso à sequência de nucleotídeos .....	34
Isolamento e caracterização do plasmídeo .....	34
Extração de DNA total .....	34
Eletroforese de campo pulsado (PFGE) .....	35
Caracterização <i>in silico</i> .....	36
Análise Filogenética .....	36
Antibiograma .....	37
Resultados e Discussão.....	37
Confirmação da presença do plasmídeo pBt52 em <i>B. toyonensis</i> BAC 3151.....	37
Características gerais do plasmídeo pBt52.....	39
Genes de bacteriocinas .....	46

Sequências de inserção .....	47
Análise Filogenética .....	50
Gene de resistência .....	56
Conclusão .....	57
REFERÊNCIAS .....	57
Capítulo 2: Potencial da bactéria endofítica <i>Bacillus toyonensis</i> BAC 3151 para controle de fitopatógenos e promoção de crescimento em feijoeiro comum .....	63
RESUMO.....	63
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	66
Micro-organismos e condições de crescimento.....	66
Ensaio para a caracterização do potencial antifúngico .....	66
Análise <i>in vitro</i> .....	66
Análise <i>in vivo</i> .....	67
Avaliação da supressão da antracnose.....	67
Avaliação da supressão da murcha-de-fusário .....	68
Avaliação da supressão do mofo-branco .....	69
Medição de atividades de promoção de crescimento de plantas <i>in vitro</i> .....	70
Fixação de nitrogênio .....	70
Solubilização de fosfato.....	70
Produção de sideróforos .....	70
Produção de ácido indol acético (AIA) .....	71
Produção de protease .....	71
Produção de quitinase.....	71
Produção de celulase .....	71
Produção de amilase .....	71
Produção de cianeto de hidrogênio (HCN).....	72

Ensaio <i>in vitro</i> para avaliar o efeito de compostos orgânicos voláteis em plantas de feijão .....	72
Avaliação da promoção de crescimento vegetal.....	72
Resultados.....	73
Ensaio para a caracterização do potencial antifúngico .....	73
Análise <i>in vitro</i> .....	73
Análise <i>in vivo</i> .....	75
Atividade de promoção de crescimento de plantas <i>in vitro</i> .....	79
Avaliação da promoção de crescimento vegetal.....	81
Discussão .....	83
Conclusão e perspectiva .....	86
REFERÊNCIAS .....	87
Conclusão Geral .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## Introdução Geral

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta pertencente à família Fabaceae, originária da América (SCHOONHOVEN E VOYSES, 1991). A cultura do feijoeiro está presente em aproximadamente 127 países em todos os continentes, sendo a América responsável por cerca de 34,6 % na produção de feijão no mundo (FAO, 2018). Neste cenário o Brasil se destaca, pois é o país com maior produção, representando 1% da produção mundial de grãos (FAO, 2018). As plantações de feijoeiro são ameaçadas por doenças fúngicas de importância na cultura, e destaca-se a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) a murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (SARTORATO et al., 1994). Estas doenças estão relacionadas com as perdas das lavouras e com a baixa produtividade.

Além desse cenário, o feijão é um grão importante para o consumo humano, devido a presença de proteínas, fibras e carboidratos complexos (SILVA, 2000). Estudos mostram que a população mundial pode passar de 7 bilhões de habitantes para aproximadamente 10 bilhões nos próximos 50 anos, e como consequência haverá o aumento da demanda alimentar. Para atender essa população, estima-se que a produção de alimentos deva crescer em mais de 60% nas próximas décadas (GLICK, 2014). Porém, o aumento de produção não pode ser baseada somente no aumento da área cultivada, e sim no aumento de produtividade agrícola (MARIN et al., 2016), que é dependente do uso de fertilizantes minerais, agentes químicos para o controle de doenças e insumos que causam uma série de impactos negativos tanto ambientais e na saúde humana, quanto econômico (HORRIGAN et al., 2002).

Nesse contexto, a elevação dos níveis de produtividade e redução dos custos de produção tem aumentado o interesse em pesquisas que explorem o potencial tecnológico de micro-organismos que possam integrar o manejo e ainda trazer benefícios, como a promoção de crescimento vegetal, o controle de fitopatógenos e nematoides e a segurança no manuseio e integração deste micro-organismo na cultura (WANG et al., 2010).

*Bacillus* é um gênero abundante na rizosfera e a atividade de promoção de crescimento de plantas de algumas cepas já foi demonstrado, resultando em um amplo conhecimento dos mecanismos envolvidos. Os mecanismos podem ser diretos ou indiretos. Entre os mecanismos diretos estão a síntese de hormônios, compostos orgânicos voláteis (COVs) que regulam o metabolismo de fitohormônios, suprimento de nutrientes por meio de processo como a solubilização de nutrientes (biofertilização) e inibição de senescência e com atividade antimicrobiana (ARKHIPOVA et al., 2005; HASSAN, 2017; RADHAKRISHNAN et al., 2016;

RATH et al., 2018; TAHIR et al., 2017). Os mecanismos indiretos são a indução de resistência sistêmica, inibição de patógenos e regulação de genes responsivos da planta ao estresse abiótico, que é realizada por algumas bactérias do gênero *Bacillus* ( XIE et al., 2014; YOUSAF et al., 2017; ZHAO et al., 2011).

*Bacillus toyonensis* cepa BAC 3151 foi isolada como endófito de folhas do feijoeiro (COSTA et al., 2012). Foi constatado que a cepa BAC 3151 apresenta genes para biossíntese de antimicrobianos, agrupamentos gênicos de bacteriocinas, genes de biossíntese de peptídeos não ribossômicos, de N-acil homoserina lactanase e de quitinases. Alguns desses genes foram localizados em plasmídeos que não foram profundamente explorados (LOPES et al., 2017). Além disso, *B. toyonensis* BAC 3151 pode estar relacionado com a promoção de crescimento vegetal, por ser um micro-organismo endofítico. Desta forma, os objetivos deste estudo consistiram em caracterizar os genes presentes no plasmídeo pBt52, principalmente os relacionados a bacteriocina, avaliar o potencial de *B. toyonensis* BAC 3151 no controle de diferentes fungos fitopatógenos (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum*) e avaliar o desempenho de *B. toyonensis* BAC 3151 em promover o crescimento vegetal do feijoeiro em condições *in vitro* e *in vivo*.

## Revisão Bibliográfica

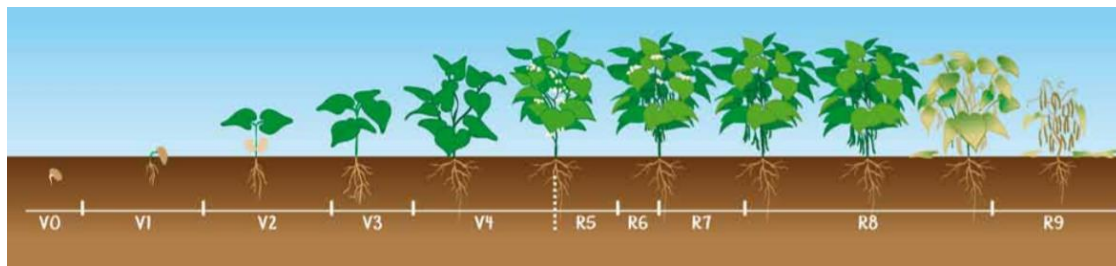
### Cultura do feijão

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), é uma planta originária de dois centros, Mesoamérica e das regiões andinas, e pertence ao membro da família Fabaceae, que inclui cerca de 600 gêneros e cerca de 13 mil espécies. O gênero *Phaseolus* contém de 150 a 200 espécies de plantas, muitas das quais são cultivadas como alimentos ou até mesmo como plantas ornamentais de jardim. O nome específico *P. vulgaris* está relacionado a centenas de variedades de feijão comum que têm sido cultivadas há milhares de anos (SCHOONHOVEN E VOYSES, 1991).

*Phaseolus vulgaris* é uma planta herbácea que possui um sistema radicular pivotante, atingindo aproximadamente 20 cm de comprimento. O caule é herbáceo, sendo o eixo principal da planta, e possui nós, que são os pontos de inserção das folhas e dos quais saem as ramificações. As folhas são de dois tipos, simples e compostas. As folhas simples e opostas são as primárias, já presentes no embrião e as demais folhas são pecioladas, trifolioladas e distribuída de forma alternada no caule (SILVA et al., 2003).

O fruto de *P. vulgaris* é um legume denominado popularmente de vagem, formada por duas partes, as valvas, uma na superfície superior e outra na inferior. As vagens podem apresentar diferentes formas, podendo ser retas ou ligeiramente curvas, achatadas ou arredondadas. A cor das vagens pode ser uniforme ou não, ou seja, elas podem apresentar estrias de uma cor, e variar dependendo do grau de maturação. Em geral, as vagens possuem de três a sete sementes (SILVA et al., 2003).

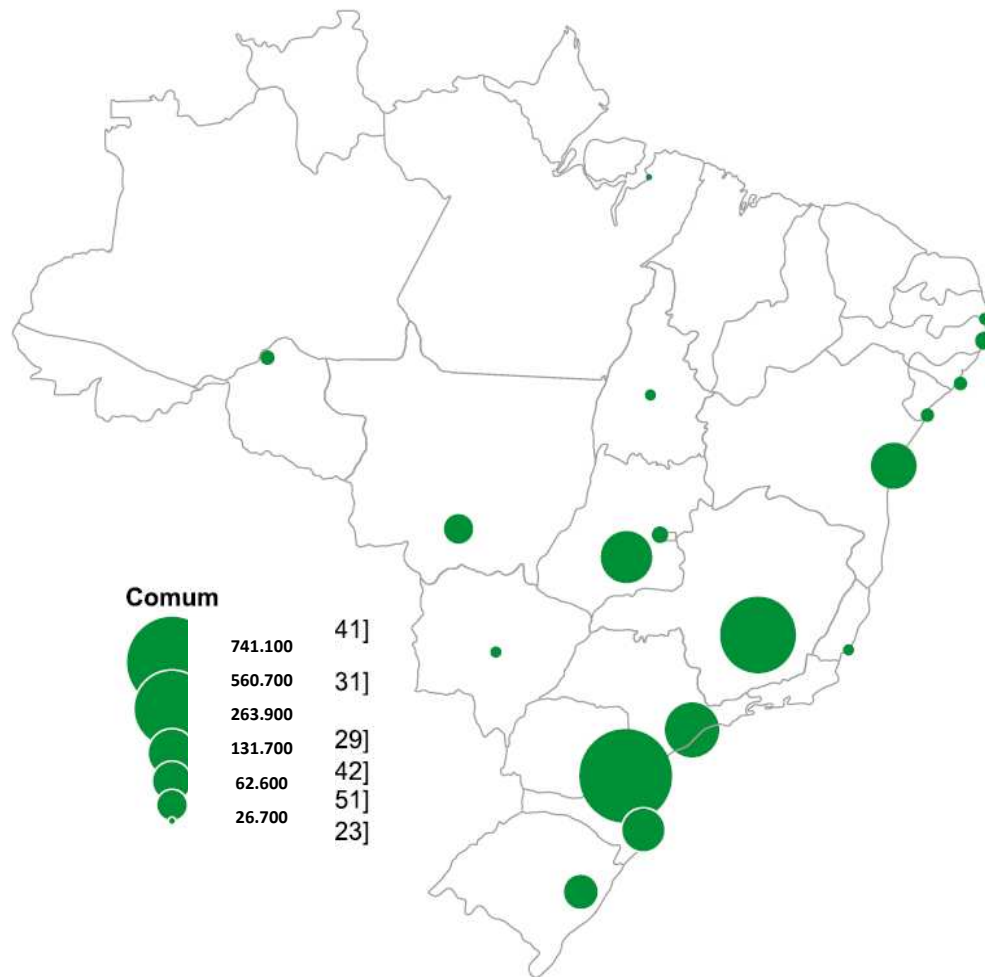
O ciclo de vida do feijoeiro comum é curto, com duração de 90 dias, dependente do cultivar e das condições ambientais. Durante o desenvolvimento, o ciclo biológico do feijoeiro é dividido em fase vegetativa (V) e reprodutiva (R).



**Figura 1: Estágios de desenvolvimento do feijão.** A fase vegetativa (V) e reprodutiva (R) são subdivididas nos seguintes estágios: **V0** - Germinação (iniciada a germinação da semente); **V1**- Emergência (50% dos cotilédones fora do solo); **V2** – Folhas primárias (par de folhas primárias expandidas); **V3** – Primeira folha trifoliada (com folíolos expandidos); **V4** – Terceira folha trifolioladas (com folíolos expandidos); **R5** – Pré-floração (após emissão do primeiro botão ou racimo floral); **R6**- Floração (primeira flor aberta); **R7**- Formação de vagens (primeira vagem com a corola desprendida); **R8**- Enchimento de vagens (início de inchamento das vagens) e **R9**- Maturação fisiológica (quando a primeira vagem começa a descolorir ou secar) (Fonte: Oliveira et al., 2018).

O feijão é uma leguminosa de grão importante para o consumo humano em todo o mundo, devido ao alto teor de proteínas, fibras, carboidratos complexos, vitaminas do complexo B, minerais, aminoácidos essenciais e baixo teor de lipídeos e sódio, sendo considerado um alimento essencial na dieta (BROUGHTON et al., 2003). Além dos benefícios a saúde, também deve ser considerada a importância socioeconômica dessa cultura para o país.

A cultura do feijão representa apenas 1 % da produção mundial de grãos e a produção chega 18,9 milhões de toneladas ao ano. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro no gênero *Phaseolus*, com uma produção de 3,1 milhões de toneladas ao ano e uma produtividade média de 922 kg/ha, perdendo apenas para Myanmar e Índia (FAO, 2018). Segundo levantamento de safra de grãos realizada pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para os anos de 2017/2018, o plantio de feijão atingiu uma área de 3,24 milhões de hectares (CONAB, 2018). Os estados brasileiros Paraná e Minas Gerais são os maiores produtores de feijão com 23,4 % e 20,7 % da produção, respectivamente. O cultivo do feijão nos estados brasileiros acontece em três safras, as quais são denominadas, a safra das águas (outubro a janeiro), a da seca (fevereiro a maio) e outono/inverno (junho a setembro), onde a produtividade é dependente das condições climáticas do país (SILVA, 2000).



**Figura 2:** Produção de feijão comum (*P. vulgaris*) no Brasil- média 2006 a 2019 (toneladas). (CONAB 2018).

O cultivo do feijoeiro é uma atividade agrícola de grande importância econômica, social e nutricional, e está sujeita a grandes riscos, entre os quais estão as doenças e pragas, que são responsáveis por perdas significativas nas lavouras (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE 2010; SARTORATO et al., 1994; CUNHA et al., 2005). *Phaseolus vulgaris* apresenta grande variabilidade genética para várias características, com mais de 200 cultivares recomendados no Brasil. Entre as características de interesse agrônomo, destacam-se a resistência aos patógenos, pois mais de 45 doenças causadas por fungos, bactérias e vírus são citadas na cultura do feijão, sendo que a maioria são transmitidas por sementes (BORÉM E CARNEIRO, 1998).

## Doenças do feijoeiro comum

Dentre as doenças de importância no feijoeiro comum destacam-se a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e o mofo-branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (SARTORATO et al., 1994).

O fungo *C. lindemuthianum* é o agente causal da antracnose, que afeta o feijoeiro comum em todos os estágios de crescimento, e ataca toda a planta, caules, ramos, folhas, vagens e sementes. O fungo *C. lindemuthianum* sobrevive de um cultivo a outro, por meio de micélio dormente, dentro do tegumento da semente, em forma de esporos nos cotilédones das sementes, ou em restos culturais (ARAUJO et al., 1996).

Os sintomas da antracnose são visualizados em todas as partes da planta. Porém, as lesões ocorrem com maior frequência na superfície inferior das folhas e nas nervuras (OLIVEIRA, 1999; PRIA E SILVA, 2010). A antracnose além de afetar negativamente a produtividade, também deprecia a qualidade dos grãos, pois as sementes contaminadas apresentam lesões marrom-escuras ou negras (ABREU, 2005).

O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* é o agente causal da murcha-de-fusário, que penetra pelo sistema radicular do feijoeiro até invadir os vasos do xilema (NELSON et al., 1993). O fungo pode ser transmitido via sementes, sobrevivendo em restos culturais e no solo na forma de estruturas de resistência (clamidósporos). Pode ser disseminado também por vento, enxurrada, água de irrigação, solo aderido a máquinas e equipamentos agrícolas (ABAWI E PASTOR-CORRALES, 1990; SARTORATO et al., 1994).

Quanto aos sintomas da murcha-do-fusário, inicialmente ocorre o amarelamento das folhas basais da planta, progredindo para as folhas da parte superior. Ocorre também a perda da turgência das folhas e em casos mais severos, à morte das plantas. A murcha-de-fusário quando afeta plantas jovens, ocorre a redução do crescimento, afetando o desenvolvimento e a produtividade da cultura (VIEIRA, 1983; ABAWI, 1989).

O fungo *S. sclerotiorum* é o agente causal do mofo-branco, que é capaz de infectar qualquer parte da planta, porém as infecções se iniciam com maior frequência a partir das inflorescências e das axilas das folhas e dos ramos laterais (ABAWI E GROGAN, 1979; KIMATI et al., 2005). A fase de vulnerabilidade do feijoeiro comum é no estágio de floração ao início da formação das vagens (SARTORATO et al., 1994). O mofo-branco produz estruturas de resistência (escleródio) que possibilitam a sua sobrevivência no solo por anos, pois são resistentes a substâncias químicas, calor e congelamento. Além disso, esse patógeno

também pode resistir no solo como micélio ativo em tecido vivo ou morto (ADAMS et al., 1979).

O mofo-branco é caracterizado pela maceração tecidual de aspecto úmido nas plantas parasitadas, apresentando um emaranhado de hifas brancas no local da lesão (MOURA, 2008). Essa lesão se espalha rapidamente para o pecíolo e o caule. Os caules primeiramente formam lesões escuras, que normalmente se desenvolvem em tecidos necróticos e, posteriormente, surgem as manchas de micélio branco com aspecto cotonoso, e geralmente os tecidos são degradados (ABREU, 2011).

O controle dessas doenças é comumente efetuado pela utilização de defensivos agrícolas, no tratamento de sementes ou em aplicações foliares, e adoção de práticas agrícolas, como menores populações de plantas, aumento do turno de rega, quimigação, rotação de culturas e plantio direto (VIEIRA et al., 2001; PAULA JR et al., 2004). Essas medidas proporcionam consideráveis níveis de controle das doenças, mas elevam os custos de produção, frequente inviabilidade operacional e técnica, além de alto risco ambiental.

Uma alternativa que é empregada para o controle das doenças é a utilização de cultivares resistentes para complementar o manejo destas doenças. Estudos mostram que o cultivar Pérola lançado em 1994 pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e o cultivar Manteigão Fosco 11 são exemplos de cultivares que são resistentes a murcha-de-fusário, porém são susceptíveis as outras doenças relatadas acima (YOKOYAMA et al., 1999; PEREIRA et al., 2011). O programa de melhoramento genético do feijoeiro comum da Embrapa Arroz e Feijão desenvolveu o cultivar BRS Estilo com destaque na resistência do grão a antracnose (MELO et al., 2010). Entretanto não há informações suficientes acerca dos níveis de resistência das cultivares de feijoeiro, ao patógenos *S. sclerotiorum*, além disso poucos trabalhos têm sido desenvolvidos (CARVALHO et al., 2013).

Portanto, na busca de elevação dos níveis atuais de produtividade e redução dos custos de produção, principalmente em relação ao controle de pragas e doenças do feijoeiro, tem crescido o interesse em pesquisas que explorem o potencial tecnológico de micro-organismos que possam ser integrados ao manejo da cultura e ainda trazer benefícios a cultura e ao meio ambiente, como nenhum ou baixo impacto ambiental, promoção de crescimento do vegetal, controle de patógenos e nematoides, além de segurança no manuseio e integração destes micro-organismos na cultura do feijão (WANG et al., 2010).

### **Micro-organismos endofíticos**

Micro-organismos endofíticos são todos aqueles capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, tecidos vegetais internos das plantas, sem causar danos aparentes às plantas hospedeiras e sem formar estruturas externas visíveis (HALLMANN et al., 1997). Provavelmente, todos os vegetais são colonizados por micro-organismos endofíticos.

A co-evolução ao longo prazo de plantas e micro-organismos endofíticos sucedeu em um ecossistema particular, onde os micro-organismos se adaptaram para sobreviver em um ambiente com compostos biologicamente ativos, ou seja, receberem nutrientes e proteção da planta hospedeira. Além disso, estes ajudam as plantas hospedeiras a se adaptarem e sobreviverem em condições de estresse biótico e abiótico, como por exemplo a tolerância a infecção, elevadas temperaturas, salinidade, contaminantes (metais pesados) e até resistência à pragas e doenças, por meio da produção de metabólitos secundários, enzimas e antibióticos, competição pelo espaço e nutrientes e/ou pela modulação de resposta de resistência das plantas (HARDOIM et al., 2015; INDIRAGANDHI et al., 2008; RYAN et al., 2008; SANTOYO et al., 2016; WANG et al., 2000; YAISH et al., 2015).

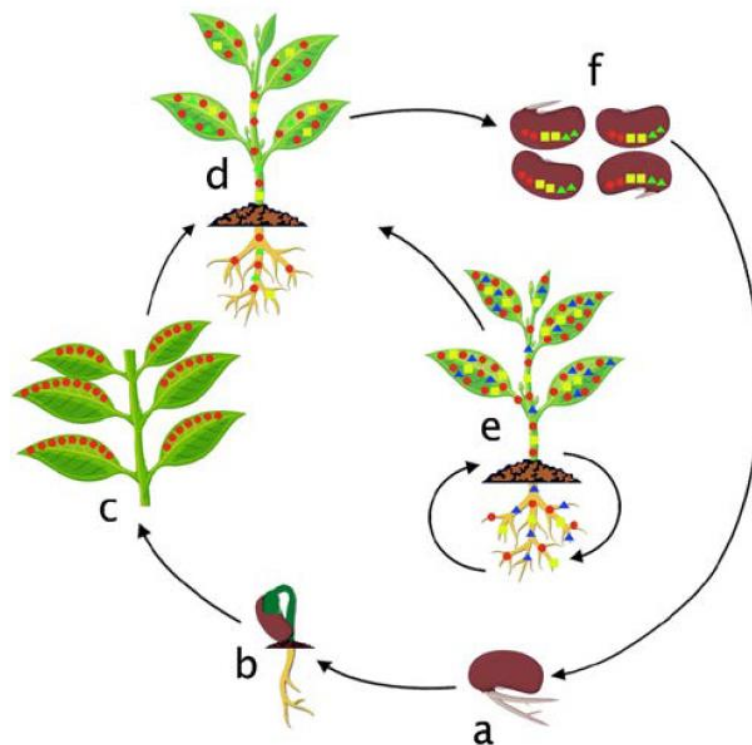
Os micro-organismos endofíticos podem acelerar o desenvolvimento de plântulas, promover o crescimento das plantas, produzindo uma série de produtos que facilitam a absorção primária e secundária de nutrientes, por meio da fixação de nitrogênio atmosférico, formação de sideróforos e a solubilização de minerais na rizosfera (GOTHWAL et al., 2008; IQBAL et al., 2010; KANG et al., 2009; WANG et al., 1993). Os micro-organismos endofíticos também podem fornecer às raízes, como promotores de crescimento, hormônios como auxina, citocina e giberelina (BHORE et al., 2010; KANG et al., 2009).

Muitos destes micro-organismos endofíticos possuem capacidade de degradar compostos xenobióticos. Além disso, alguns endófitos tem resistência a metais pesados/antimicrobianos e degradam compostos orgânicos provavelmente decorrente da sua exposição a diversos compostos no nicho da planta/solo (RYAN et al., 2008). Diante desse rico arsenal de metabólitos envolvidos na defesa, bem como na interação com a planta, alguns compostos podem também desempenhar um papel de processos de sinalização, *quorum sensing* intraespécies e interespcies (BRADER et al., 2014).

A interação entre plantas e micro-organismos pode ocorrer de duas formas: de maneira passiva, quando os micro-organismos são levados por soluções do solo, ou de maneira ativa, por meio de movimentação dos micro-organismos em direção as raízes das plantas direcionados por quimiotaxia em direção aos fotossintatos ou exsudados radiculares. Estes compostos

influenciam na interação e comunicação das comunidades microbianas, e, conseqüentemente levam ao processo de colonização das plantas hospedeiras pelos micro-organismos (SILVA et al, 2003).

Em relação a parte aérea das plantas, os micro-organismos endofíticos podem realizar a colonização através de estômatos, feridas e hidatódios, sendo estes os principais pontos de entrada para os endofíticos acessarem os tecidos internos das plantas (AZEVEDO et al., 2000). Além disso, os micro-organismos podem produzir e secretar enzimas, como celulases, pectinase, xilanases e endoglucanases, que facilitam a penetração ativa e disseminação destes micro-organismos dentro das plantas. Os micro-organismos endofíticos podem também ser transferidos verticalmente, ou seja, a planta-mãe transfere para a planta-filha via sementes (AZEVEDO et al., 2000; KANDEL et al., 2017).



**Figura 3: Ciclo hipotético de colonização de bactérias endofíticas na planta hospedeira. (a)** Mobilização de sementes em germinação de plântulas. **(b)** Recrutamento de endófitos do solo no desenvolvimento de mudas. **(c)** Colonização por endófitos. **(d)** Colonização da planta inteira por endófitos. **(e)** Variação de comunidades endofíticas na planta hospedeira em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos. **(f)** Transferência vertical de endófitos em sementes (Fonte: Kandel et al., 2017).

Estudos sobre a diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis do feijoeiro já foram realizados, nos quais três cultivares de *P. vulgaris* apresentaram diferenças de distribuição entre as classes Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacilli (COSTA et al., 2012).

### **O gênero *Bacillus***

Bactérias representam um grupo dominante da diversidade que existe em vários nichos ecológicos, pois possuem uma capacidade metabólica que desempenha um papel importante no ciclo de nutrientes geoquímicos, desintoxicação ambiental e metabólitos que são de aplicação farmacêutica, agrícola, industrial e medicinal (LYNGWI et al., 2014).

As bactérias do gênero *Bacillus* são encontradas em diversos ambientes, como solo e argila, rochas, poeira, ambientes aquáticos, vegetação, alimentos e tratos gastrointestinais de vários insetos e animais (CHECINSKA et al., 2015). Os membros deste gênero são bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, em forma de bastonetes, gram-positivas e formadoras de esporos em diferentes condições ambientais e nutricionais. A produção de endósporo permite que bactérias desse gênero consiga sobreviver e crescer em ecossistemas diferentes (CHECINSKA et al., 2015).

As bactérias do gênero *Bacillus* são fenotipicamente e genotipicamente heterogêneas, exibindo grande variação na composição de aminoácidos das paredes celulares e extensa variação na composição de bases de DNA. Com a análise de sequenciamento da região 16S rRNA foi possível revelar o alto nível de heterogeneidade filogenética (LYNGWI et al., 2014). A diferença fenotípica e as diferenças no número de genes e de genes específicos de uma cepa, estão intimamente relacionadas, e é explicadas pela presença principalmente de elementos moveis, como os plasmídeos, transposon, fagos, integrons e ilhas genômicas (FROST et al., 2005; HELGASON et al., 2000). Algumas diferenças nos fenótipos são resultantes das características mediadas pelos plasmídeos e não pelos cromossomos (FANG et al., 2011).

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* possuem a capacidade de produzir moléculas com atividade contra patógenos e contra micro-organismos competidores, gerando vantagem seletiva. As moléculas antimicrobianas podem ser peptídeos sintetizados pelos ribossomos (bacteriocinas), peptídeos antimicrobianos, sintetizados sem a participação de ribossomos (NRPs) e policetídeos (PKs), assim como antimicrobianos incomuns e outros metabólitos secundários (ABRIOUEL et al., 2011; LOPES et al., 2017).

Algumas espécies de *Bacillus* também demonstraram a capacidade de produzir enzimas que hidrolisam ou modificam a estrutura química das moléculas autoindutoras, responsáveis

pelo controle de expressão gênica de fatores de virulência de patógenos bacterianos, ou seja, controlam efetivamente a virulência regulado por *quorum sensing* (CHEN et al., 2013).

*Bacillus* é o gênero mais abundante na rizosfera e a atividade de promoção de crescimento das plantas de algumas cepas é conhecida, resultando em um amplo conhecimento dos mecanismos envolvidos. Os mecanismos podem ser diretos ou indiretos. Entre os mecanismos diretos estão a síntese de hormônios, por exemplo 3-ácido indol acético (AIA), giberelinas, citocinas e espermidinas, compostos orgânicos voláteis (COVs), como acetoína, 2,3-butanodiol, albuterol e 1,3-propanodiol, que regulam o metabolismo de fitohormônios, suprimento de nutrientes por meio de processos como a solubilização de nutrientes (biofertilização) e inibição de senescência, com a produção e secreção de 1-aminocilopropano-1-carboxilato desanimase (ACC) que inibe a síntese de etileno (ARKHIPOVA et al., 2005; HASSAN, 2017; RADHAKRISHNAN et al., 2016; RATH et al., 2018; TAHIR et al., 2017). Entre os mecanismos indiretos estão a indução de resistência sistêmica e inibição de patógenos, produção de enzimas hidrolíticas e produção de cianeto de hidrogênio, e regulação da expressão de genes responsivos da planta ao estresse abiótico (XIE et al., 2014; YOUSAF et al., 2017; ZHAO et al., 2011).

Portanto, cepas de bactérias do gênero *Bacillus* e seus produtos, podem ser usadas juntamente com outras práticas de manejo de culturas de maneira promissora, podendo ser aplicadas de forma racional e como alternativa segura em relação aos produtos químicos sintéticos.

### ***Bacillus toyonensis***

*Bacillus toyonensis* é uma espécie descrita recentemente. O primeiro estudo foi realizado pelos pesquisadores Jiménez et al. (2013), usando a cepa BCT-7112T que é aplicada como probiótico em nutrição animal. Esta cepa foi primeiramente identificada como *Bacillus cereus* var *toyoi*, sendo usada como ingrediente ativo da preparação de Toyocerin (Rubinum®). Porém, estudos anteriores indicaram que a cepa poderia representar uma espécie diferente do grupo de *B. cereus*. Uma abordagem polifásica foi feita para determinar o status taxonômico e reclassificou a cepa como *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013a, 2013b).

Costa et al. (2012) isolaram uma bactéria endofítica do feijoeiro (BAC 3151), que foi identificada inicialmente com base na análise da sequência do gene do rRNA 16S como *B. thuringiensis*. Posteriormente, o genoma desta cepa foi sequenciada e apresentou 99,49 % de identidade com o genoma de *B. toyonensis* BCT7112T, o que levou a classificação da cepa

BAC 3151 como *B. toyonensis* (LOPES et al., 2017). Foi constatado que a cepa BAC 3151 apresenta genes para biossíntese de antimicrobianos, agrupamentos gênicos de bacteriocinas, genes de biossíntese de peptídeos não ribossômicos, de N-acil homoserina lactanase e de quitinases. Alguns desses genes foram localizados em plasmídeos que não foram profundamente explorados.

*Bacillus toyonensis* tem potencial para produzir vários antimicrobianos, sendo importante para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças microbianas da cultura do feijoeiro. Além de ser um micro-organismo endofítico que pode estar relacionado com a promoção de crescimento vegetal.

## REFERÊNCIAS

- ABAWI, C. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Root rots of bean in Latin American and África: diagnosis, research, methodologies, and management strategies. CIAT, Cali, p. 114, 1990.
- ABAWI, G. S.; GROGAM, R. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 65, n. 3, p. 300-309, 1979.
- ABAWI, G. S. Root Rots. In: SCHAWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (Eds). Bean production problems in the tropics. 2<sup>nd</sup>. Ed. CIAT, Cali, p. 105-157. 1989
- ABREU, A. DE. F. B. et al. Cultivo de feijão da primeira e segunda safra na região sul de Minas Gerais. **EMBRAPA**. 2005
- ABREU, M. J. Caracterização de isolados do agente causal do mofo-branco do feijoeiro. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- ABRIOUEL, H. et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 201–232, 2011.
- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, 1979.
- ARAUJO, R. S., et al. Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. Piracicaba, **Potafos**, 1996.
- ARKHIPOVA, T. N. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, v. 272,

n. 1–2, p. 201–209, 2005.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Eletronic Journal of Biotechnology**. 2000

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: Vieira et al. (eds). Feijão: Aspectos gerais e a cultura no Estado de Minas Gerais. Viçosa, MG: UFV, p. 13-17, 1998.

BHORE, S. J. et al. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of *Sambung Nyawa* [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. **Bioinformation**, v. 5, n. 5, p. 191–197, 2010.

BRADER, G. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, 2014.

BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.

CARVALHO, R. S. B. et al. Selection of carioca common bean progenies resistant to white mold. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 172-177, 2013.

CHECINSKA, A. et al. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 351–369, 2015.

CHEN, G. L. et al. PRAP: An ab initio software package for automated genome-wide analysis of DNA repeats for prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2683–2689, 2013.

CUNHA, J. A., et al. Avaliação de pontas de pulverização hidráulicas na aplicação de fungicida em feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1069-1074, 2005.

Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB. Safra de feijão total (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> safra). Brasília. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/item/7677-feijao-total-1-2-e-3-safras>>. Acesso em: 25 de maio de 2019.

COSTA, L. E. DE O. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1562–75, 2012.

FANG, Y. et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, n. 12, p. 567–576, 2011.

Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). Statistical Database. Crop Statistics Beans. Disponível em: <<http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/bean/en/>>. Acesso em: 24 de maio de 2019.

FROST, L. S. et al. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722–732, 2005.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GOTHWAL, R. K. et al. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 101–109, 2008.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HASSAN, S. E. D. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 687–695, 2017.

HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* — One Species on the Basis of Genetic Evidence One Species on the Basis of Genetic Evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627–2630, 2000.

HORRIGAN, L. et al. How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 445–456, 2002.

INDIRAGANDHI, P. et al. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1037–1045, 2008.

IQBAL, U. et al. Effect of zinc-phosphate-solubilizing bacterial isolates on growth of *Vigna*

radiata. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 243–248, 2010.

JIMÉNEZ, G. et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T , the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. **Genome Announcements ASM**, v. 1, n. 6, p. e01080-13, 2013a.

JIMÉNEZ, G. et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383–391, 2013b.

KANDEL, S. et al. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 77, 2017.

KANG, S. M. et al. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 2, p. 277–281, 2009.

KIMATI, H., et al. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. **Agronômica Ceres**, 2005.

LOPES, R. et al. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 0, 2017.

LOPES, R. et al. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 0, 2018.

LYNGWI, N. A; JOSHI, S. R. Chapter 3 Economically important *Bacillus* and related genera : a mini review. **Biology of Useful Plants and Microbes**, n. June, p. 33–43, 2014.

MARIN, F. R. et al. Intensificação sustentável da agricultura brasileira Cenários para 2050. **Política Agrícola**, v. 3, p. 108–124, 2016.

MELO, L. C. et al. BRS Estilo: cultivar de grão tipo comercial carioca, com arquitetura de planta ereta associada com alto potencial produtivo. **EMBRAPA**. 2010

MOURA, A. L. D. Efeito da cafeína sobre a regulação da expressão gênica de poligalacturonases em *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

- NELSON, P. E., et al. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. **The Pennsylvania State University Press**, 1993.
- OLIVEIRA, M. G. DE C. et al. Conhecendo a Fenologia do Feijoeiro e Seus Aspectos Fitotécnicos. **EMBRAPA**. 2018.
- OLIVEIRA, S. H. F. Doenças do feijoeiro: Guia de identificação, fenologia e controle. **EMBRAPA**, São Paulo, 1999.
- PAULA JR, T., et al. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. Belo Horizonte: **Informe Agropecuário**, p. 112, 2004.
- PEREIRA, M. J. Z., et al. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 940-947, 2011.
- PRIA, M.D.; SILVA, O. C. Antracnose. Cultura do feijão: doenças e controle, p. 49-56, 2010.
- RADHAKRISHNAN, R. et al. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 181–189, 2016.
- RATH, M. et al. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, v. 208, p. 76–84, 2018.
- RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.
- SARTORATO, A. et al. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. **EMBRAPA**, 1994.
- SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSEST, O. Common beans: Research for crop improvement. **CAB International**; Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Oxon, GB, 980 p. 1991.
- SILVA, H. T. DA; COSTA, A. O. Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero *Phaseolus* L. (*Leguminosae*). **EMBRAPA**, v. 1, n. 1, p. 40, 2003.

- SILVA, G. M. B. Feijão. **SEAB- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná**, p. 28–43, 2000.
- SOUZA, S. Aspectos econômicos da produção de feijão no Brasil. **EMBRAPA**. n. April, 2015.
- VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: UFV, p. 231. 1983.
- VIEIRA, R. F., et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle de mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 770-773, 2001.
- TAHIR, H. A. S. et al. Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. February, p. 1–11, 2017.
- WANG, C. et al. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gac* A derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 898–907, 2000.
- WANG, N. et al. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 589–594, 2010.
- WANG, Y. et al. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant, Cell & Environment**, v. 16, n. 5, p. 579–585, 1993.
- XIE, S. et al. Plant Growth Promotion by Spermidine-Producing *Bacillus subtilis* OKB105. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 7, p. 655–663, 2014.
- YAISH, M. W. et al. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 1519–1532, 2015.
- YOKOYAMA, L. P. et al. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão "Pérola": avaliação preliminar. **Empraba Arroz e feijão**. 1999
- YOUSAF, M. et al. High-yielding Wheat Varieties Harbour Superior Plant Growth Promoting-Bacterial Endophytes. **Applied Food Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 143–154, 2017.
- ZHAO, L. et al. Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain MQ23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian**

**Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 567–575, 2011.

## Capítulo 1: O plasmídeo pBt52 da bactéria endofítica do feijoeiro comum *Bacillus toyonensis* BAC 3151 transporta gene que codifica bacteriocina Columbicina A e gene que confere resistência a teicoplanina

### RESUMO

*Bacillus toyonensis* BAC3151 é uma bactéria endofítica, Gram-positiva, isolada das folhas do feijoeiro comum. A análise do genoma desta bactéria demonstrou a presença de plasmídeos, que ainda não foram completamente caracterizados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar os genes presentes em um plasmídeo nomeado pBt52 de *B. toyonensis* BAC 3151. O plasmídeo pBt52 possui 52.150 pb, 54 ORFs, 30 % de conteúdo GC e densidade gênica próxima de 1. Foram identificados ORFs relacionadas ao sistema de manutenção do plasmídeo, sistema de conjugação e um sistema de secreção do tipo 4 (T4SS) que difere de outros sistemas T4SS de bactérias Gram-positivas. Além disso, o plasmídeo pBt52 carrega um gene que codifica a bacteriocina Columbicina A, que pertence a uma classe de antimicrobianos que tem um espectro de ação contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas; um gene que codifica a proteína VanZ que confere resistência ao antibiótico teicoplanina, que inibe a síntese da parede celular de bactérias Gram-positivas; elementos transponíveis de diferentes famílias, que não foram detectados no cromossomo de *B. toyonensis* BAC3151. Essas sequências podem ser importantes para a colonização do feijoeiro e a competição com outras bactérias.

Palavras-chaves: Caracterização, antimicrobiano, resistência a antibiótico e transposases.

### Introdução

*Bacillus toyonensis* é uma bactéria anaeróbica facultativa, em forma de bastonete, Gram-positiva e formadora de esporos em diferentes condições ambientais e nutricionais (CHECINSKA et al., 2015). É uma espécie descrita recentemente, onde o primeiro estudo foi realizado pelos pesquisadores Jiménez et al. (2013), usando a cepa BCT-7112T como probiótico em nutrição animal. Essa cepa de *B. toyonensis* foi identificada inicialmente como *Bacillus cereus* var *toyoi*, e por meio de uma abordagem polifásica foi possível determinar o status taxonômico, e reclassificá-la como *Bacillus toyonensis*.

Costa et al. (2012) isolaram uma bactéria endofítica do feijoeiro (BAC 3151), que foi identificada, com base na análise da sequência do gene do rRNA 16S, como *Bacillus thuringiensis*. Posteriormente, o genoma desta cepa foi sequenciado e apresentou 99,49% de identidade com o genoma de *B. toyonensis* (cepa BCT-7112), o que levou a classificação da

cepa BAC 3151 como *B. toyonensis*. A cepa BAC 3151 apresenta um repertório genético para antimicrobianos, como agrupamentos gênicos de bacteriocinas, genes de biossíntese de peptídeo não ribossômicos, de N-acil homoserina lactanase e de quitinases maior do que o observado em outras cepas de *Bacillus*, sendo que alguns desses genes estão localizados em plasmídeos (LOPES et al., 2017).

Os plasmídeos são replicons extracromossômicos móveis, que permitem a adaptação e evolução por meio de variabilidade genética, pois são vetores da transferência horizontal de genes entre as bactérias (CARATTOLI, 2013). As modificações permitem a plasticidade do genoma, consequentemente a variação entre as bactérias e podem conferir propriedades adaptativas, como a capacidade de degradação de xenobióticos, resistência a metais pesados, resistência a antibióticos, virulência e produção de moléculas e metabólitos secundários com ação contra patógenos de plantas ou animais e micro-organismos competidores (BRADER et al., 2014; HARDOIM et al., 2015; INDIRAGANDHI et al., 2008). Além dos plasmídeos, os elementos transponíveis, como as sequências de inserção (ISs) e transposon, também são responsáveis pela transferência horizontal de genes e organização dos genomas bacterianos (INDIRAGANDHI et al., 2008) As ISs são elementos transponíveis menores e mais numerosos presentes no genoma bacteriano e são classificados em diferentes famílias de acordo com a sequência da transposase, a sequência alvo, entre outros (MAHILLON et al., 1998; SIGUIER et al., 2014).

Entre as moléculas que podem ser codificadas por plasmídeos estão as bacteriocinas, que são peptídeos sintetizados por ribossomos. As bacteriocinas são moléculas usualmente antagonistas, que inibem ou matam micro-organismos filogeneticamente relacionados, mas também podem atuar em micro-organismos não relacionados que compartilham um nicho microbiano em comum (KLAENHAMMER, 1985; PACHECO-CANO et al., 2014). As bacteriocinas são classificadas de acordo com a estrutura química, estabilidade térmica, massa molecular, sensibilidade enzimática, presença de aminoácidos modificados e o modo de ação (OGAKI et al., 2015).

Nas últimas décadas, houve um aumento no relato de bacteriocinas ou substâncias semelhantes à bacteriocinas no gênero *Bacillus*, tais como thuricina, cereina, subtilisina A, tolworthicina 524 e megacina (ABRIOUEL et al., 2011; BIZANI et al., 2002; NORMA et al., 2013; PACHECO-CANO et al., 2014). Estes peptídeos têm um espectro de ação maior quando comparado com as bacteriocinas de bactérias Gram-negativas e também têm potencial de uso diversificado nas indústrias alimentícia, como conservantes naturais, farmacêutica, como

alternativa aos antibióticos convencionais e na agricultura, como bioproteção contra deterioração pré e pós colheita de vegetais ou como promotores de crescimento (ABRIOUEL et al., 2011; BIZANI et al., 2002; NORMA et al., 2013; PACHECO-CANO et al., 2014; STEIN, 2005).

As bactérias podem apresentar diferentes mecanismos de resistência a antibióticos que incluem proteção alvo, substituição de alvo, desintoxicação de antibiótico e bloqueio de acúmulo de antibiótico intracelular, e muitas vezes é necessário a aquisição de genes para aperfeiçoar esses mecanismos. A aquisição de genes pode ocorrer por meio da transferência de genes, em plasmídeos conjugativos, elementos transponíveis e sistemas de integrons, que movimentam esses genes de uma célula bacteriana para outra (CLEWELL, 2006).

No presente estudo, foi realizado um estudo *in silico* detalhado das propriedades genéticas do plasmídeo pBt52 de *B. toyonensis* BAC 3151 visando explorar a importância do plasmídeo para a bactéria.

## **Material e Métodos**

### **Micro-organismo e condições de crescimento**

A cepa *B. toyonensis* BAC 3151 faz parte da coleção de bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum do Laboratório de Genética Molecular de Fungos/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A bactéria foi cultivada em meio ágar-triptona-soja (TSA) 10% (1,5 g/L de triptona, 0,5 g/L de peptona de soja e 1,5 g/L de NaCl, pH 7,3) a 28 °C, com agitação de 150 rpm por 24 h (LOPES et al., 2017).

### **Número de acesso à sequência de nucleotídeos**

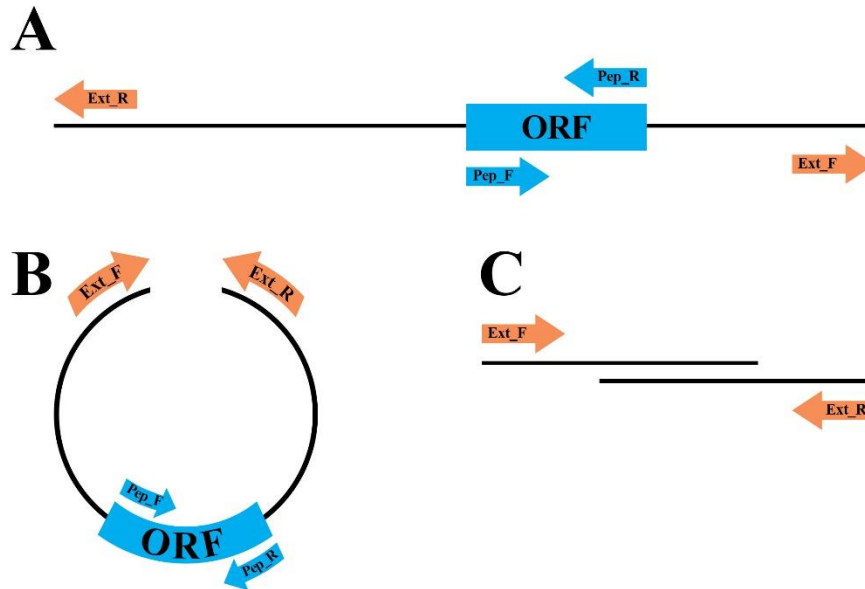
A sequência de nucleotídeos do plasmídeo foi obtida do banco de dados GenBank (NCBI) sob o número de acesso NZ\_LDKD02000003.1

### **Isolamento e caracterização do plasmídeo**

#### **Extração de DNA total**

A extração de DNA total de *B. toyonensis* BAC 3151 foi feita usando o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* da Promega seguindo recomendações do fabricante. O DNA total foi usado para uma reação de PCR. Para determinar a presença do plasmídeo foram desenhados primers, Pep\_F (CGTGAAAAGATGACCGGTTT) e Pep\_R (CGTTTGGTTCCTTCTGGTGT), que amplificam um fragmento de 300 pb da ORF 13. Além disso, para confirmar a presença do plasmídeo pBt52 e que se tratava de um elemento circular foram desenhados os primers Ext\_F (TGGCCTTGTGTGGTCTCATA) e Ext\_R

(ACACGCTTGAGGAAGGAGAA) que anelam nas extremidades da sequência em direções opostas (Fig. 1). Estes *primers* produzem um amplicon de 750 pb. As condições de PCR para ambas as reações foram: 94 °C por 4 min, 30 X (94 °C por 30 s, 53 °C por 90 s e 72 °C por 90 s) e 72 °C por 7 min.



**Figura 1: Representação esquemática das regiões de anelamento dos primers utilizados para confirmar a presença de um plasmídeo circular. (A)** Sequência linear do plasmídeo pBt52, onde linha preta representa a sequência de DNA do plasmídeo, as setas azuis representam os primers Pep\_F (CGTGAAAAGATGACCGGTTT) e Pep\_R (CGTTTGGTTCCTTCTGGTGT) que se anelam na ORF 13 que codifica uma peptidase e as setas laranjas representam os primers Ext\_F (TGGCCTTGTGTGGTCTCATA) e Ext\_R (ACACGCTTGAGGAAGGAGAA) que se anelam nas extremidades opostas do plasmídeos. **(B)** Representação esquemática da sequência circular do plasmídeo e as setas laranjas representa os primers desenhados a partir das extremidades opostas do plasmídeo e as setas azuis os primers se anelando na ORF 13. **(C)** Representação do amplicon de 750 pb das extremidades opostas do plasmídeo com sobreposição de sequência confirmando que o plasmídeo está circular e completo.

### Eletofórese de campo pulsado (PFGE)

A metodologia empregada foi descrita por Li et al. (2007). Foi usado o aparelho CHED-DR III *pulsed-field system* (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O marcador molecular utilizado foi *ProMega-Markers® Lambda Ladders* (50-1000 kb). As células da bactéria foram embebidas em agarose e lisadas *in situ*, sendo então submetidas a PFGE.

### **Caracterização *in silico***

O programa ORFinder do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi utilizado para localizar ORFs (*Open Reading Frame*) com valor mínimo de até 150 nucleotídeos na sequência de DNA do plasmídeo. Em seguida, as ORFs foram anotadas por meio de BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool protein*) contra o banco de sequências *non-redundant protein database (nr)* presente no NCBI. Foram utilizados como ponto de corte *e-value*  $<10^{-5}$  e identidade  $> 30\%$  (ROMBEL et al., 2002; SILVEIRA et al., 2015).

Pesquisas nos bancos de dados COG (*Clusters of Orthologous Groups*) (TATUSOV et al., 2000), CDD (*Conserved Domain Database*) (MARCHLER-BAUER et al., 2015), Pfam (*Protein families Database*) (FINN et al., 2014), SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (LETUNIC et al., 2018), Uniprot (*Universal Protein Resource*) (CONSORTIUM, 2018) e TIGRFAMs (HAFT, 2002) foram feitas para examinar ORFs individuais, com nenhuma função atribuída quando as sequências do plasmídeo foram comparadas ao *non-redundant protein database (nr)*.

O DoriC *database* foi utilizado para pesquisar a origem de replicação do plasmídeo pBt52 (LUO et al., 2019).

O *software* OriTFinder foi utilizado para identificar o sítio da origem de transferência (oriT) do plasmídeo, genes de proteínas do sistema de secreção do tipo IV e genes de fatores de virulência (LI et al., 2018). Os genes de biossíntese de metabólitos secundários detectados foram identificados utilizando os bancos de dados específico, antiSMASH (BLIN et al., 2017) e BAGEL4 (VAN HEEL et al., 2018).

As sequências de inserção (ISs) foram detectadas por comparação com sequências presentes no banco de dados do ISFinder. Foi utilizando o BLAST considerando *e-value*  $\leq 10^{-5}$  (SIGUIER, 2006). Com o ISFinder foi possível identificar a origem, distribuição, e o grupo de famílias das SIs, as sequências das extremidades dos elementos e as ORFs. As ORFs foram comparadas com sequências presentes no *non-redundant protein database (nr)* no NCBI por meio de Blastp (PRUITT et al., 2007). A identificação dos transposons foi baseada na detecção de sequências repetidas ou presença de repetições invertidas segundo a *pipeline* desenvolvida por Kamoun et al. (2013) e pelo *software* PRAP (*Prokaryotic Repeats Annotation Program*) (CHEN et al., 2013).

### **Análise Filogenética**

As análises filogenéticas foram conduzidas para as sequências de aminoácidos deduzidas codificadas pelas ORF 16 que codifica uma transposase da família IS6, ORF 33/34

que codifica duas transposase da família IS200/IS605, e ORF 52 que codifica a transposase\_31 putativa presente no plasmídeo pBt52. Essas ORFs foram analisadas filogeneticamente, pois não foram encontradas no cromossomo de *B. toyonensis* BAC3151 e também a fim de avaliar se essas ORFs são conservadas em outras espécies de *Bacillus*. As ORFs que codificam a proteína RepB e a bacteriocina Columbicina A também foram analisadas. As sequências de referência foram selecionadas a partir dos resultados da análise BLASTp e por buscas no NCBI. As sequências foram alinhadas por *Clustal Omega* (PARK et al., 2019) e as árvores filogenéticas foram desenhadas com um método de máxima verossimilhança, com valor de bootstrap de 1000, usando o software MEGA10 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)(KUMAR et al., 2018).

### **Antibiograma**

A susceptibilidade de *B. toyonensis* BAC 3151 ao antibiótico teicoplanina foi determinado pelo método de difusão em ágar. *Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi cultivado em meio líquido TSA 10 % nas condições citadas anteriormente. Uma alíquota de 100 µL foi inoculada em placa de Petri com meio TSA 10% por *spread plate* e adicionado um disco do antibiótico teicoplanina a uma concentração de 30 µg/mL. Após 24 h, foi medido o halo de inibição de crescimento da colônia com o paquímetro e o valor obtido foi comparado com valores padrões para determinar se *B. toyonensis* BAC 3151 era susceptível, intermediário ou resistente ao antibiótico teicoplanina (BAUER et al., 1996; STANDARDS et al., 2018).

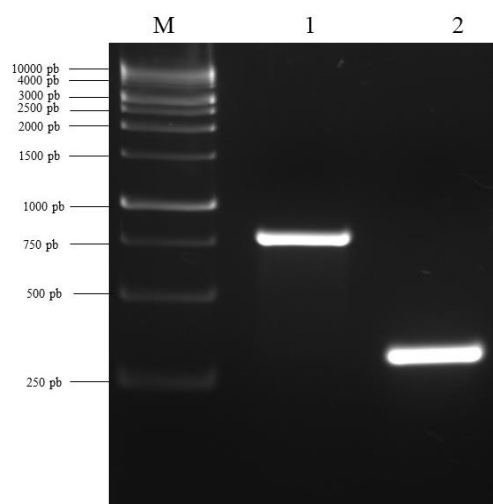
### **Resultados e Discussão**

#### **Confirmação da presença do plasmídeo pBt52 em *B. toyonensis* BAC 3151**

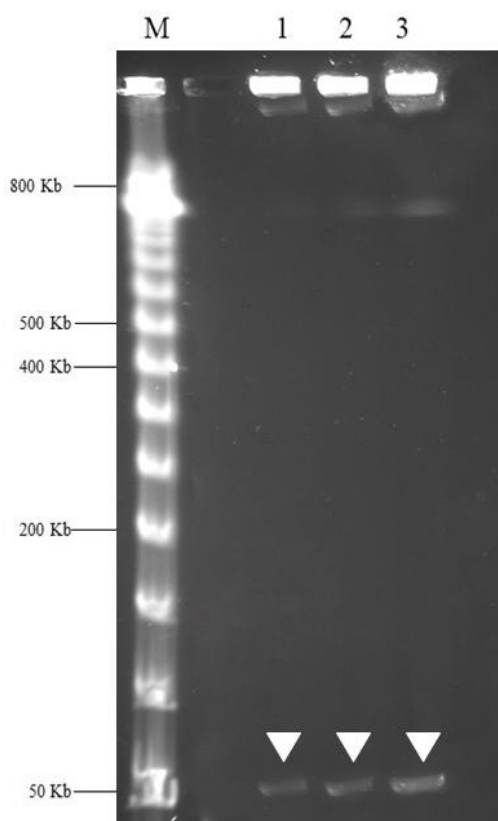
Com o objetivo de confirmar a presença do plasmídeo pBt52 em *B. toyonensis* BAC 3151 foram desenhados *primers* para a amplificação de parte do gene que codifica uma peptidase (ORF 13) presente no plasmídeo. Além disso, para determinar se a sequência do plasmídeo pBt52 descrita por Lopes et al. (2017) estava completa e que se tratava de um elemento circular, foram desenhados *primers* em direções opostas nas extremidades da sequência do plasmídeo depositada (Fig. 1). Os amplicons de 750 pb e 300 pb obtidos demonstraram a presença do plasmídeo pBt52 na cepa BAC 3151 e que a sequência descrita por Lopes et al. (2017) representa o plasmídeo completo (Fig. 2). Outra técnica também empregada para a detecção do plasmídeo pBt52 foi a PFGE, que mostrou que *B. toyonensis* BAC3151 possui um elemento extracromossômico de aproximadamente 50 Kb (Fig. 3), que representa o tamanho aproximado do plasmídeo pBt52, que possui 52 150 pb. Os resultados obtidos comprovam que as duas técnicas são eficientes e poderão ser empregadas futuramente

com sucesso para a detecção do plasmídeo pBt52. Embora a PFGE seja uma técnica mais longa e trabalhosa, o seu uso possibilita a detecção de rearranjos envolvendo o plasmídeo, como a inserção ou excisão de elementos transponíveis.

Uma sequência apresentando 99,7% de identidade e 89% de cobertura com a sequência de pBt52 foi encontrada em um plasmídeo de *Bacillus* sp. FDAARGOS-235 (número de acesso: CP020436.2), e uma pequena parte dessa sequência foi observada também em um plasmídeo da cepa de *B. toyonensis* BCT-7112, com cobertura de 28% e identidade de 95,16 % (JIMÉNEZ et al., 2013a, 2013b) (número de acesso: CP006864.1), mas esta sequência não foi observada em outros genomas de outras cepas de *B. toyonensis* sequenciadas. A sequência encontrada em *B. toyonensis* BCT-7112 representa um gene que codifica uma proteína ParM/StbA, que é responsável pelo processo de partição do plasmídeo. Esse resultado mostra que este plasmídeo pBt52 pode ter sofrido rearranjo e tenha sido incorporado no genoma de outras espécies de *Bacillus* e também que parte deste plasmídeo vem sendo mantido em plasmídeos de *B. toyonensis*.



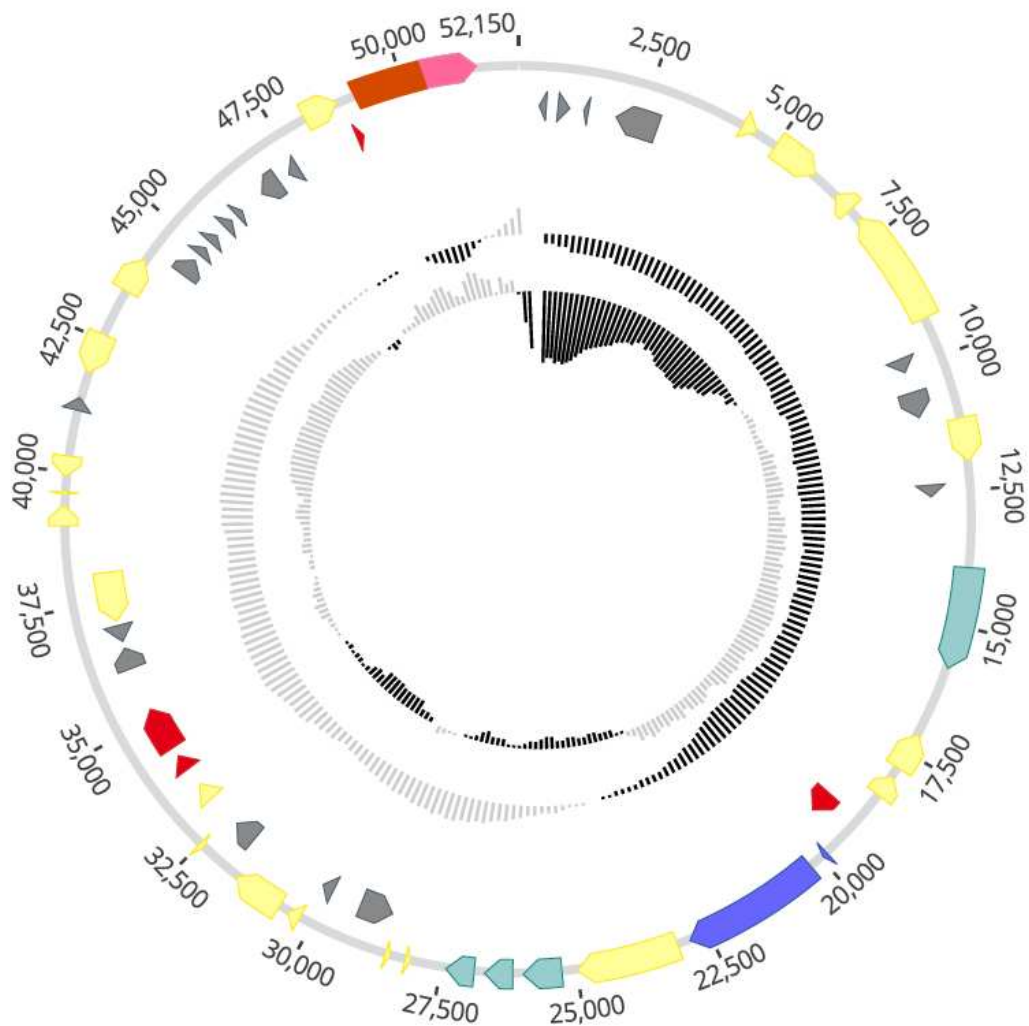
**Figura 2: Comprovação da presença do plasmídeo pBt52 em *B. toyonensis* BAC 3151.** Foi utilizado um gel de agarose 1,2 %. **(1)** Fragmento de 750 pb que comprova que o elemento é circular; **(2)** Fragmento de 300 pb do gene que codifica uma peptidase (ORF 13); **(M)** Marcador molecular *GeneRuler™ DNA Ladder* 1Kb.



**Figura 3: Perfil eletroforético do genoma de *B. toyonensis* BAC 5131.** A eletroforese em campo pulsado foi operada a 6 V/cm a 12 °C por 20 h usando o tempo de pulso de 3s a 50 s. Os triângulos brancos indicam a presença do plasmídeo. (M) Marcador molecular *ProMega-Markers® Lambda Ladders* (50-1000 kb).

### **Características gerais do plasmídeo pBt52**

A sequência completa do plasmídeo pBt52 foi caracterizada neste estudo. O plasmídeo pBt52 possui 52.150 pb com 54 *Open Reading Frame* (ORFs), que codificam 20 proteínas hipotéticas, uma bacteriocina, três transposases, uma proteína VanZ que confere resistência à teicoplanina e 29 outras ORFs que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo e a proteínas transportadores (Tabela 1). Esse plasmídeo possui um conteúdo G+C de 30% e densidade gênica próxima de 1. O conteúdo GC do plasmídeo é muito próximo ao conteúdo GC do cromossomo (34,9 %) descrito por Lopes et al. (2017) (Fig. 4).



**Figura 4: Representação circular do plasmídeo pBt52 de *B. toyonensis* BAC 3151.** O círculo interno representa a inclinação GC  $[(G - C) / (G + C)]$ , com valores positivos em cinza escuro e negativos em cinza claro. O segundo círculo corresponde ao conteúdo G+C, com um valor médio de 30 %, como linha base. O círculo externo representa os genes previstos nas duas cadeias. Seta laranja: origem de replicação; Seta rosa: proteína RepB; setas vermelhas: genes relacionados aos transposons; setas azuis: genes relacionados às bacteriocinas; setas verdes: genes relacionados aos transportadores ABC; setas amarelas: demais genes e setas cinzas: proteínas hipotéticas.

**Tabela 1:** *Open Reading Frame* (ORFs) presentes no plasmídeo pBt52.

<b>ORF</b>	<b>Posição (nt)</b>	<b>Possível Função</b>	<b>Identidade</b>	<b>Cobertura</b>	<b><i>e-value</i></b>
<b>1</b>	434-661	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>2</b>	828-1148	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>3</b>	1319-1522	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>4</b>	1982-3007	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>5</b>	4309-4701	Oxirredutase tiol-dissulfeto	100 %	100 %	7e <sup>-89</sup>
<b>6</b>	4924-6027	D-alanil D-alanina carboxipeptidase	100 %	100 %	0
<b>7</b>	6458-6982	Sinal de peptidase I	100 %	99, 43 %	1e <sup>-121</sup>
<b>8</b>	7050-9437	Metaloprotease	100 %	100 %	0
<b>9</b>	9740-10111	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>10</b>	10371-11069	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>11</b>	11091-12059	Gama-carboxilase	100 %	100 %	0
<b>12</b>	12376-12696	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>13</b>	13812-15917	Peptidase	100 %	100%	2,16e <sup>-118</sup>
<b>14</b>	17132-18043	Integrase	100 %	93 %	5e <sup>-98</sup>
<b>15</b>	18045-18650	Recombinase	100 %	100 %	2e <sup>-127</sup>
<b>16</b>	18956-19601	Transposase da família IS6	98, 19 %	99 %	9e <sup>-95</sup>
<b>17</b>	19883-20050	Columbicina A	100 %	98 %	1e <sup>-20</sup>
<b>18</b>	20142-22970	Lantipeptídeo sintetase tipo 2 LanM	100 %	100 %	0
<b>19</b>	22985-25087	Peptidase	100 %	100 %	0
<b>20</b>	25159-26064	Transportador ABC	100 %	100 %	0
<b>21</b>	26067-26792	Permease de Transportador ABC	100 %	100 %	1e <sup>-164</sup>

22	26808-27506	Transportador ABC	100 %	100 %	2e <sup>-125</sup>
23	28061-28252	Proteína SpoIIIE	98,41 %	98 %	2e <sup>-35</sup>
24	28463-28648	RNA chaperona Hfq	100 %	98 %	7e <sup>-35</sup>
25	28648-29505	Proteína Hipotética	-	-	-
26	29910-30242	Proteína Hipotética	-	-	-
27	30236-30559	Relaxase	100 %	37,4 %	0
28	30572-31735	FtsZ/SpoIIIE	100 %	100 %	0
29	31719-32372	Proteína Hipotética	-	-	-
30	32401-32622	Regulador transcricional da família XRE	100 %	98 %	5e <sup>-46</sup>
31	33001-33459	Proteína com domínio DUF559	100 %	100 %	1e <sup>-108</sup>
32	33493-33660	Proteína de ligação ao DNA	100 %	100 %	0
33	33755-34153	Transposase da família IS200/IS605	100 %	100 %	5e <sup>-93</sup>
34	34165-35277	Transposase da família IS200/IS605	100 %	100 %	5e <sup>-93</sup>
35	35985-36569	Proteína Hipotética	-	-	-
36	36621-37040	Proteína Hipotética	-	-	-
37	37068-38234	Proteína da família ParM/StbA	100 %	100 %	0
38	38910-39470	Regulador transcricional da família XRE	100 %	100 %	3e <sup>-131</sup>
39	39549-39725	D-alanil D-alanina carboxipeptidase	100 %	98 %	1e <sup>-32</sup>
40	39925-40473	Proteína da família VanZ	100 %	100 %	4e <sup>-124</sup>
41	41122-41448	Proteína Hipotética	-	-	-
42	41856-42782	Sítio-específico de integrase	100 %	100 %	0
43	43381-44250	Peptidase	100 %	100 %	2e <sup>-166</sup>
44	44275-44835	Proteína Hipotética	-	-	-
45	44854-45174	Proteína Hipotética	-	-	-

<b>46</b>	45200-45496	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>47</b>	45626-45907	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>48</b>	45978-46184	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>49</b>	46627-47229	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>50</b>	47299-47619	Proteína Hipotética	-	-	-
<b>51</b>	47980-48864	ATPase	100 %	95 %	0
<b>52</b>	48865-49098	Transposase_31	100 %	94,8 %	6,61e <sup>-10</sup>
<b>53</b>	49099-50278	Origem de replicação	100%	100%	0
<b>54</b>	50279-51490	Proteína iniciadora de replicação de plasmídeo da família RepB	100 %	95,75 %	0

No plasmídeo pBt52 foram detectadas quatro ORFs (ORF 28, ORF 37, ORF 53 e ORF 54) cuja possíveis funções previstas foram reconhecidas como responsáveis pela manutenção do plasmídeo e pela conjugação. A ORF 53 representa a origem de replicação, cuja identidade foi de 100 % com a sequência da origem de replicação do plasmídeo FDAARGOS\_235 de *Bacillus* sp. A origem de replicação só foi encontrada devido a similaridade do plasmídeo pBt52 com o plasmídeo FDAARGOS\_235. O plasmídeo FDAARGOS\_235 possui a sequência completa e através do *DoriC database* foi possível determinar a origem de replicação deste plasmídeo. Posteriormente por meio da sequência da origem de replicação do plasmídeo FDAARGOS\_235 foi feito o BLASTn que mostrou uma similaridade com a sequência do plasmídeo pBt52 de *B. toyonensis*, e assim, foi determinada a origem de replicação.

A ORF 54 representa o gene RepB que codifica uma proteína iniciadora de replicação em círculo rolante (RCR), cuja identidade foi de 100 % e 99,75 % com as sequências de proteínas RepB de múltiplas espécies de *Bacillus* (número de acesso: WP\_033659126.1) e de *Bacillus cereus* (número de acesso: EEL36830.1), respectivamente. A proteína RepB atua como endonuclease, clivando as fitas de DNA em um lugar específico, na origem de replicação, e também possui atividade de transferência de cadeia que, simultaneamente com a atividade de endonuclease, catalisa o processo de finalização da replicação (KHAN, 1997; MACHÓN et al., 2015). Plasmídeos que utilizam o mecanismo RCR apresentam regiões denominadas *dso* (*double-strand origin*), usualmente localizadas *upstream* da proteína Rep, e estas são regiões ricas em AT ou são flanqueadas por repetições diretas ou estruturas em *hairpin*, e possuem um sítio *nick*, onde ocorre a interação de RepB com o DNA, sendo importante para o início da replicação (KHAN, 2000).

Embora tenha sido encontrado a ORF que codifica a proteína RepB, a região *dso* não foi detectada na sequência do plasmídeo. Uma hipótese é que o sítio *nick* desse plasmídeo seja diferente dos descritos em outros plasmídeos. Entretanto, um sítio *nick*, foi encontrado na ORF 52, do gene que codifica a transposase\_31 putativa, truncada, que está localizada *upstream* da proteína RepB. Futuramente deverá ser analisada se esse sítio *nick* presente na ORF 52 é funcional e se esse sítio foi domesticado para o processo de replicação. O processo de domesticação de elementos transponíveis em procariotos é um processo relativamente raro, ocorre com maior frequência em eucariotos. Um outro aspecto importante em relação ao impacto das ISs no genoma dos procariotos é que existem poucos estudos detalhando a capacidade do hospedeiro em aproveitar a capacidade ou a propriedade destas ISs para executar várias funções celulares (GILBERT et al., 2013).

O plasmídeo pBt52 apresenta uma ORF 37 com alta identidade com o gene ParM/StbA encontrado em *Bacillus sp.*, cuja identidade foi de 100 % e 99,74 % com proteínas da família ParM/StbA de múltiplas espécies de *Bacillus* (número de acesso: WP\_000705231.1) e *Bacillus cereus* (número de acesso: WP\_023441349.1), respectivamente. A partição de plasmídeos é um processo que assegura que plasmídeos de baixo número de cópias sejam transferidos para células filhas, evitando a perda durante divisão celular. O mecanismo de partição ocorre com o movimento direcional dos plasmídeos e são dependentes de um complexo de nucleoproteínas, que segrega o plasmídeo ativamente, a partir de uma ATPase (ParM), também conhecida como StbA e de uma proteína (ParR) de ligação a uma região de nucleação (parC)(JENSEN et al., 2002). Não foram encontradas sequências com identidade ao gene que codifica ParR e nem a região de nucleação parC. Há duas possibilidades, ou essas sequências diferem muito das sequências já descritas ou o plasmídeo pBt52 não possui um sistema de partição funcional. A proteína ParM é um homólogo bacteriano de actina, que polimeriza em filamentos semelhantes à F-actina e desempenha papel crucial na partição do plasmídeo (JIANG et al., 2016; VAN DEN ENT et al., 2002).

A ORF 28 apresenta identidade com o gene FtsZ/SpoIIIE que codifica uma translocase. Esta translocase putativa pode estar envolvida com o processo de conjugação. A identidade da proteína codificada pela ORF 28 foi de 99,74 % e 98,19 % com a proteína FtsZ DNA translocase de múltiplas espécies de *Bacillus* (número de acesso: WP\_090863527.1) e de *Bacillus toyonensis* (número de acesso: WP\_098059184.1), respectivamente. A proteína FtsZ possui dois domínios, o N-terminal que está envolvido na divisão celular e o C-terminal que é essencial para o processo de segregação cromossômica. Já a proteína SpoIIIE é responsável pelo processo de exportação de DNA, atuando com uma bomba de dsDNA para transferir DNA da célula mãe para o esporo durante a esporulação (BISSON-FILHO et al., 2015; JIANG et al., 2016; SHARP et al., 1999). Estudos mostram que essas translocases de DNA podem estar envolvidas no movimento do DNA e, portanto, podem desempenhar um papel semelhante ao das proteínas de acoplamento em outros sistemas de conjugação como, por exemplo, o plasmídeo pXO16 de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, sendo um mecanismo de conjugação bem distante daqueles que empregam sistemas T4SS (sistema de secreção do tipo IV) de bactérias gram-positivas (MAKART et al., 2018). A ORF 28 foi analisada pela *pipeline* OriTFinder e foi caracterizada como sendo um gene semelhante ao que codifica a proteína do sistema de secreção do tipo IV. O plasmídeo pBt52 também possui uma ORF 27 que codifica uma proteína relaxase, que está próxima a esta translocase. O mecanismo de conjugação de bactérias gram-negativas é bastante conservado e depende de um sistema de secreção do tipo IV, que é

composto por uma relaxase e uma região oriT. Entretanto acredita-se que o sistema de conjugação em bactérias gram-positivas seja composto por estruturas mais simples, porém semelhantes ao T4SS, devido à ausência de pilus conjugativos e a diferença na composição da parede celular (MECSAS et al., 2016). Futuramente deverá ser analisada a transferência do plasmídeo pBt52 por meio de conjugação. Somente depois desse experimento, será comprovado se essa ORF 28 faz parte do sistema de conjugação e se essa proteína é funcional e essencial para desempenhar o papel de transferência.

### **Genes de bacteriocinas**

Os genes relacionados a biossíntese de metabólitos secundários detectados no plasmídeo pBt52 (ORF 17 e ORF 18) codificam uma bacteriocina lanpeptídeo tipo A2 e uma lantipeptídeo sintetase tipo 2 LanM. A bacteriocina apresentou identidade de 100% e 98,18% com lanpeptídeo do tipo A2 de múltiplas espécies de *Bacillus* (número de acesso: WP\_000447118.1) e *Bacillus cereus* (número de acesso: WP\_016101383.1), respectivamente. Por meio da análise nos bancos de dados específicos, antiSMASH e BAGEL4, foi possível determinar a bacteriocina como sendo Columbicina A. Entretanto, esse resultado difere do apresentado por Lopes et al. (2017), que classificaram a bacteriocina codificada pela ORF 17 como sendo uma thuricina, mas por meio do alinhamento de diversas sequências de thuricina de espécies de *Bacillus* foi observado que não houve alinhamento com a sequência da bacteriocina de *B. toyonensis*, confirmando que o resultado obtido aqui está correto. Essa classificação errônea deve ter acontecido devido à falta de informações em banco de dados em relação as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.

Columbicina é um lantibiótico da classe I tipo A. Os lantibióticos apresentam aminoácidos incomuns em suas estruturas, incluindo lantionina, metil-lantionina, didehidrobutirina e didehidroalanina (KLAENHAMMER, 1985; PARADA et al., 2007). Bacteriocinas dessa classe são traduzidas em moléculas precursoras (pró-peptídeo) que sofrem modificações pós traducionais, gerando assim os produtos finais. As bacteriocinas de classe I são pequenas, tendo massa molecular tipicamente menores que 10 kDa e as do tipo A são hidrofóbicas, flexíveis, formadoras de poros na membrana, catiônicas e comumente policíclicas e alongadas. As cargas positivas dentro dos lantibióticos auxiliam na formação de poros, especificamente durante a interação inicial e inserção em uma membrana aniônica (OGAKI, et al., 2015; SAHL, et al., 1995). A Columbicina A de *B. toyonensis* BAC 3151 tem uma massa molecular de aproximadamente 6,2 kDa, possui na sua sequência de aminoácidos dois resíduos de didehidrobutirina e o peptídeo-líder é constituído pelos 21 primeiros aminoácidos, METEKYLQVVEDEELEQLVGG-AGPGWVETLTKDCPGACVIIMGQKICKKCY.

Os lantibióticos da classe I tipo A podem ser divididos em subgrupos A1 e A2, de acordo com as enzimas envolvidas na maturação da molécula do lantibiótico. A ORF 18 que codifica uma enzima de modificação, sintetase LanM, pode ser responsável pelas reações de desidratação e ciclização necessárias para formar lantionina, metil-lantionina, didehidrobutirina e didehidroalanina. A Columbicina pertence então ao subgrupo A2. Além disso, outros resultados que apoiam esta conclusão, é a presença de duas ORFs que codificam uma peptidase (ORF 19) e um transportador ABC (ORF 20), que possivelmente atuam no processo de exportação da bacteriocina (ASADUZZAMAN et al., 2009).

Os resultados obtidos indicam a síntese da bacteriocina Columbicina A por *B. toyonensis* BAC 3151 e a sua possível participação na atividade antimicrobiana detectada nesta bactéria (LOPES et al., 2017). Essa bacteriocina está presente também em outras cepas de *B. toyonensis* e é comum em espécies de *Bacillus*. Além disso, os genes envolvidos na sua biossíntese também já foram encontrados em plasmídeos de outras cepas de *B. toyonensis* e em bactérias da espécie *Enterococcus* (CONSORTIUM, 2018).

### **Sequências de inserção**

As sequências de inserção (ISs) são elementos móveis, pequenos, geralmente de tamanho de 2 kb. A maioria destes elementos codifica apenas as funções necessárias para a sua mobilidade/transposição, que são transposases codificadas por uma ou duas ORFs. A transposição requer sequências repetidas presentes nas extremidades das transposases e o sítio alvo (MAHILLON et al., 1998; SIGUIER et al., 2014).

Foram preditas três ORFs (ORF 16, ORF 33 e ORF 34), que correspondem a uma transposase da família IS6 e transposases da família IS200/IS605. Inicialmente a ORF 52 não teve função atribuída pelo ORFinder, sendo denominada como proteína hipotética. Porém, uma análise mais refinada usando o banco de dados TIGRFAMs revelou que se tratava de uma transposase\_31 putativa. Para complementar esse resultado, a comparação com sequências do banco de dados ISFinder mostrou as sequências das extremidades dos elementos e permitiu classificar a família das ISs.

**Tabela 2:** Sequências de inserção (ISs) encontradas no plasmídeo pBt52.

ORF	Comprimento (pb)	Cópias presentes	Família IS	RD <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Mecanismo de transposição
16	690	1	IS6	8 pb	51 pb	Replicativo
33/34	398/ 1112	1	IS200/IS605	-	-	Conservativo
52	234*	1	Transposase_31	-	-	-

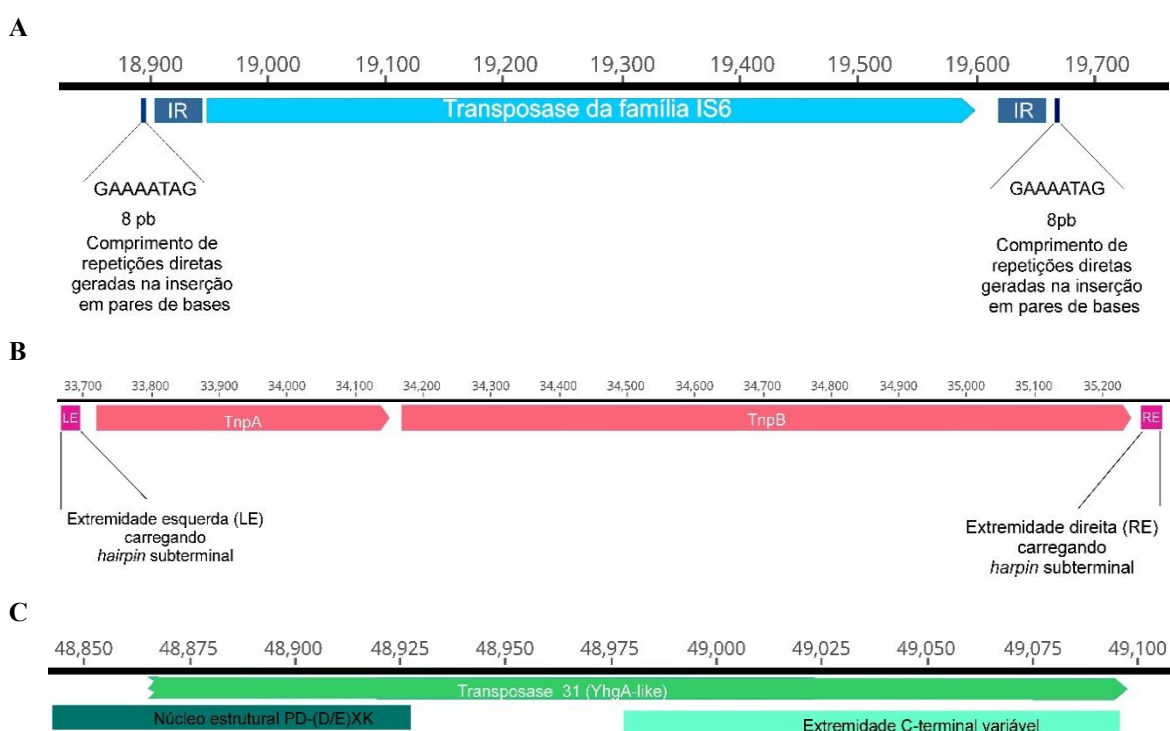
<sup>a</sup> Repetições diretas; <sup>b</sup> repetições invertidas; \* proteína truncada

No plasmídeo pBt52, a ORF 16 codifica uma transposase comumente relacionada a sequência de inserção da família IS6, com identidade de 89,19% com sequências de *Bacillus cereus* (número de acesso: WP\_000410174.1) e de *Bacillus pseudomycooides* (número de acesso: WP\_098623651.1). A ORF 16 possui 690 pb e faz parte de uma IS que apresenta repetições invertidas (IRs) longas com 51 pb, cuja a integração cria repetições diretas do sítio alvo (DRs) de 8 pb (GAAAATAG). A transposase apresenta um sítio catalítico, motivo DDE, composto por três resíduos de carboxilato responsáveis pela coordenação dos íons metálicos necessários para a catálise (Fig. 5 A). O mecanismo de transposição é denominado replicativo, com formação de um co-integrado e posterior resolução por meio de recombinação sítio-específica (MAHILLON et al., 1998; SIGUIER et al., 2014).

As ORFs 33/34 codificam duas proteínas, TnpA e TnpB, pertencentes a elementos da família IS200/IS605, com identidade de 100% e 96,21% com sequências de múltiplas espécies de *Bacillus* (número de acesso: WP\_000762741.1) e com *Bacillus cereus* (número de acesso: WP\_002204118.1), respectivamente. Os genes TnpA e TnpB possuem 398 pb e 1112 pb. Esse elemento não duplica o sítio de inserção; as repetições invertidas são regiões subterminais palindrômicas, possuem sítios de ligação das transposases (LE e RE) com a sequência TAGC. A transposase apresenta um sítio catalítico, motivo HUH/Y1, composto por três aminoácidos, histidina (H)-resíduo hidrofóbico volumoso (U)-histidina (H) e ainda um único resíduo de tirosina (Y1). Ainda não se sabe a função da TnpB, porém ela auxilia na transposição (Fig. 5 B). O mecanismo de transposição é denominado conservativo, onde são utilizados intermediários de DNA fita simples (HE et al., 2015).

A ORF 52 codifica uma transposase\_31 putativa truncada (*YhgA-like*), cuja identidade foi de 100% com uma proteína promotora de recombinação, que é uma nucleasse putativa da família Rpn/ transposase de *Bacillus cereus* (número de acesso: WP\_078417237.1). A transposase\_31 apresenta domínio fosfodiesterase conservado, PD-(D/E) XK, e este domínio é pertencente a superfamília de nucleases Rpn/transposase (Fig. 5 C). Pouco se sabe sobre a

função e o mecanismo de transposição dos elementos que usam a transposase\_31 (FEDER et al., 2005). Kingston et al. (2017) demonstraram que a transposase\_31 de *Escherichia coli* tem relevância para a mobilidade genética, pois a expressão dessa proteína aumenta a recombinação independente de RecA, contribuindo para os eventos de transferência horizontal de genes. Por meio do alinhamento de sequências de aminoácidos de transposases\_31 de espécies de *Bacillus*, foi observado que a região N-terminal é mais conservada e a região C-terminal é mais variável. Sequências de inserção truncadas frequentemente são negligenciadas nas anotações, por não serem reconhecidas pelos programas e muitas das vezes atribuídas como proteínas hipotéticas, mas contribuem para a evolução e organização do genoma.



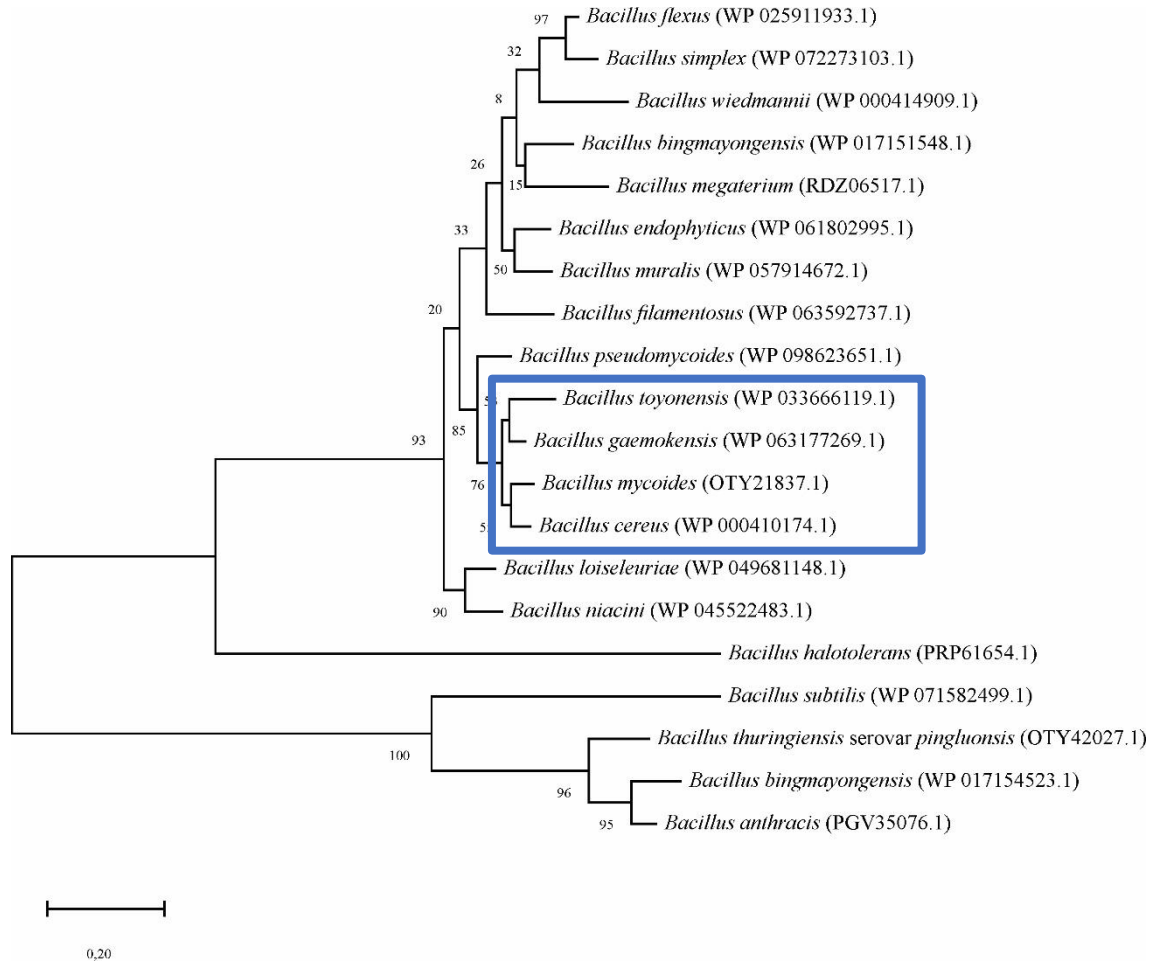
**Figura 5: Organização das sequências de inserção presente no plasmídeo pBt52. (A) Sequência de inserção pertencente à família IS6, encontrada no plasmídeo pBt52.** Presença de duplicação diretas do sítio alvo gerados na inserção do elemento. IR são sequências repetidas invertidas encontradas nas extremidades da IS. Seta azul: gene relacionado a transposase da família IS6. **(B) Sequência de inserção da família IS200/IS605, encontrada em plasmídeo pBt52.** LE é a extremidade da esquerda e RE é a extremidade da direita em que ambas carregam uma região subterminal que forma um *hairpin* para o processo de transposição. TnpA e TnpB são duas ORFs. **(C) Organização da sequência que codifica uma transposase\_31 truncada.** Essa transposase apresenta uma região N-terminal conservada com o domínio PD-(D/E)XK e uma região C-terminal variável.

As ISs relatadas acima não foram encontradas no cromossomo de *B. toyonensis* BAC 3151. Porém, são encontradas nos genomas de outras cepas de *B. toyonensis*. A presença de

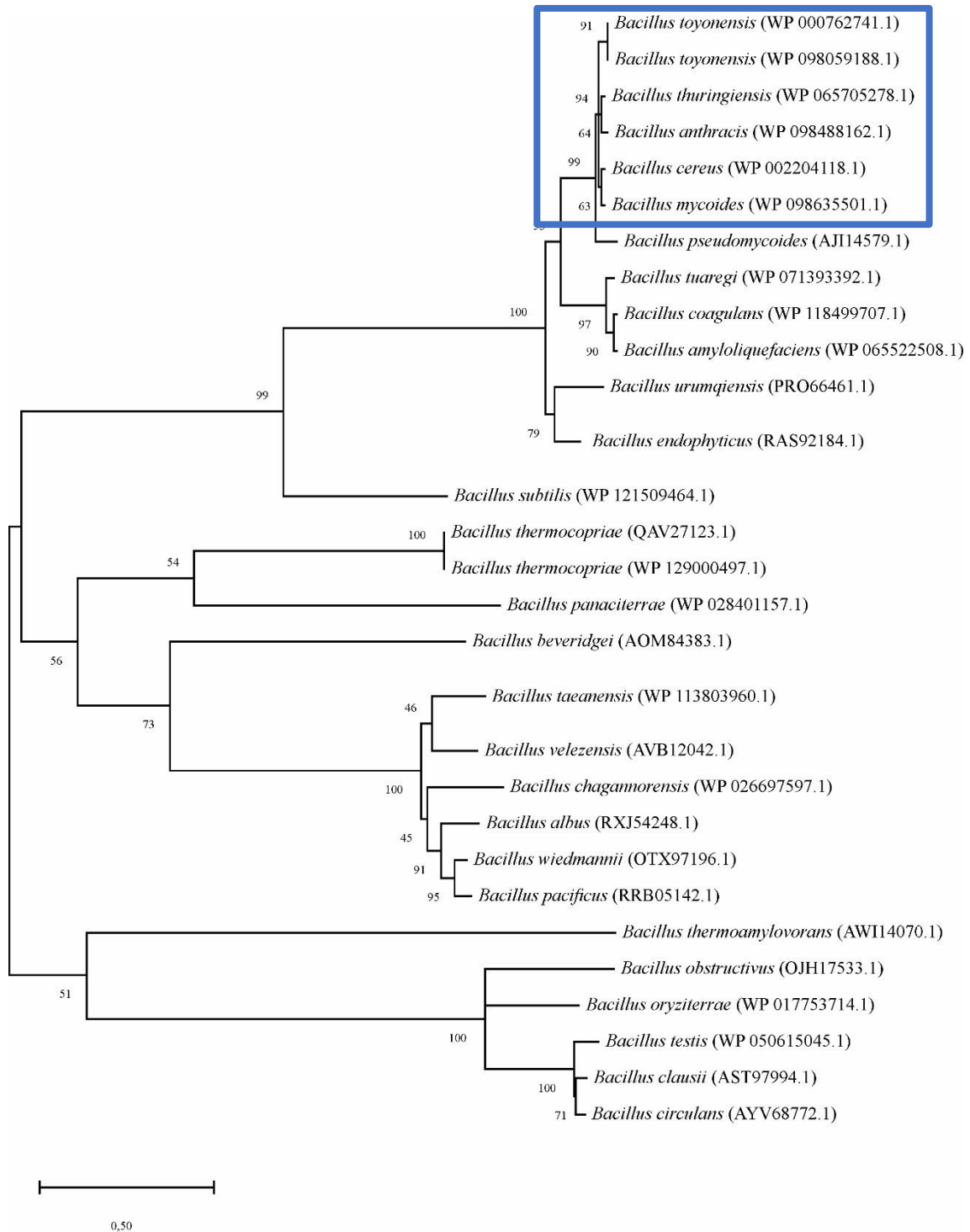
diferentes famílias de ISs está relacionada com as mudanças genômicas que ocorrem por influência do estilo de vida do hospedeiro. As ISs causam efeito de modelagem e rearranjo no genoma bacteriano, pois podem se inserir *upstream* de um gene e ativar ou inibir a sua expressão gênica. Além disso, as ISs podem sofrer expansão maciça e perda acompanhada de inativação e decaimento do gene, ocasionando numa redução do genoma. Isso ocorre preferencialmente em micro-organismos dependente do hospedeiro ou em micro-organismos que fazem a transição da vida livre para a dependência do ambiente nutricionalmente rico do hospedeiro, como o caso de alguns micro-organismos endofíticos (SINGUER et al., 2014).

### **Análise Filogenética**

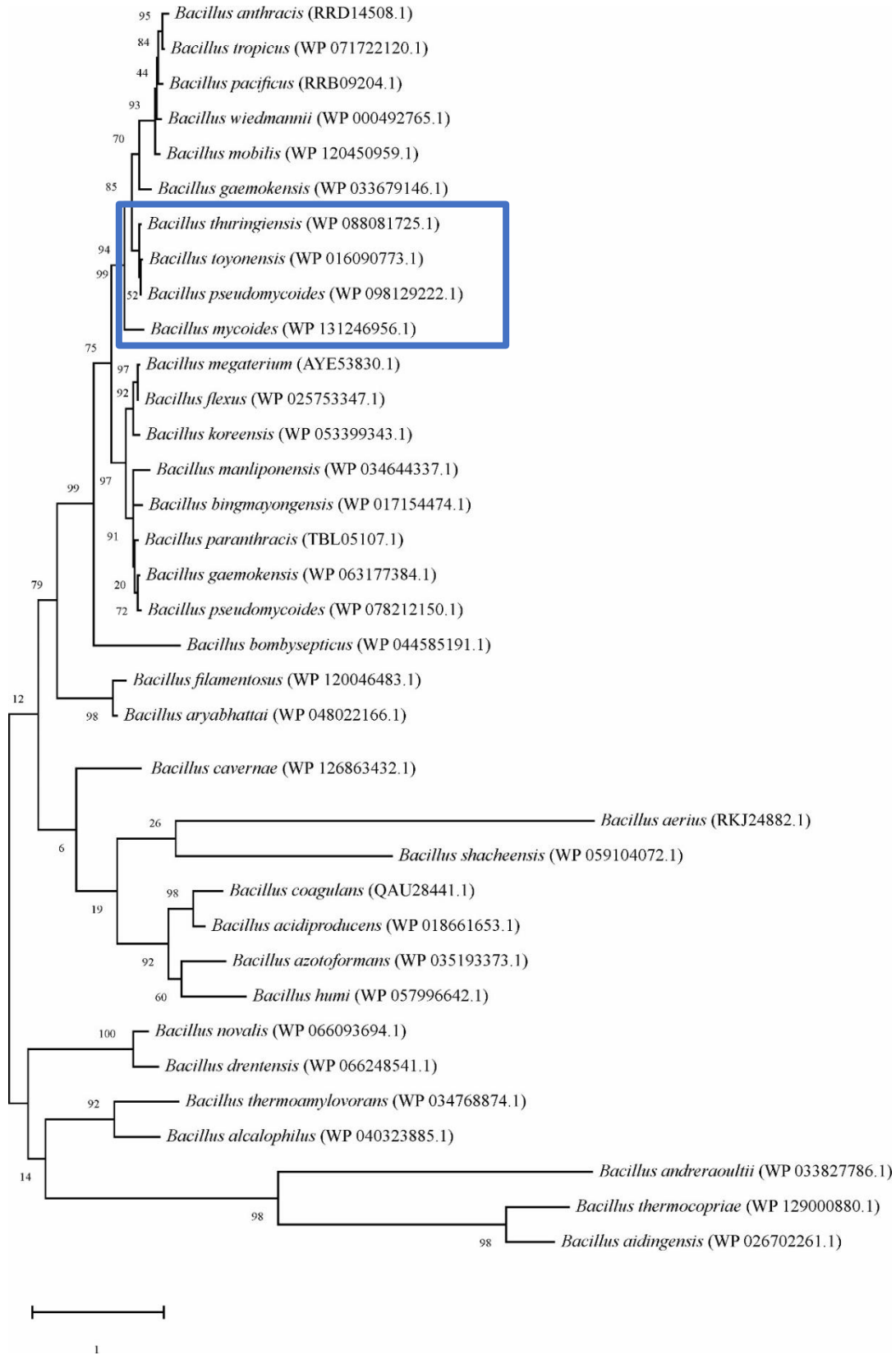
Todas as transposases, proteína RepB e a Columbicina A foram analisadas filogeneticamente com base nas sequências de aminoácidos. As relações filogeneticamente mostraram que todas as análises foram agrupadas em quase todos os casos próximas de espécies de *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus cereus*. Esse resultado é interessante, pois anteriormente o *Bacillus toyonensis*, era identificado como uma dessas duas espécies, ou seja, essas espécies podem compartilhar genes e possuir um ancestral comum (Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9 e Fig. 10). Além disso, estudos demonstraram que dentro do gênero de *Bacillus* existem espécies que são intimamente relacionados, como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. mycoides*. Devido a seus habitats, patogenicidade para mamíferos ou insetos, e suas características morfológicas e fisiológicas e também devido a sintenia entre seus cromossomos e outras semelhanças genômicas foi realizada a classificação dessas espécies em um único táxon (JIMÉNEZ et al., 2013).



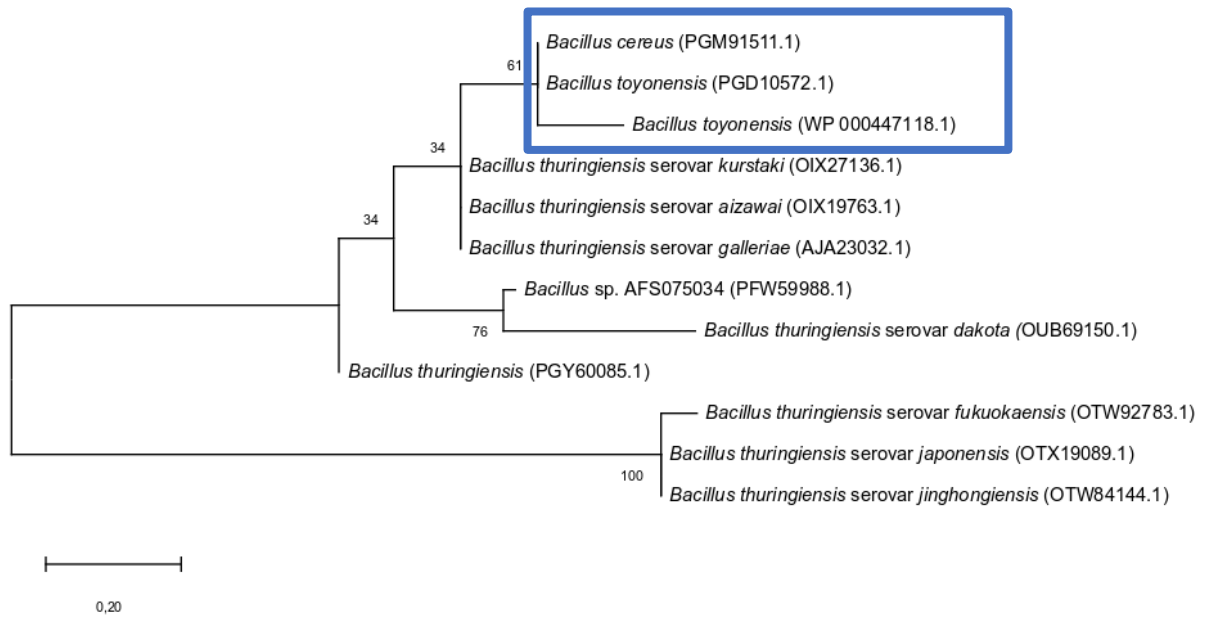
**Figura 6:** Análise filogenética da transposase codificada em uma sequência IS pertencente à família IS6 presente no plasmídeo pBt52 e transposases de ISs da família IS6 de outras espécies de *Bacillus*. A árvore filogenética foi construída segundo o método de Máxima Verossimilhança, o modelo de JTT, uma distribuição gama discreta e utilizado o valor de bootstrap 1000. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X.



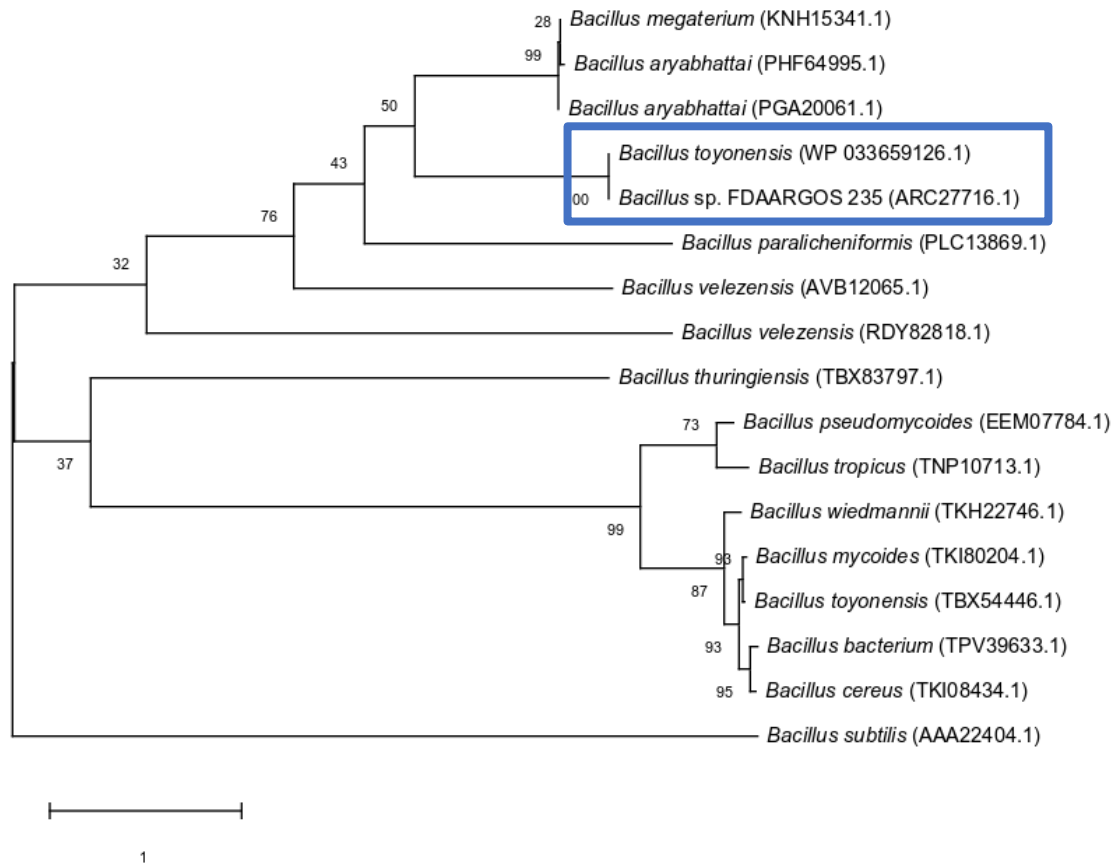
**Figura 7:** Análise filogenética da proteína transposase codificada por Sequências de inserção da família IS200/IS605 presente no plasmídeo pBt52 e transposases codificadas por ISs da família IS200/IS605 de outras espécies de *Bacillus*. A árvore foi construída segundo o método de Máxima Verossimilhança, o modelo de JTT, uma distribuição gama discreta e utilizando o valor de bootstrap de 1000. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X.



**Figura 8:** Análise filogenética da proteína transposase\_31 codificada por ISs presente no plasmídeo pBt52 e transposases\_31 codificada de outras espécies de *Bacillus*. A árvore foi construída segundo o método de Máxima Verossimilhança, o modelo de JTT, uma distribuição gama discreta e utilizando o valor de bootstrap de 1000. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X.



**Figura 9:** Análise filogenética da bacteriocina Columbicina A presente no plasmídeo pBt52 e Columbicina A de outras espécies de *Bacillus*. A árvore foi construída segundo o método de Máxima Verossimilhança, o modelo de JTT, uma distribuição gama discreta e utilizando o valor de bootstrap de 1000. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X.

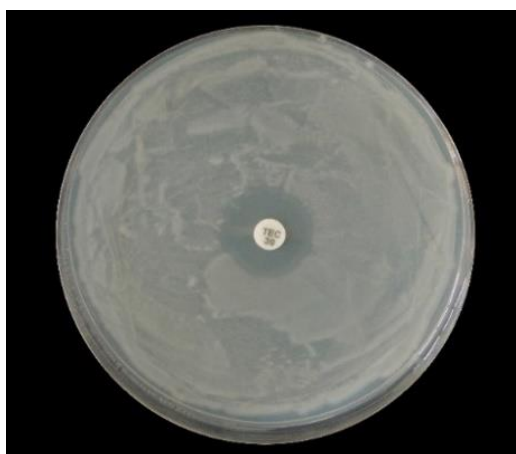


**Figura 10:** Análise filogenética da proteína RepB presente no plasmídeo pBt52 e proteína RepB de outras espécies de *Bacillus*. A árvore foi construída segundo o método de Máxima Verossimilhança, o modelo de JTT, uma distribuição gama discreta e utilizando o valor de bootstrap de 1000. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X.

### Gene de resistência

O plasmídeo pBt52 apresenta uma ORF 40 que codifica uma proteína putativa da família VanZ que confere resistência a antibiótico glicopeptídico. A função da proteína VanZ é desconhecida, mas pode estar relacionada com a resistência à teicoplanina (ALEKSHUN et al., 2007; ARTHUR et al., 1995). Teicoplanina é um antibiótico de alto peso molecular, seu espectro de ação é muito semelhante ao antibiótico vancomicina, tem ação em bactérias gram-positivas. O antibiótico teicoplanina inibe a síntese da parede celular bacteriana, impedindo a ligação dos constituintes do peptidoglicano, principalmente em sequências terminais de D-Alanina-D-Alanina dos peptídeos. A teicoplanina é produzida a partir do Actinomiceto *Actinoplhanes teichomyceticus*. A resistência a teicoplanina foi descrita em *Staphylococcus aureus* e por outras bactérias, onde envolve a incorporação de D-lactato na parede da célula em vez de D-alanina e esta modificação impede a ligação do glicopeptídeo (DIANE et al., 2017; DEREK et al., 2018).

Então para comprovar que a proteína VanZ confere resistência ao antibiótico teicoplanina, foi realizado um teste para determinar a resistência. *Bacillus toyonensis* BAC 3151 apresentou resistência ao antibiótico teicoplanina na concentração de 30 µg/mL, demonstrando que possivelmente a proteína VanZ é a responsável por essa resistência (Fig. 11) (STANDARDS et al., 2018). A realização de novos testes com a cepa curada do plasmídeo deverá confirmar se o gene encontrado no plasmídeo pBt52 codifica a proteína responsável pela resistência observada.



**Figura 11: Análise da resistência de *B. toyonensis* BAC 3151 ao antibiótico teicoplanina.** *Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi inoculado por *spread plate* em placas contendo meio TSA 10% e em seguida depositado sobre as bactérias um disco de papel de filtro com uma concentração de 30 µg/mL do antibiótico. Após 24 h, foi medido o halo de inibição de crescimento e comparado com os valores padrões. *B. toyonensis* apresentou um halo que se enquadra na faixa resistente (STANDARDS et al., 2018).

## Conclusão

Neste estudo, foi caracterizado um plasmídeo denominado pBt52 encontrado em *B. toyonensis* BAC3151. Este plasmídeo apresenta ORFs relacionadas a: bacteriocinas; transposases de sequências de inserção; a resistência a antibiótico; aos processos de conjugação e de partição. A importância dessas sequências para a colonização do feijoeiro e a competição com outras bactérias deverá ser determinada futuramente, por meio de mutagênese sítio-direcionada e cura do plasmídeo.

## REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H. et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 201–232, 2011.
- ALEKSHUN, M. N. et al. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–50, 2007.
- ARTHUR, M. et al. The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. **Gene**, v. 154, n. 1, p. 87–92, 1995.
- ASADUZZAMAN, S. M. et al. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 475–487, 2009.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Microbiol.**, 40: 2413-5, 1996.
- BISSON-FILHO, A. W. et al. FtsZ filament capping by MciZ, a developmental regulator of bacterial division. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. E2130–E2138, 2015.
- BIZANI, D.; et al. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 512–519, 2002.
- BLIN, K. et al. AntiSMASH 4.0 - improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W36–W41, 2017.
- BRADER, G. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, 2014.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 2013.

CHECINSKA, A. et al. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 351–369, 2015.

CHEN, G. L. et al. PRAP: An ab initio software package for automated genome-wide analysis of DNA repeats for prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2683–2689, 2013.

CLEWELL, D. B. Antibiotic Resistance Plasmids in Bacteria. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–6, 2006.

CONSORTIUM, T. U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 2018.

COSTA, L. E. DE O. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 43, n. 4, p. 1562–75, 2012.

DIEP, D. B. et al. Data mining and characterization of a navel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. **Microbiology**, v. 152, n. 6, p. 1649–1659, 2006.

DIANE, M. et al. **Doenças Infecciosas** (Quarta edição), 2017.

DEREK, G. et al. **Farmacologia Médica e Terapêutica** (Quinta edição), 2018.

FEDER, M. et al. Identification of a new family of putative PD-(D/E)XK nucleases with unusual phylogenomic distribution and a new type of the active site. **BMC Genomics**, v. 6, p. 1–13, 2005.

FINN, R. D. et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 222–230, 2014.

GILBERT, C. et al. Horizontal transfer and evolution of prokaryote transposable elements in eukaryotes. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, n. 5, p. 822–832, 2013.

HAFT, D. H. TIGRFAMs: a protein family resource for the functional identification of proteins.

**Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 41–43, 2002.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HE, S. et al. The IS 200 / IS 605 Family and “ Peel and Paste ” Single-strand Transposition Mechanism. p. 1–21, 2015.

INDIRAGANDHI, P. et al. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1037–1045, 2008.

JENSEN, R. B. et al. Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: Replicon pairing by parC of plasmid R1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 8550–8555, 2002.

JIANG, S. et al. Novel actin filaments from *Bacillus thuringiensis* form nanotubules for plasmid DNA segregation . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. E1200–E1205, 2016.

JIMÉNEZ, G. et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T , the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. **Genome Announcements ASM**, v. 1, n. 6, p. e01080-13, 2013a.

JIMÉNEZ, G. et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383–391, 2013b.

KHAN, S. A. Rolling-Circle Replication of Bacterial Plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 442–455, 1997.

KHAN, S. A. Plasmid rolling-circle replication: Recent developments. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 477–484, 2000.

KLAENHAMMER, T. R. The passage of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone from serum into cerebrospinal fluid and LH negative feedback in castrated rhesus monkeys. **Journal of**

**Endocrinology**, v. 104, n. 3, p. 325–330, 1985.

KINGSTON, A. W. et al. Rpn (YhgA-Like) Proteins of *Escherichia coli* K-12 and Their Contribution to RecA-Independent Horizontal Transfer. **Journal of Bacteriology**. 2017.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LETUNIC, I. et al. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D493–D496, 2018.

LI, X. et al. OriTfinder: A web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W229–W234, 2018.

LI, Y. et al. Distribution of Megaplasmid in *Lactobacillus salivarius* and Other Lactobacilli. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 17, 2007.

LOPES, R. et al. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 0, 2017.

LUO, H. et al. DoriC 10.0: an updated database of replication origins in prokaryotic genomes including chromosomes and plasmids. **Nucleic Acids Research**, v. 47. 2019

MACHÓN, C. et al. Plasmid Rolling-Circle Replication. p. 1–23, 2015.

MAHILLON, J. et al. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, p. 725–74., 1998.

MAKART, L. et al. A novel T4SS-mediated DNA transfer used by pXO16, a conjugative plasmid from *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1550–1561, 2018.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D222-6, 2015.

MECSAS, J. et al. Bacterial Secretion Systems – An overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p. 1–32, 2016.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.

NORMA M. et al. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. **Canadian Journal of Microbiology**, 2013.

OGAKI, M. B. et al. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

PACHECO-CANO, R. D. et al. Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthicin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. tolworthi. **Microbiological research**, v. 169, n. 12, p. 948–953, 2014.

PARADA, J. L. et al. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521–542, 2007.

PARK, Y. et al. OUP accepted manuscript. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. April, p. 636–641, 2019.

PRUITT, K. D. et al. NCBI reference sequences (RefSeq): A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 61–65, 2007.

ROMBEL, I. T. et al. ORF-FINDER: A vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, n. 1–2, p. 33–41, 2002.

SAHL, H. G; et al. Biosynthesis and Biological Activities of Lantibiotics with Unique Post-Translational Modifications. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 3, p. 827–853, 1995.

SHARP, M. D. et al. An in vivo membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14553–8, 1999.

SIGUIER, P. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D32–D36, 2006.

SIGUIER, P. et al. Bacterial insertion sequences: Their genomic impact and diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 865–891, 2014.

SILVEIRA, B. D. M. et al. Protease Em Uma Biblioteca Metagenômica Do Consórcio Degradador De Óleo Diesel Identification of Orf Encoding Protease From Metagenomics Library Consortium Degrading of. **Ciência e Tecnologia**, v. 7, 2015.

STANDARDS, P. et al. **Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02, M07, and M11**. 2018.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845–857, 2005.

TATUSOV, R. L. et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 33–6, 2000.

VAN DEN ENT, F. et al. F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. **EMBO Journal**, v. 21, n. 24, p. 6935–6943, 2002.

VAN HEEL, A. J. et al. BAGEL4: A user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W278–W281, 2018.

## Capítulo 2: Potencial da bactéria endofítica *Bacillus toyonensis* BAC 3151 para controle de fitopatógenos e promoção de crescimento em feijoeiro comum

### RESUMO

As lavouras de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil são afetadas por doenças fúngicas como a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a murcha-de-fusário, (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). O controle biológico é uma promessa para o manejo sustentável e ambientalmente correto de doenças. Como microorganismos endofíticos podem beneficiar as plantas que eles colonizam, foi analisado o potencial da bactéria endofítica *Bacillus toyonensis* BAC 3151 para o controle de fitopatógenos (*C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *S. sclerotiorum*) e promoção de crescimento vegetal. O *B. toyonensis* BAC3151 reduziu 95,2 %, 24,2 % e 8,2 % do crescimento micelial *in vivo* de

*S. sclerotiorum*, *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, respectivamente. Além disso, 87,5 % da severidade da doença mofo-branco foi reduzida *in vivo*. *Bacillus toyonensis* BAC 3151 também mostrou relevantes características de promoção de crescimento, incluindo a fixação de nitrogênio, a produção de compostos orgânicos voláteis, a produção de quitinase, protease e amilase, bem como aumento expressivo de 31,5 % do comprimento e de 33,6 % da massa seca das raízes do feijoeiro comum. Esses resultados demonstram que o *B. toyonensis* BAC 3151 tem potencial para ser usado como agente de biocontrole e promotor de crescimento em feijoeiro comum.

Palavras-chave: Bactéria endofítica, promoção de crescimento vegetal e controle biológico

### Introdução

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), é uma planta originária do continente americano e tem dois centros principais de domesticação: o mesoamericano e o andino. Pertencente à família Fabaceae e inclui cerca de 600 gêneros e 13 mil espécies (SCHOONHOVEN E VOYSEST, 1991). O gênero *Phaseolus* contém 150 a 200 espécies de plantas, muitas das quais são cultivadas como alimentos ou até mesmo como plantas ornamentais. A espécie *P. vulgaris* é a mais importante do gênero *Phaseolus* e apresenta uma ampla variabilidade tanto em termos de formas silvestres quando cultivadas (GAITÁN-SOLÍS et al., 2002).

O feijão representa 1% da produção mundial de grãos, que foi no ano de 2018 de 18,9 milhões de toneladas (FAO, 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, quando se trata de feijão de um modo geral, perdendo apenas para a Índia e Myanmar (FAOSTAT, 2018).

Já em relação ao feijoeiro-comum (*P. vulgaris*), o Brasil é o maior produtor e consumidor, com uma produção de 3,2 milhões de toneladas ao ano e uma produtividade em torno de 1500 kg/ha (FAOSTAT, 2018). O feijão é uma leguminosa de grão importante para o consumo humano em todo o mundo, devido ao alto teor de proteínas, fibras, carboidratos complexos, vitaminas do complexo B, minerais e baixo teor de lipídeos e sódio, sendo considerado um alimento essencial na dieta (BROUGHTON et al., 2003). O cultivo do feijoeiro é uma atividade agrícola de grande importância econômica, social e nutricional, e está sujeita a grandes riscos, entre os quais estão as doenças e pragas, que são responsáveis pelas perdas das lavouras. Algumas doenças incluem a antracnose, causada por *Colletotricum lindemuthianum*, a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e o mofo-branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (SARTORATO et al., 1994).

Na busca de elevação dos níveis atuais de produtividade e redução dos custos de produção tem crescido o interesse em pesquisas que explorem o potencial tecnológico de micro-organismos que possam integrar o manejo da cultura e ainda trazer benefícios a cultura e ao meio ambiente, com nenhum ou baixo impacto ambiental, promoção de crescimento vegetal, controle de micro-organismos patogênicos e nematoides, além de segurança no manuseio e integração destes micro-organismos na cultura do feijão (WANG et al., 2010). Por causa disso, os micro-organismos endofíticos tem sido estudados visando à integração destes ao manejo de culturas de importância econômica, como agentes de biocontrole de segunda geração por apresentarem múltiplos papéis (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018).

Micro-organismos endofíticos são todos aqueles capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, tecidos vegetais internos, sem causar danos aparentes às plantas hospedeiras e sem formar estruturas externas visíveis (HALLMANN et al., 1997). Espécies vegetais agrícolas, como por exemplo o feijoeiro, são colonizados por bactérias e fungos endofíticos (COSTA et al., 2012; GONZAGA et al., 2015).

A co-evolução a longo prazo de plantas e micro-organismos endofíticos sucedeu em um ecossistema particular, onde os micro-organismos se adaptaram para sobreviver em um ambiente rico em compostos biologicamente ativos recebendo nutrientes e proteção da planta hospedeira. Além disso, estes ajudam as plantas hospedeiras a se adaptarem e sobreviverem em condições de estresse biótico e abiótico, como, por exemplo, conferindo tolerância as infecções, as elevadas temperaturas, a salinidade, aos contaminantes (metais pesados) e até resistências às pragas e doenças, por meio da produção de metabólitos secundários, enzimas e antibióticos, competição pelo espaço e nutrientes e/ou pela modulação de resposta de resistência das plantas (HARDOIM et al., 2015; INDIRAGANDHI et al., 2008; RYAN et al., 2008; SANTOYO et al.,

2016; WANG et al., 2000; YAISH et al., 2015).

Os micro-organismos endofíticos podem acelerar o desenvolvimento de plântulas, promover o crescimento das plantas, produzindo uma série de metabólitos que facilitam a absorção primária e secundária de nutrientes, por meio da fixação de nitrogênio atmosférico, formação de sideróforos e a solubilização de minerais na rizosfera (GOTHWAL et al., 2008; IQBAL et al., 2010; KANG et al., 2009; WANG et al., 1993). Os micro-organismos endofíticos também podem fornecer às raízes, hormônios como auxina, citocinina e giberelina (BHORE et al., 2010; KANG et al., 2009). Muitos micro-organismos endofíticos possuem a capacidade de degradação de xenobióticos. Além disso, alguns micro-organismos endofíticos têm resistência a metais pesados/antimicrobianos e degradam orgânicos provavelmente decorrente da sua exposição a diversos compostos no nicho da planta/solo (RYAN et al., 2008). Diante desse rico arsenal de metabólitos envolvidos na defesa, bem como na interação com a planta, alguns compostos podem também desempenhar um papel de processos de sinalização, *quorum sensing*, intraespécies e interespecíes (BRADER et al., 2014).

*Bacillus* é o gênero mais abundante na rizosfera e a atividade de promoção de crescimento das plantas por algumas cepas já é conhecida, resultando no conhecimento dos mecanismos envolvidos. Os mecanismos podem ser diretos ou indiretos. Entre os mecanismos diretos estão a síntese de hormônios, compostos orgânicos voláteis, que regulam o metabolismo de fito-hormônios, suprimento de nutrientes por meio de processos como a solubilização de nutrientes (biofertilização) e inibição de senescência (HASSAN, 2017; YOUSAF et al., 2017; ZHAO et al., 2011). Entre os mecanismos indiretos estão a indução de resistência sistêmica e inibição de patógenos; bactérias do gênero *Bacillus* também podem regular a expressão de genes responsivos da planta ao estresse abiótico (RATH et al., 2018; TAHIR et al., 2017).

*Bacillus toyonensis* é uma bactéria anaeróbica facultativa, em forma de bastonete, gram-positiva e formadora de esporos em diferentes condições ambientais e nutricionais (CHECINSKA et al., 2015). Inicialmente as cepas de *B. toyonensis* foram classificadas como *B. cereus*, após a análise das sequências dos genomas e o emprego da taxonomia polifásica foi constatado que se tratava de uma nova espécie que foi nomeada *B. toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013). Costa et al. (2012) isolaram a cepa *B. toyonensis* BAC 3151 endofítica do feijoeiro, que foi identificada inicialmente como *Bacillus thuringiensis*. Posteriormente, o genoma desta cepa foi sequenciado e apresentou 99,49% de identidade com o genoma de *B. toyonensis* descrito por Jiménez et al. (2013), o que levou a classificação da cepa BAC 3151 como *B. toyonensis*. A cepa BAC 3151 apresenta um repertório genético para antimicrobianos, como agrupamentos gênicos relacionados a bacteriocinas, genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese

de peptídeo não ribossômicos, N-acil homoserina lactanase e quitinases maior quando comparada com outras cepas de *Bacillus* (LOPES et al., 2017).

Neste estudo, foi avaliado o potencial de *B. toyonensis* BAC 3151, endofítico do feijoeiro, no controle de doenças fúngicas do feijoeiro e também foram avaliados os mecanismos diretos e indiretos que contribuem para a promoção de crescimento do feijoeiro comum.

## **Material e Métodos**

### **Micro-organismos e condições de crescimento**

A cepa *B. toyonensis* BAC 3151 faz parte da coleção de bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum do Laboratório de Genética Molecular de Fungos/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A bactéria foi cultivada em meio ágar-triptona-soja (TSA) 10% (1,5 g/L de triptona, 0,5 g/L de peptona de soja e 1,5 g/L de NaCl, pH 7,3) a 28 °C, com agitação de 150 rpm por 24 h (LOPES et al., 2017).

O fungo *C. lindemuthinum* foi cultivado em meio dextrose-batata-ágar (BDA) e incubado em BOD durante 10 dias a 22 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Posteriormente discos de micélio do fungo *C. lindemuthianum* foram transferidos para vagens de feijão esterilizados e incubados nas mesmas condições, para que o fungo esporulasse. O fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi cultivado em meio BDA e incubado em BOD durante 14 dias a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h. O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado em meio BDA e incubado em BOD durante 7 dias a 24 °C, sob fotoperíodo de 12 h.

### **Ensaio para a caracterização do potencial antifúngico**

#### **Análise *in vitro***

Uma alíquota de 100 µL com uma densidade óptica (D. O) de 0,5 de uma cultura de *B. toyonensis* BAC 3151 foi espalhada sobre discos de papel celofane depositados em placas de Petri com meio BDA e as placas foram incubadas a 28 °C por 48 h. Após esse período, o papel celofane foi retirado e então foi depositado no centro da placa de Petri um disco de 2 mm de micélio fúngico. Posteriormente as placas foram incubadas em BOD nas condições apropriadas para cada fungo. Como controle foi realizado a inoculação de um disco de micélio fúngico em placa com meio BDA, sem a inoculação prévia da bactéria. O diâmetro da colônia fúngica foi medido após sete dias de crescimento para examinar a atividade de antagonismo do *B. toyonensis* BAC 3151.

A porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada pela seguinte fórmula:

$$IC = [(C-T) / (C)] \times 100\%$$

Onde  $C$  é o diâmetro da colônia do fungo no controle (sem inoculação prévia da bactéria) e  $T$  é o diâmetro do crescimento micelial do tratamento (inoculação prévia da bactéria).

Os valores foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Três repetições foram feitas para os três fitopatógenos.

### **Análise *in vivo***

Sementes de feijão (*P. vulgaris* L.) das cultivares Pérola, Manteigão Fosco 11 e BRS Estilo foram fornecidas pelo Professor José Eustáquio de Souza Carneiro do Departamento de Fitotecnia da UFV. As sementes das cultivares Manteigão Fosco 11 (resistente a murcha-de-fusário) e BRS Estilo (suscetível a murcha-de-fusário) foram utilizadas na análise de supressão da doença murcha-de-fusário, enquanto sementes do cultivar Pérola (resistente a murcha-de-fusário) foram utilizadas para análise da supressão das doenças mofo-branco e antracnose (YOKOYAMA et al., 1999; PEREIRA et al., 2011; MELO et al., 2010).

As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de 2,5 % de hipoclorito de sódio por 5 min e subsequentemente lavadas três vezes com água destilada estéril por agitação (5 min cada). As sementes desinfestadas foram colocadas em um disco de papel filtro, umedecido com água destilada em uma placa de Petri selada e germinadas no escuro a 25 °C. Após 96 horas, foram selecionadas as sementes que germinaram uniformemente.

As sementes foram colocadas por 10 min em tubos contendo 1 mL de cultura bacteriana de *B. toyonensis* BAC 3151 crescida em meio TSA 10% e o controle foi constituído de sementes colocadas em tubos contendo 1 mL de água destilada estéril por 20 min. Estas sementes foram semeadas em vasos de 500 mL contendo substrato para hortaliças Topstrato® não esterilizado. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições e parcela de um vaso com uma planta. Após o desenvolvimento das sementes, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, sob irrigação por 10 dias (BOTTA et al., 2013).

### **Avaliação da supressão da antracnose**

O fungo *C. lindemuthianum* foi cultivado em vagens de feijão por 10 dias. Nos tubos contendo as vagens com fungo foram adicionados 3 mL de água destilada para preparar a suspensão de esporos. Com auxílio da câmara de Neubauer foi realizada a contagem dos conídios e preparada uma suspensão com concentração de  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>. Para a inoculação do fungo nas plantas utilizou-se a metodologia de aspersão de suspensão aquosa de conídios. Plantas da cultivar Pérola com 10 dias de idade receberam a suspensão de esporos na

parte aérea. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 12 h em câmara de inoculação na ausência de luz (escuro) e em seguida distribuídas totalmente ao acaso (DIC) em bancadas em casa de vegetação.

Foram definidos dois tratamentos, o tratamento um foi constituído de plantas previamente tratadas apenas com *B. toyonensis* BAC 3151 como descrito anteriormente e o tratamento dois foi constituído de plantas tratadas com *B. toyonensis* BAC3151 e com a suspensão de conídios. Os controles do experimento foram plantas tratadas com água (negativo) e plantas apenas inoculadas com suspensão de conídios (positivo).

A severidade da doença foi avaliada 5 dias após da inoculação do patógeno, em duas folhas por planta, pela quantificação da área foliar lesionado por meio do programa Quant V.1.0 (VALE et al., 2001). A severidade da doença foi expressa em percentagem de área lesionada. A proteção foi calculada como redução da severidade da doença e expressa como percentagem em relação ao controle (MORAES et al., 1976).

Os valores foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade de erro.

#### **Avaliação da supressão da murcha-de-fusário**

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP) foi cultivado em meio BDA e incubado em BOD durante 14 dias a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h. Foi preparada uma suspensão de conídios a uma concentração de  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>, incluindo macro e microconídios (PASTOR-CORRALES E ABAWI, 1987).

Para a inoculação do fungo nas plantas utilizou-se a metodologia de imersão de raízes em suspensão de conídios. As plantas no estágio V2 (folha primária completamente expandida) foram retiradas dos vasos, suas raízes foram lavadas e 1/3 do comprimento das raízes foi cortado. Imediatamente após o corte, as raízes foram imersas na suspensão de macro e microconídios durante 5 min. Após este procedimento, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 500 mL de substrato Topstrato® e mantidas em casa de vegetação, sob irrigação (PASTOR-CORRALES E ABAWI, 1987).

Foram definidos dois tratamentos, no tratamento um as plantas foram previamente tratadas apenas com *B. toyonensis* BAC 3151 como descrito anteriormente e no tratamento dois, as plantas foram tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 e inoculadas com FOP. Os controles do experimento foram plantas tratadas com água (negativo) e plantas apenas inoculadas com FOP (positivo), distribuídas totalmente ao acaso (DIC) em bancadas em casa de vegetação.

A avaliação da reação das plantas à murcha-de-fusário foi realizada utilizando a escala de notas da severidade da doença (PASTOR-CORRALES E ABAWI, 1987), que se baseia,

principalmente, na intensidade de murcha da parte aérea. Por esta escala, 1= nenhum sintoma visível; 3= de 1 % a 10 % de folhas sintomáticas (folhas com murcha suave e clorose); 5= 11 % a 25 % de folhas sintomáticas (folhas com murcha moderada e clorose); 7= 26 % a 50 % de folhas sintomáticas (folhas com murcha severa e clorose) e 9 = planta morta ou severamente infectada. Para determinar a severidade da doença e a incidência da doença as avaliações foram realizadas 20 dias após a inoculação (DAI).

Com os dados dos sintomas foi calculado índice de doença (ID) pela seguinte fórmula: Índice de severidade da doença (%) =  $[\sum (\text{escore} \times \text{número de plantas com o mesmo escore}) / (\text{número máximo de escore da escala} \times \text{número total de plantas avaliadas}) \times 100$  (McKINNEY, 1923).

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi obtida segundo Shaner e Finney (1977), utilizando as três avaliações, conforme se segue:

$$\text{AACPD} = \sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \right) (T_{i+1} - T_i) \right]$$

$Y_i$  = severidade da murcha-de-fusário na  $i$ -ésima observação,

$T_i$  = tempo (dias após inoculação) na  $i$ -ésima observação e

$n$  = número total de avaliações.

Os valores foram submetidos a análise ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade de erro.

#### **Avaliação da supressão do mofo-branco**

Para inoculação do fungo nas plantas utilizou-se a metodologia da inoculação de disco de micélio (5 mm de diâmetro). Discos de micélio foram inoculados e pressionados suavemente nas folhas primárias de feijoeiros com 10 dias de idade, deixando o disco de micélio em contato com a veia principal da folha. As plantas inoculadas foram distribuídas ao acaso (DIC) e mantidas em uma câmara de crescimento durante 7 dias (FREIRE FAGUNDES-NACARATH et al., 2018).

Foram definidos dois tratamentos: no tratamento um as plantas foram previamente tratadas apenas com *B. toyonensis* BAC 3151, como descrito anteriormente, e discos de BDA sem micélio e o tratamento dois foi constituído de plantas tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 e com discos de micélio de *S. sclerotiorum*. Os controles do experimento foram plantas tratadas com água e com discos sem micélio (negativo) e plantas apenas tratadas com discos de micélio de *S. sclerotiorum* (positivo).

A avaliação da severidade do mofo-branco foi realizada utilizando escala de notas descrita por TOLÊDO-SOUZA e COSTA (2003), que se baseia, principalmente, na intensidade e comprimento da lesão. Por esta escala, 1 = nenhum sintoma visível; 2 = lesão circular começando a se desenvolver; 3 = lesão até 1,0 cm de comprimento; 4 = lesões entre 1,0 e 1,5 cm; 5 = lesões maiores que 1,5 cm; 6 = lesões no pedúnculo e presença de micélio e murcha em uma das folhas; 7 = lesões no pedúnculo e presença de micélio e murcha em ambas as folhas; 8 = sintomas de murcha geral e 9 = planta morta. Para determinar a severidade da doença e a incidência da doença as avaliações foram realizadas 7 dias após a inoculação (DAI).

Com os dados da severidade foi calculado o índice de doença (ID) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), como descrito anteriormente.

Os valores foram submetidos a análise ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

### **Medição de atividades de promoção de crescimento de plantas *in vitro***

Pelo menos três repetições foram realizadas para todas as atividades de promoção de crescimento de plantas, e as médias dos ensaios foram apresentadas neste estudo.

### **Fixação de nitrogênio**

Para avaliar se a bactéria *B. toyonensis* BAC 3151 tem capacidade de fixar nitrogênio, foi inoculada a cultura bacteriana no meio ágar manitol isento de nitrogênio. O meio ágar manitol contém, 15 g/L de manitol, 0,5 g/L de  $K_2HPO_4$ , 0,2 g/L de NaCl, 0,2 g/L de  $MgSO_4$ , 5,0 g/L de  $CaCO_3$ , 0,1 g/L de  $CaSO_4$  e 15 g/L de ágar. As placas foram incubadas a 28 °C por 4-5 dias. O desenvolvimento de colônias bacterianas foi considerado como resultado positivo para a fixação de nitrogênio (YOUSAF et al., 2017).

### **Solubilização de fosfato**

A capacidade de solubilizar fosfato foi avaliada por meio da inoculação da bactéria *B. toyonensis* no meio NBRIP. O meio NBRIP contém, 10 g/L de glicose, 5 g/L de  $Ca_3(PO_4)_2$ , 5 g/L de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,25 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g/L de KCl, 0,1  $(NH_4)_2SO_4$  e 15 g/L de ágar. A formação do halo em torno da colônia bacteriana foi considerado como resultado positivo para a solubilização de fosfato (NAUTIYAL, 1999).

### **Produção de sideróforos**

Para avaliar se a bactéria *B. toyonensis* BAC 3151 tem capacidade de produzir sideróforos foram inoculadas quatro microgotas, 10  $\mu$ L cada, da cultura bacteriana em pontos equidistantes no meio King B adicionado de ágar CAS (Chrome Azurol S). O meio King B contém, 20 g/L de protease peptona, 2,5 g/L de  $K_2HPO_4$ , 6 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 15 mL/L de

glicerol. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h. O aparecimento de um halo em torno das colônias bacterianas com uma mudança de cor de azul para amarelo foi considerado como resultado positivo para a produção de sideróforos (SCWYNAN E NEILANDS, 1987).

#### **Produção de ácido indol acético (AIA)**

A avaliação da capacidade da bactéria *B. toyonensis* BAC 3151 em produzir ácido indol acético foi feito por meio da transferência de uma colônia bacteriana para uma placa com meio TSA 10% suplementado com 5 mM de L-triptofano (precursor do AIA). Após a transferência da colônia bacteriana, o meio foi coberto com a membrana de nitrocelulose e as placas foram incubadas a 28 °C por 24 h. Em seguida, a membrana foi transferida para outra placa e a membrana foi embebida com a solução de Salkowski (50 mL de ácido perclórico 35% e 1 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M) e incubada em temperatura ambiente por 2 h. O resultado foi positivo quando a membrana apresentou a formação de um halo avermelhado (SMID E KOSUGE, 1978).

#### **Produção de protease**

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi inoculado em meio ágar leite desnatado. O meio ágar leite desnatado contém, 10 g/L de leite desnatado em pó e 15 g/L de ágar. As placas foram incubadas a 28 °C por 2-3 dias. A atividade da protease foi registrada pelo desenvolvimento de um halo em torno das colônias bacterianas, indicando que as proteínas do leite foram hidrolisadas pela bactéria (LOPER, 2008).

#### **Produção de quitinase**

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi inoculado em meio mínimo contendo 1% de quitina coloidal. Quando o meio foi vertido foi adicionado 10 mL do corante fluorescente *Calcofluor White* M2R, para facilitar a visualização do halo. As placas foram incubadas a 28 °C por 2-3 dias. A atividade da quitinase foi registrada pelo desenvolvimento de um halo em torno das colônias bacterianas, indicando que quitina foi degradada pela bactéria (SOARES, 2016).

#### **Produção de celulase**

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi inoculado em meio TSA 10% complementado com 10 g/L de celulose em pó. As placas foram incubadas a 28 °C por 8 dias. A atividade da celulase foi registrada pelo desenvolvimento de um halo em torno das colônias bacterianas, indicando que celulose foi hidrolisada pela bactéria (SAMANTA et al., 1989).

#### **Produção de amilase**

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi inoculado em meio ágar nutriente suplementado com 0,5% de amido solúvel. As placas foram incubadas a 28 °C por 2 dias. A solução de iodo (0,3 g/L de iodo e 0,6 g/L de KI) foi adicionado na superfície das placas de Petri, e o aparecimento

de um halo claro em torno da colônia indicou resultado positivo para a produção de amilase (SLAMA et al., 2019).

### **Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)**

Foram inoculadas quatro microgotas, 10 µL cada, da cultura bacteriana em pontos equidistantes no meio ágar nutriente suplementado com 4 g/L de glicina. Um disco de papel de filtro Whatmann foi embebido numa solução de reagente de HCN (1% de ácido pícrico em 10% NaCO<sub>3</sub>) e colocado na tampa da placa. As placas foram incubadas a 28 °C por 4-5 dias. Após a incubação, o desenvolvimento da cor amarelo para marrom-avermelhada foi tomado como um resultado positivo para a produção de HCN (LORCK, 1948).

### **Ensaio *in vitro* para avaliar o efeito de compostos orgânicos voláteis em plantas de feijão**

As sementes da cultivar Pérola foram inoculadas em placa de cultivo de tecido (quadrada 12 cm x 12 cm) estéril com meio Murashige e Skoog (MS) e na parte inferior da placa foi colocada uma placa de Petri redonda estéril sem a tampa com 15 mL de TSA 10%. Na placa contendo o meio TSA 10% foi inoculado *B. toyonensis* BAC 3151. As placas foram seladas com parafilme e incubadas em uma câmara a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por 3 dias. O controle foi realizado da mesma maneira, mas sem a inoculação da bactéria (FIERS et al., 2013; RATH et al., 2018). Um índice de vigor foi calculado da seguinte forma:

Índice de vigor = porcentagem de germinação x comprimento das plântulas (comprimento da parte aérea + raiz).

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

### **Avaliação da promoção de crescimento vegetal**

Os tratamentos consistiram de sementes de feijão imersas 20 min em: tubos contendo 1 mL de cultura bacteriana de *B. toyonensis* BAC 3151 crescida em meio TSA 10 % (T2); tubos contendo 1 mL de água destilada estéril (controle); tubos contendo 1 mL de cultura bacteriana de *B. toyonensis* BAC 3151 crescida em meio TSA 10 % morta por autoclavagem (T3). As sementes tratadas foram semeadas em vasos de 500 mL contendo substrato para hortaliças Topstrato® não esterilizado. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições e parcela de um vaso com uma planta. Ao final do experimento (45 dias após a semeadura) foram realizadas as seguintes avaliações: número de folhas por planta, considerando todas as folhas vivas e abertas; comprimento da raiz, foi medido com régua graduada da base do caule até o final da raiz; massa fresca e massa seca da parte

aérea e da raiz foram avaliadas utilizando a parte aérea da planta e a raiz, separadamente. Para isso o material vegetal foi cortado em pedaços menores e pesado em balança de precisão (Aaker Bel Engineering- min 0,01g, máx 500g) e, posteriormente, colocado em sacos de papel e levado para secagem na estufa à 65 °C, sendo pesado após atingir peso constante (5 dias)(BOTTA et al., 2013; SANTOS et al., 2014).

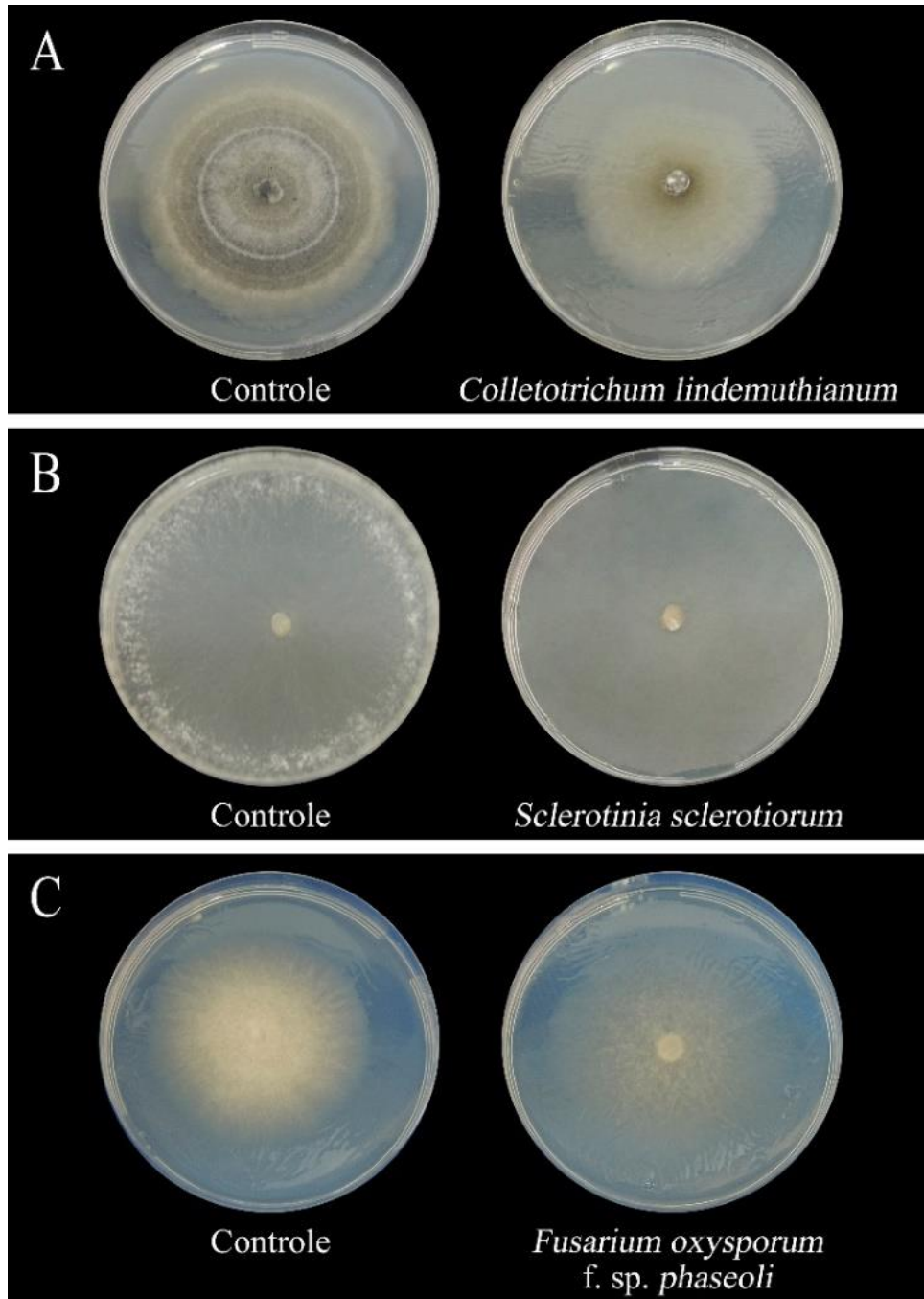
Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## **Resultados**

### **Ensaio para a caracterização do potencial antifúngico**

#### **Análise *in vitro***

Compostos produzidos por *B. toyonensis* BAC 3151 e secretados no meio de cultura foram capazes de inibir o crescimento de três patógenos do feijoeiro (Fig. 1 e Tab. 1).



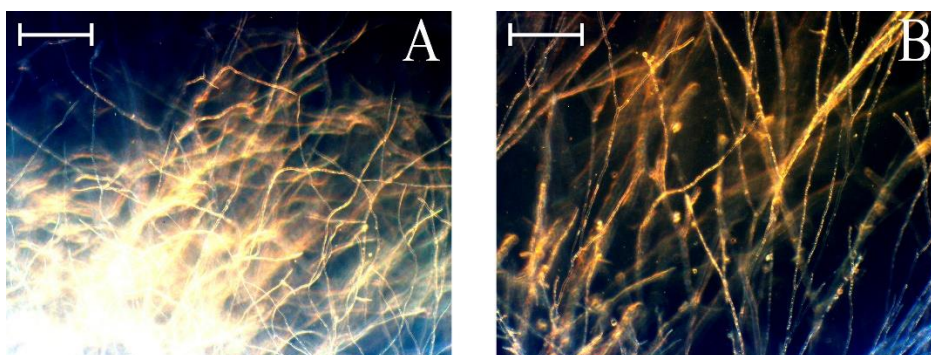
**Figura 1:** Teste de antagonismo entre *B. toyonensis* BAC 3151 e patógenos do feijoeiro. Os controles são placas com o meio de cultura BDA, onde foi inoculado o patógeno, sem a inoculação prévia da bactéria *B. toyonensis* BAC 3151. Os tratamentos são placas com BDA, onde foi inoculado o patógeno, com inoculação prévia da bactéria *B. toyonensis* BAC 3151 sobre papel celofane. Após o crescimento da bactéria, o papel celofane foi retirado e o patógeno foi inoculado. Patógenos testados: **(A)** *Colletotrichum lindemuthianum*, **(B)** *Sclerotinia sclerotiorum* e **(C)** *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

**Tabela 1:** Diâmetro das colônias fúngicas cultivadas na presença de compostos secretados por *B. toyonensis* BAC 3151.

Fungos patogênicos da planta	Diâmetro das colônias (mm) <sup>(1)</sup>		Redução do crescimento <sup>(2)</sup>
	Controle (mm)	Tratamento (mm)	
<i>C. lindemuthianum</i>	65,5 a	49,7±2,6 b	24,2 %
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	57,5 a	52,852,8±1,4 b	8,1 %
<i>S. sclerotiorum</i>	77,1 a	3,7±0,01 b	95,2 %

<sup>(1)</sup> Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (n=3). <sup>(2)</sup> Determinada em relação ao controle.

É possível observar na Figura 2 uma mudança morfológica das hifas do fungo *C. lindemuthianum*, em relação as hifas da colônia controle. Na colônia submetida ao tratamento são encontradas estruturas arredondadas nas pontas das hifas, mostrando que os compostos secretados no meio de cultura são capazes de modificar a morfologia das hifas do fungo.

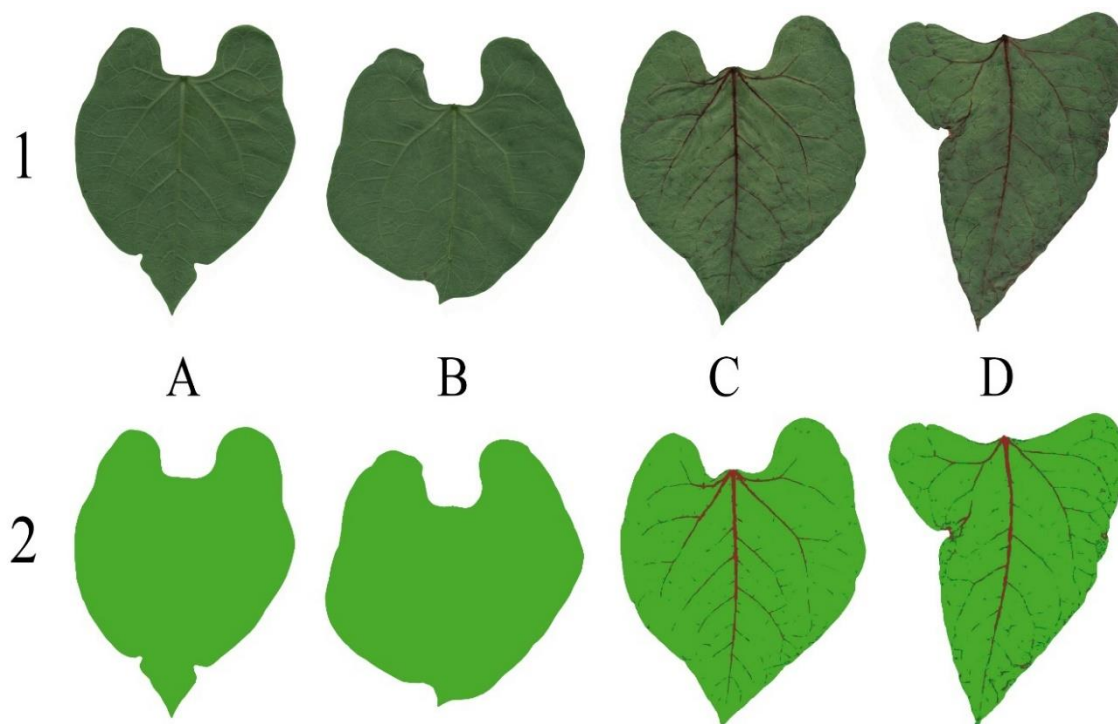


**Figura 2:** Hifas de *Colletotrichum lindemuthianum*. (A) Hifas de *C. lindemuthianum* desenvolvidas na placa controle; (B) Hifas de *C. lindemuthianum* desenvolvidas na placa com meio previamente tratado com *B. toyonensis* BAC 3151. As imagens foram registradas em microscópio óptico com objetiva 4x, barra: 15µm

### Análise *in vivo*

#### Avaliação da supressão da doença antracnose

No ensaio *in vivo*, os sintomas da doença ocorreram em todas as plantas inoculadas com o *C. lindemuthianum* após 5 dias, ou seja, a proporção de plantas com doença foi de 100 %. No entanto, ao analisar os sintomas presentes nas folhas usando o programa Quanti (VALE et al., 2001), foi observado que as plantas que foram previamente inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151 apresentaram diminuição da área lesionada em 39,3 %.



**Figura 3: Sintomas da antracnose em folhas de feijoeiro comum. (1)** Folhas destacadas do feijoeiro comum e **(2)** Folhas destacadas do feijoeiro comum analisadas pelo programa Quanti. **(A)** Controle negativo (água), **(B)** Folhas inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151; **(C)** Folhas previamente inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151 e posteriormente inoculadas com suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* e **(D)** Folhas inoculadas com suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* (Controle positivo). A área lesionada foi calculada pelo programa *Quanti* e dada a porcentagem em relação a área sadia.

**Tabela 2:** Severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*) em feijoeiro cultivado em substrato inoculado com *B. toyonensis* BAC 3151<sup>(1)</sup>.

Tratamentos <sup>(2)</sup>	Área foliar lesionado por planta	Redução da severidade <sup>(3)</sup>
<i>C. lindemuthianum</i>	7,1±0,5 % a	-
<i>C. lindemuthianum</i> + <i>B. toyonensis</i>	4,3±0,3 % b	39,3 %

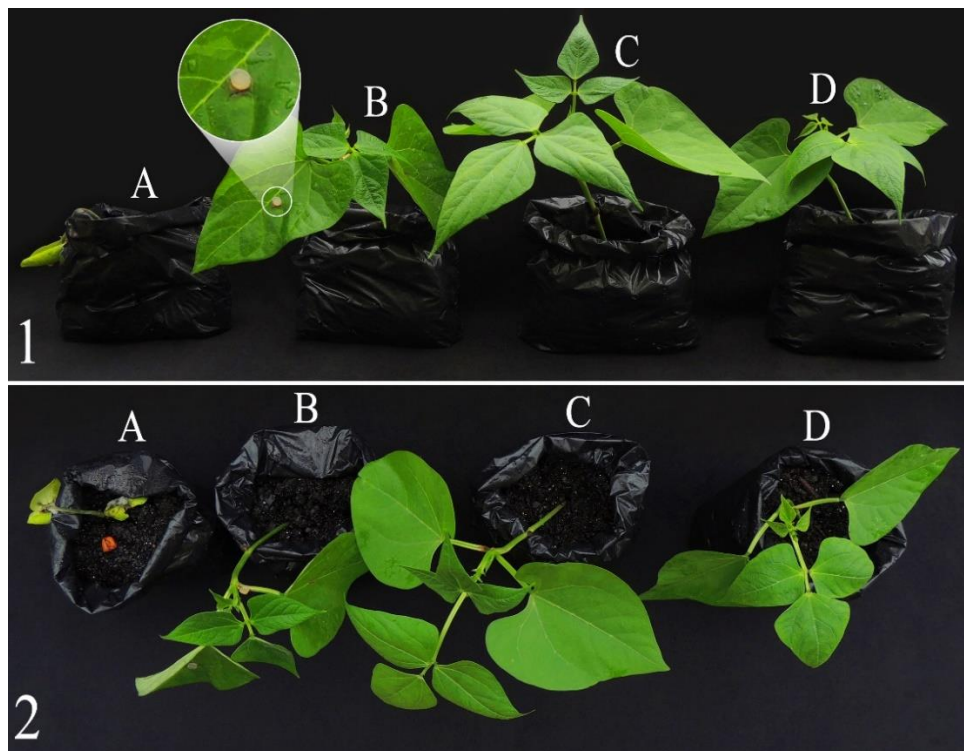
<sup>(1)</sup> Médias ± erro-padrão seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade (n=4). <sup>(2)</sup> Isolado de *B. toyonensis* BAC 3151 inoculado na semente do feijão, dez dias antes da inoculação de *C. lindemuthianum*. <sup>(3)</sup> Determinada em relação ao controle.

### Avaliação da supressão do mofo-branco

Nenhum sintoma de doença ocorreu nas folhas durante os dois primeiros dias após os tratamentos com *S. sclerotiorum*. No entanto, no terceiro dia após a inoculação ocorreu necrose nas folhas do feijoeiro e o crescimento micelial por toda a planta, enquanto estes sintomas não foram observados nas folhas das plantas previamente inoculada com *B. toyonensis* BAC 3151. Os sintomas do mofo-branco nas folhas do feijoeiro foram avaliados diariamente. A necrose

das folhas e o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* nas folhas tratadas apenas com fungo eram aparentes, e conseqüentemente levou a morte das plantas, enquanto as folhas das plantas inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151 não apresentaram qualquer crescimento micelial evidente, apenas uma pequena necrose em torno do disco (Fig. 4).

Um outro resultado presente na Figura 4C é um efeito estimulatório e a não fitotoxicidade de *B. toyonensis* BAC 3151 no feijoeiro quando comparado com as outras plantas.



**Figura 4: Sintomas de mofo-branco em folhas de feijoeiro inoculadas com disco de micélio de *S. sclerotiorum*.** (1) Foto tirada no sentido horizontal (de frente) (2) Foto tirada no sentido vertical (de cima). (A) Planta tratada apenas com *S. sclerotiorum* (Controle positivo); (B) Planta previamente tratada com *B. toyonensis* BAC 3151 e posteriormente tratada com disco de micélio de *S. sclerotiorum*; (C) Planta previamente tratada com *B. toyonensis* BAC 3151e (D) Planta tratada com água (Controle negativo). Círculo mostra o disco de micélio de *S. sclerotiorum* e a necrose da folha em volta do disco.

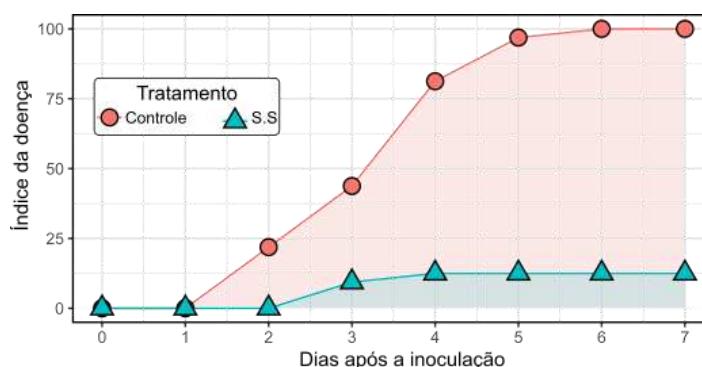
**Tabela 3:** Severidade de mofo-branco (*S. sclerotiorum*) em feijoeiro cultivado em substrato, oriundo de sementes tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Severidade da doença <sup>(1)</sup>
<i>S. sclerotiorum</i>	100 % ± 0,01 a
<i>S. sclerotiorum</i> + <i>B. toyonensis</i> BAC 3151	12,5 % ± 0,01 b

<sup>(1)</sup> Médias ± erro-padrão seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade (n=4).

Em relação a severidade da doença as plantas previamente inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151 apresentaram apenas 12,5 %, (Tab. 3) e na curva do progresso da doença (Fig. 5).

A curva de progresso do mofo-branco (Fig. 5), compara o progresso da doença no feijoeiro em plantas inoculada com disco de micélio de *S. sclerotiorum* (controle positivo) e plantas previamente tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 e posteriormente com o disco de micélio de *S. sclerotiorum*. A área abaixo da curva das plantas previamente inoculadas com com *B. toyonensis* BAC 3151 é menor quando comparada com o controle positivo, permitindo concluir que as plantas previamente tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 apresentaram resistência ao progresso da doença quando comparada com o controle positivo.



**Figura 5: Progresso da doença mofo-branco.** A linha em rosa representa o avanço da doença mofo-branco ao longo dos dias após o tratamento das folhas de feijoeiro com discos de micélio de *S. sclerotiorum*. A linha em azul representa o avanço do mofo-branco ao longo dos dias após a inoculação com disco de micélio de *S. sclerotiorum* em plantas de feijoeiro previamente tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151.

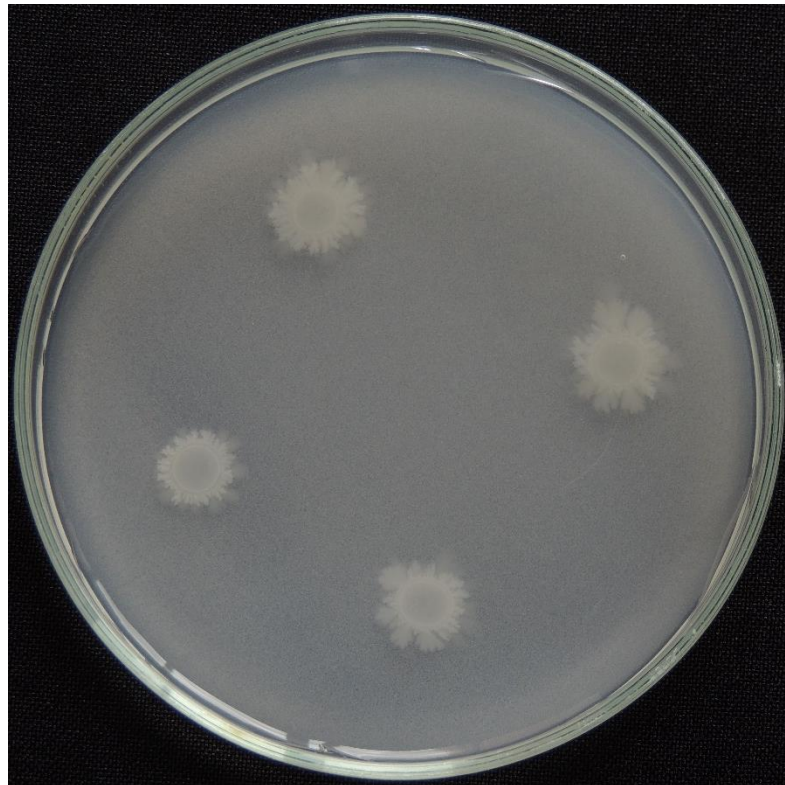
### Avaliação da supressão da doença murcha-do-fusário

No ensaio *in vivo* em plantas de feijoeiro da cultivar BRS Estilo, nenhum sintoma de doença ocorreu durante os sete primeiros dias após o tratamento. No entanto, as folhas começaram a amarelar no décimo dia de infecção com o patógeno. Os sintomas da doença nas

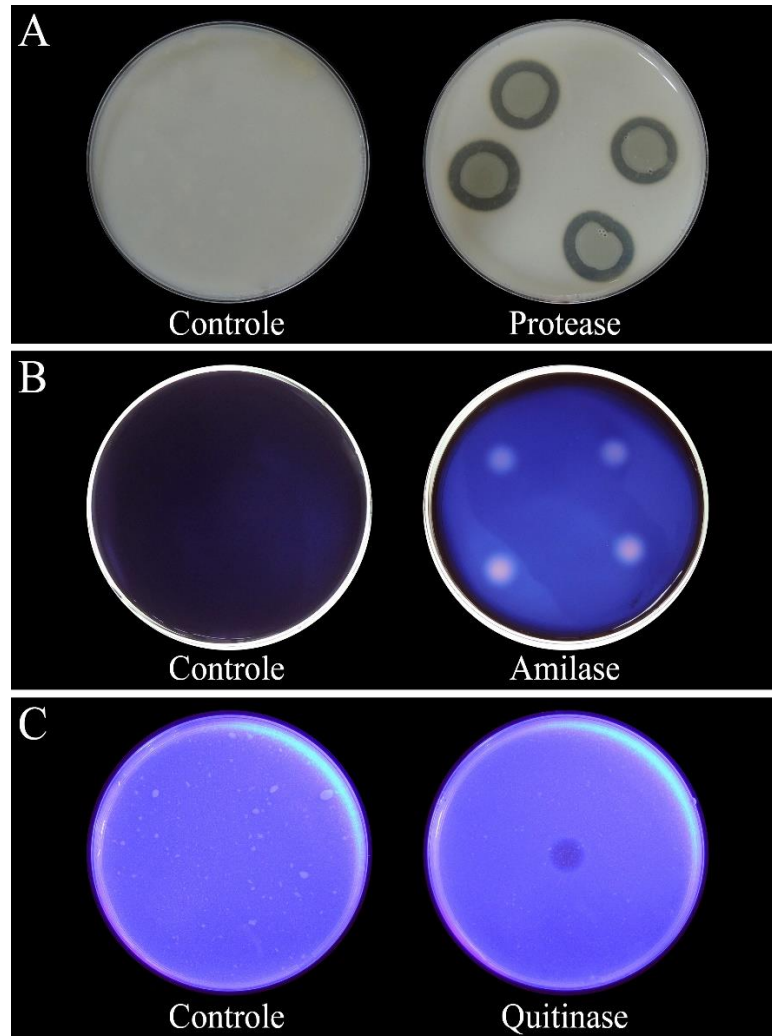
folhas de feijoeiro foram anotados do dia 1 ao dia 20. O amarelecimento e murchamento das folhas tratadas com o fungo eram aparentes, e esses sintomas aumentaram gradualmente. Quando as plantas foram amostradas pela última vez, todas as plantas infectadas com o patógeno fúngico morreram.

#### **Atividade de promoção de crescimento de plantas *in vitro***

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 possui diversas atividades de promoção de crescimento (Fig. 6 e 7). A bactéria *B. toyonensis* BAC 3151 apresentou a capacidade de fixar nitrogênio, produzir compostos orgânicos voláteis e secretar enzimas, como proteases, quitinases e amilases. No entanto, não conseguiu solubilizar fosfato, produzir sideróforos, AIA e HCN e nem secretar celulases nas condições testadas.



**Figura 6: Indicação de fixação de nitrogênio por *B. toyonensis* BAC 3151.** A presença de colônias no meio ágar manitol isento de nitrogênio representa teste positivo para a fixação de nitrogênio.



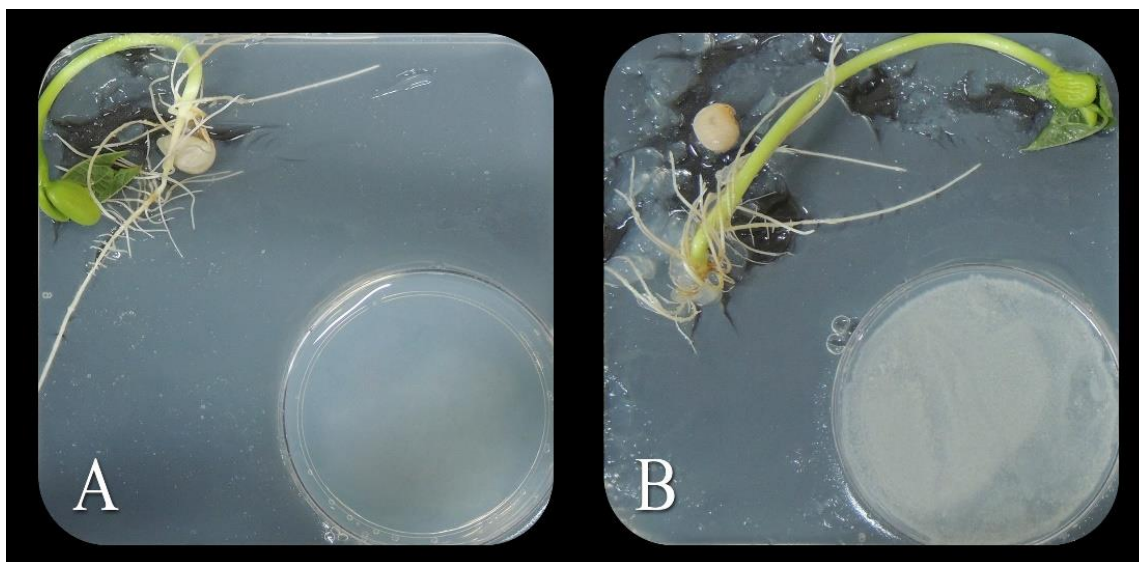
**Figura 7: Produção de proteases, amilases e quitinases por *B. toyonensis* BAC 3151.** (A) **Teste de produção de proteases:** desenvolvimento de um halo em torno das colônias bacterianas, indicando que as proteínas do leite foram hidrolisadas pela bactéria; (B) **Teste de produção de amilase:** desenvolvimento de um halo em torno das colônias bacterianas, indicando que o amido foi hidrolisado pela bactéria; (C) **Teste de produção de quitinase:** desenvolvimento de um halo em torno da colônia bacteriana, indicando que a quitina foi hidrolisada pela bactéria

A produção de VOGs foi avaliada por meio da incubação da placa com a plântula de feijoeiro e *B. toyonensis* BAC 3151. A Figura 8 mostra que os seus compostos voláteis podem promover o crescimento vegetal, e isso é demonstrado pelo valor do índice de vigor das plantas inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151 em relação ao das plantas não inoculadas (Tab. 4 e Fig. 8).

**Tabela 4:** Índice de vigor das plântulas de feijoeiro inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151.

Tratamento	Índice de vigor <sup>(1)</sup>
Controle	12,0±0,3 a
<i>B. toyonensis</i> BAC 3151	16,6±0,4 b

<sup>(1)</sup> Médias ± erro-padrão seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade (n=3).

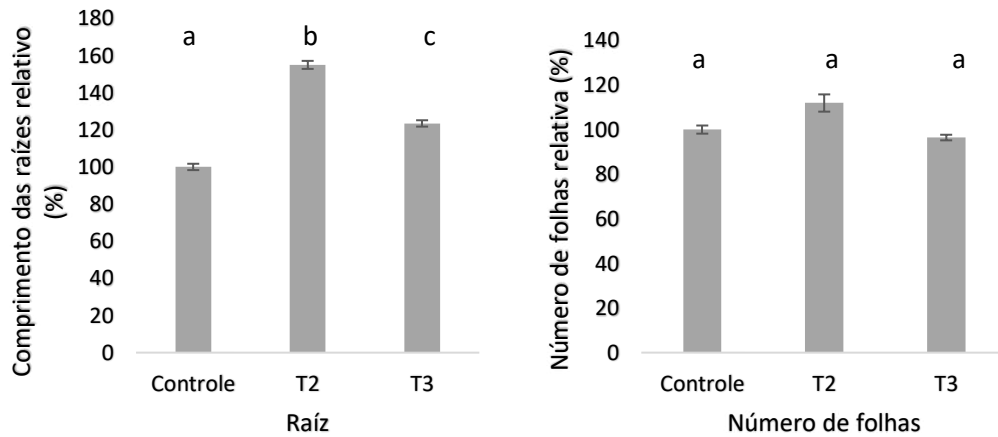


**Figura 8:** O efeito de compostos voláteis de *B. toyonensis* BAC 3151 no crescimento e desenvolvimento do feijoeiro. (A) Plântula controle (sem inoculação de *B. toyonensis* BAC 3151) e (B) Plântula com três dias de idade exposta a COV de *B. toyonensis* BAC 3151 em placa de Petri retangular.

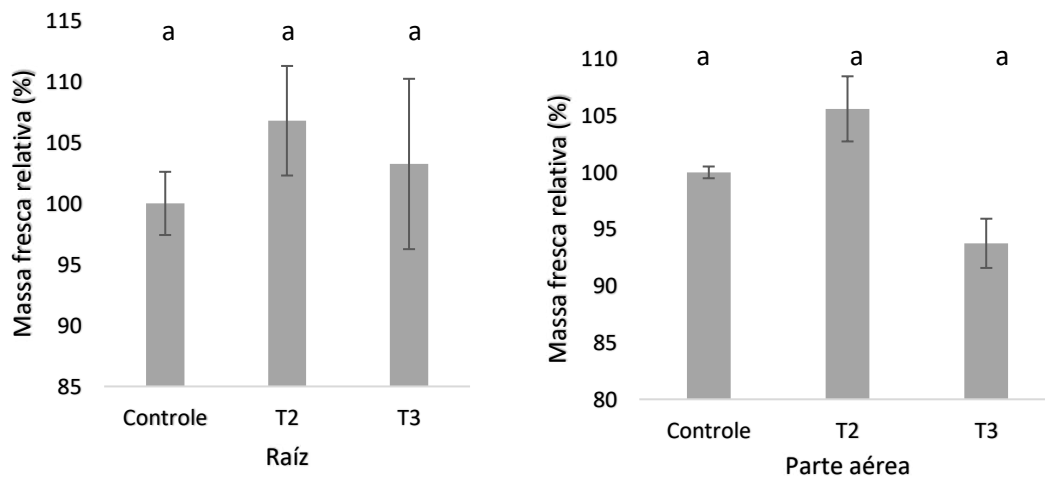
#### Avaliação da promoção de crescimento vegetal

Plantas de feijoeiro foram inoculadas com *B. toyonensis* BAC 3151 e monitoradas ao final de 45 dias em casa de vegetação. Inicialmente foi monitorada a parte aérea das plantas e realizada a avaliação do comprimento e a contagem do número de folhas. O comprimento das plantas não foi modificado pelo tratamento. No final do experimento foram avaliados o comprimento das raízes e a massa fresca e seca das partes aéreas e das raízes. *Bacillus toyonensis* BAC 3151 foi capaz de aumentar em 31,5 % e 33,6 %, o comprimento e a massa seca das raízes do feijoeiro, respectivamente (Fig. 10).

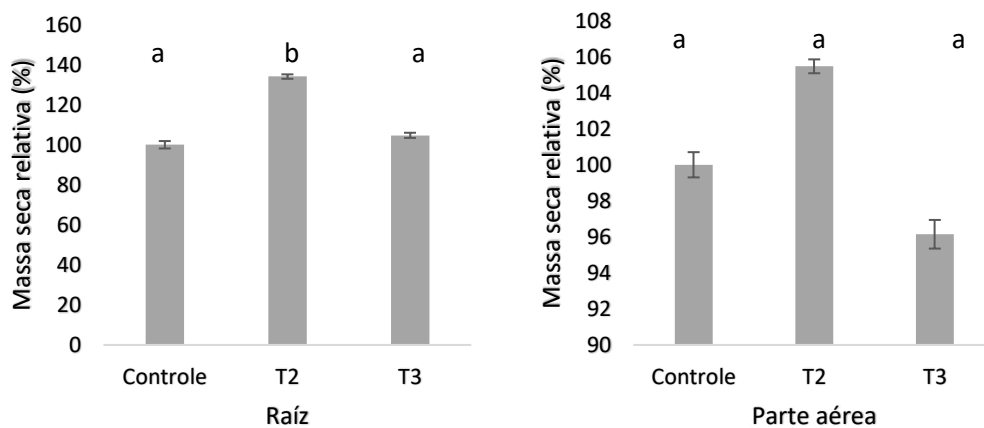
A



B



C



**Figura 9: Comparação dos parâmetros avaliados na promoção de crescimento de plantas do feijoeiro comum. (T2) Plantas tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151; (T3) Plantas tratadas com *B. toyonensis* BAC3151 submetido a autoclavagem. (A) Porcentagem do comprimento (esquerda) e massa seca das raízes (direita). (B) Porcentagem de massa fresca da raiz (esquerda) e parte aérea (direita); (C) Porcentagem de massa seca da raiz (esquerda) e parte aérea (direita). Barras de erro indicam desvio padrão. Letras iguais não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.**



**Figura 10: Efeito da aplicação de *B. toyonensis* BAC 3151 em raízes do feijoeiro. (A)** Raiz de feijoeiro tratada com água (controle); **(B)** raiz de feijoeiro inoculada com *B. toyonensis* BAC 3151- T2; **(C)** raiz de feijoeiro inoculada com *B. toyonensis* BAC 3151 submetido a autoclavagem- T3.

## Discussão

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 endofítico do feijoeiro foi caracterizado quanto a capacidade de controle de fitopatógenos e promoção de crescimento do feijoeiro. Para isso foi avaliado se *B. toyonensis* BAC 3151 produzia e secretava compostos que teriam ação positiva ou negativa no controle de patógenos e na promoção de crescimento do feijoeiro.

Foi observado que os compostos produzidos e secretados por *B. toyonensis* BAC3151 no meio de cultura foram capazes de inibir o crescimento das colônias fúngicas e também de causar mudança morfológica das hifas de *C. lindemuthianum*. Lopes et al. (2015; 2017) relataram o potencial de produção de compostos antimicrobianos de *B. toyonensis* BAC 3151 e que esses genes que codificam diversos antimicrobianos, como bacteriocinas e enzimas hidrolíticas, estão presentes no cromossomo e nos plasmídeos de *B. toyonensis* BAC 3151.

Os ensaios de antagonismo *in vivo* mostram que *B. toyonensis* BAC 3151 conseguiu inibir o desenvolvimento do mofo-branco e reduzir a severidade da antracnose. Estes resultados

se complementam, e permite afirmar que *B. toyonensis* BAC 3151 provavelmente secreta certos compostos antifúngicos que são mantidos ativos ou induzem uma resposta sistêmica da planta contra os fitopatógenos por meio da colonização do *B. toyonensis* BAC 3151 ou então a combinação de ambos os fatores. Além do *B. toyonensis* BAC 3151, existem diversos estudos que mostram a ação de espécies de *Bacillus* no controle de doenças fúngicas, justamente devido a capacidade desta espécie em produzir diversos compostos antimicrobianos, um exemplo é *Bacillus halotolerans* que produz antimicrobianos que tem ação contra os fungos *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium solani*, *Fusarium acuminatum* e *Fusarium chlamydosporum* (SLAMA et al., 2019).

A importância desses resultados é em relação ao controle de doenças fúngicas, que afligem a cultura do feijoeiro, representando uma grande ameaça para a agricultura. Onde o controle dessas doenças inicialmente é realizado pela utilização de pesticidas químicos e/ou cultivares resistentes. Porém, os produtos químicos selecionam fungos resistentes e também podem ser tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente. E em relação aos cultivares resistentes, existem dificuldades de se adquirir cultivares resistente, pois eles possuem resistência duráveis, não apresentam resistência a diversas doenças fúngicas e também não atendem todas as características desejáveis para uma boa produtividade. Devido a essas desvantagens, a busca por métodos alternativos de controle biológico, como o uso de bactérias e fungos antagonistas, vem cada vez mais se popularizando para o uso de estratégias integradas no controle de doenças e na produção agrícola (WANG et al., 2010).

Um resultado relevante foi a produção de enzimas hidrolíticas (protease e quitinase) de *B. toyonensis* BAC3151, que podem estar relacionadas a atividade antifúngica, pois essas enzimas degradam a parede celular dos fungos, sendo considerado um importante mecanismo de ação antifúngica (CHANG et al., 2010; WONG et al., 2008). Existem estudos que descrevem a produção de proteases e quitinases com ação antifúngicas de outras espécies de *Bacillus* endofíticos (CHANG et al., 2007; GOMAA, 2012; MYO et al., 2019). O efeito de espécies de *Bacillus* no crescimento de plantas tem sido relacionado a diversos fatores, como a proteção da planta contra patógenos, produção de hormônios de crescimento das plantas, aumento da absorção e da translocação de nutrientes e minerais e aumento da solubilidade e da disponibilidade de vários micronutrientes (ARKHIPOVA et al., 2005).

Além disso, *B. toyonensis* BAC 3151 demonstrou produzir amilases (Fig. 7). A produção de amilase contribui para a colonização das raízes pelas bactérias, e portanto, pode desempenhar um papel importante na estimulação do crescimento das plantas, na competição direta com o patógeno por nutrientes e espaço e também pode estimular resposta sistêmica da

planta aos patógenos (MARDANOVA et al., 2017). Um ponto em questão é que as sementes de feijão possuem estruturas denominadas amiloplastos, que são organelas que sintetizam e armazenam o amido (SHIGA E LAJOLO, 2005), assim *B. toyonensis* BAC 3151 poderia ser inoculado nas sementes, uma vez que produz amilase e consegue hidrolisar o amido, usando este como fonte de carbono para a sobrevivência e desenvolvimento nas sementes.

Um outro fator muito importante da produção de enzimas hidrolíticas por *B. toyonensis* BAC 3151 é que cerca de 60% das enzimas comercialmente disponíveis são atualmente produzidas por espécies de *Bacillus*, devido à grande aplicabilidade em diferentes áreas farmacêutica, têxteis e agrícolas e também por ser os micro-organismos industrialmente mais estabelecidos para a produção de proteínas extracelulares. Devido à disponibilidade de sistemas de produção em larga escala relativamente baratos e combinados com a capacidade de as bactérias segregarem diversas proteínas para o meio de crescimento (SCHALLMEY et al., 2004). Com isso, vale a pena explorar esse potencial de produção de enzimas hidrolíticas, principalmente de amilase, devido aos resultados apresentados (Fig. 6).

Ainda em relação aos fatores que promovem crescimento, os compostos orgânicos voláteis (COVs) tem um papel fundamental no aumento do crescimento das plantas, síntese ou metabolismo de fito-hormonal e também na inibição de crescimento de fungos. Os COVs produzidos pelo *B. toyonensis* BAC 3151 estimularam o desenvolvimento das plântulas, como apresentado nos resultados, por meio do índice de vigor, um indicativo de rápida germinação e crescimento das plântulas. Estudos mostraram que muitas espécies de *Bacillus* secretam diversos COVs que estimulam o desenvolvimento e crescimento das plantas e também tem ação antimicrobiana (ASARI et al., 2016; MYO et al., 2019; RATH et al., 2018). *Bacillus toyonensis* BAC 3151 aparentemente demonstrou produzir COVs que estimulam o desenvolvimento e crescimento do feijoeiro. Entretanto, a identificação e avaliação desses COVs aguardam investigações adicionais.

Um outro fator muito importante para a promoção de crescimento vegetal é a absorção e translocação de nutrientes e minerais, sendo assim um resultado importante foi a capacidade de *B. toyonensis* BAC 3151 fixar nitrogênio, pois é um elemento essencial e desempenha um papel crucial no crescimento e produtividade das plantas. Algumas espécies de *Bacillus* têm a capacidade de fixar nitrogênio e fornecê-lo para as plantas por meio de dois mecanismos diferentes, um de forma simbiótica e o outro de forma não simbiótica (GOVINDASAMY et al., 2011; YOUSUF et al., 2017). Um outro dado mostrado (Fig. 10) foi que plantas tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 (T2) apresentaram uma diferença da massa seca e do comprimento das raízes significativamente, conseqüentemente, um aumento da área de absorção de nutriente

e água, que contribui de maneira positiva para o crescimento e desenvolvimento das plantas de feijoeiro e a tolerância à estresses, como, por exemplo, o estresse hídrico.

*Bacillus toyonensis* BAC 3151 promoveu o aumento do comprimento e massa seca das raízes do feijoeiro, porém não foi possível observar a presença de nódulos nas raízes. Existem estudos que utilizam a co-inoculação de *Rizobium* spp. com espécies de *Bacillus*, que apresentaram alguma atividade de promoção de crescimento, em feijão (KORIR et al., 2017). Foi demonstrado o efeito positivo da inoculação combinada de bactérias endofíticas com *Rizobium* spp., como a nodulação precoce, o aumento no número de nódulos e melhora geral no desenvolvimento radicular (KORIR et al., 2017). Estes resultados são devido a aumento direto e indireto do crescimento das plantas por uma variedade de mecanismos das bactérias endofíticas, como a produção de substâncias promotoras de crescimento, controle de patógenos e solubilização dos minerais (KORIR et al., 2017). Entretanto, é necessário fazer uma avaliação dessa combinação de *B. toyonensis* BAC 3151 com *Rizobium* spp. para avaliar se a co-inoculação combinada terá um efeito positivo para o feijoeiro.

Plantas tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 apresentaram um efeito estimulatório em relação as outras plantas (Fig. 4). Entretanto, essas plantas ao final da avaliação do experimento não apresentaram diferença estatística em relação ao comprimento da parte aérea. Este resultado está intimamente relacionado com as condições que as plantas permaneceram ao longo do experimento, pois as condições se tornaram limitantes devido ao tamanho dos vasos utilizados (500 mL). O pequeno volume do vaso leva a uma alta concentração de raízes com consequentes demandas de alta taxa de oferta de oxigênio e remoção de dióxido de carbono (BUNT, 1960), inibindo o desenvolvimento das plantas previamente tratadas com *B. toyonensis* BAC 3151 e permitindo que as outras plantas se desenvolvessem ao longo do experimento.

### **Conclusão e perspectiva**

Em conclusão, os resultados destes experimentos fornecem fortes evidências de que *B. toyonensis* BAC 3151 possui potencial como agente de biocontrole, pois foi capaz de inibir a ocorrência do mofo-branco e reduzir a severidade da antracnose em plantas de feijão. Isso pode ser devido à produção de enzimas que degradam a parede celular dos fungos, ou pela produção de metabólitos antifúngicos e COVs, ou por induzir uma resposta sistêmica da planta contra o fitopatógeno, ou a combinação de todos esses fatores. Além de promover crescimento vegetal com um aumento da massa seca e do comprimento das raízes de feijoeiro e também por meio dos mecanismos de promoção de crescimento.

Com todos os resultados obtidos ao longo deste trabalho, e também devido a facilidade de inoculação de *B. toyonensis* BAC 3151 em sementes de feijão e a eficiência do controle do mofo-branco, conclui-se que *B. toyonensis* BAC 3151, pode vir a se tornar um produto de grande importância para as lavouras de feijão. Uma vez que os gastos com controle de doenças fúngicas, principalmente a do mofo-branco, são muito caras e de difícil controle, pois a doença se manifesta em um período tardio de desenvolvimento da planta e ainda existem poucos estudos em relação a cultivares resistentes.

## REFERÊNCIAS

- ABAWI, C. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Root rots of bean in Latin American and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali, Colombia.
- ARKHIPOVA, T. N. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, v. 272, n. 1–2, p. 201–209, 2005.
- ASARI, S. et al. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1–11, 2016.
- BHORE, S. J. et al. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of *Sambung Nyawa* [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. **Bioinformation**, v. 5, n. 5, p. 191–197, 2010.
- BOTTA, A. L. et al. In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 666–674, 2013.
- BRADER, G. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, 2014.
- BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.): model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.
- BUNT, A. C. Some Physical Properties of Plot-Plant Composts and Their Effect on Plant Growth. **Plant Soil**, v. 13, p. 322, 1960.
- CHANG, W. T. et al. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 945–950, 2010.
- CHANG, W. T. et al. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1224–1230, 2007.
- CHECINSKA, A. et al. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 351–369, 2015.
- COSTA, L. E. DE O. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1562–75, 2012.

FIERS, M. et al. Volatile Compound-Mediated Interactions between Barley and Pathogenic Fungi in the Soil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

FREIRE FAGUNDES-NACARATH, I. R. et al. A set of standard area diagrams to assess white mold severity on the leaflets of common beans. **Crop Protection**, v. 114, n. January, p. 60–67, 2018.

GAITÁN-SOLÍS, E. et al. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, v. 42, n. 6, p. 2128–2136, 2002.

GOMAA, E. Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 103–111, 2012.

GONZAGA, L. L. et al. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 485–496, 2015.

GOTHWAL, R. K. et al. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 101–109, 2008.

GOVINDASAMY, V. et al. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. [s.l.: s.n.]. v. 1. 2011.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HASSAN, S. E. D. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 687–695, 2017.

INDIRAGANDHI, P. et al. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1037–1045, 2008.

IQBAL, U. et al. Effect of zinc-phosphate-solubilizing bacterial isolates on growth of *Vigna radiata*. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 243–248, 2010.

JIMÉNEZ, G. et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112 T, the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. **Genome Announcements ASM**, v. 1, n. 6, p. e01080-13, 2013a.

JIMÉNEZ, G. et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383–391, 2013b.

KANG, S. M. et al. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 2, p. 277–281, 2009.

KORIR, H. et al. Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria

- on Common Bean growth in a Low Phosphorus Soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 141, 2017.
- LOPER, J. E. Influence of Bacterial Sources of Indole-3-acetic Acid on Root Elongation of Sugar Beet. **Phytopathology**, v. 76, n. 4, p. 386, 2008.
- LOPES, R. et al. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 0, 2017.
- LORCK, H. Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 1, n. 2, p. 142–146, 1948.
- MARDANOVA, A. M. et al. *Bacillus subtilis* with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. **Agricultural Sciences**, v. 08, n. 01, p. 1–20, 2017.
- McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195-217, 1923.
- MORAES, W. B. C. et al Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. **Summa Phytopathologica**, 1976.
- MYO, E. M. et al. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. **Biological Control**, v. 134, p. 23–31, 2019.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.
- OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C. et al. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological Research**, v. 208, p. 25–31, 2018.
- RADHAKRISHNAN, R. et al. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 181–189, 2016.
- RATH, M. et al. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, v. 208, p. 76–84, 2018.
- RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.
- SAMANTA, R. et al. Production of hydrolases by N<sub>2</sub>-fixing microorganisms. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Fena, v. 185, p. 75-81, 1989.
- SANTOS, D. M.M. **Disciplina de Fisiologia Vegetal**, UNESP, Jaboticabal. 2004
- SANTOS, J. F. DOS et al. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 2, n. 1, p. 10- 15, 2014.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.
- SARTORATO, A. et al. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. **EMBRAPA**, 1994.

- SCHALLMEY, M. et al. Desenvolvimentos no uso de espécies de *Bacillus* para produção industrial. **Pode. J. Microbiol.** v. 50, p. 1-17, 2004.
- SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSEST, O. Common beans: Research for crop improvement. **CAB International**; Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Oxon, Gb, 980 p. 1991
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.
- SHANER; FRINNEY. The Effect of Nitrogen Fixation Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat Unfortunately, is only a partial September on a fine sandy loam soil on the Produe genetically as a quatitative trair. Moreover, Knox's slow-mild. **Resistance.** 1977.
- SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. M. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)- composition and structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 63,p. 1-12, 2005.
- SILVA, D. E. S. G.; OLIVEIRA, L. G. Avaliação da produção de sideróforos em actinomicetos. **XIX Congresso Interno de Iniciação Científica**, UNICAMP, 2011.
- SLAMA, H. BEN et al. Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* plant warden against fusarium. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–24, 2019.
- SMID, M.; KOSUGE, T. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resitent mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on aleanders. **Physiol. Plant Pathol**, v. 13, p. 203-214, 1978.
- TAHIR, H. A. S. et al. Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. February, p. 1–11, 2017.
- TOLÊDO-SOUZA, E. D. et al. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*. **pesquisa Agropecuária Tropical**, 2003.
- VALE, F. X. R. et al. Quant: quantificação de doenças. Versão 1.0.1. Viçosa: UFV, 2001.
- WANG, C. et al. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gac* A derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 898–907, 2000.
- WANG, N. et al. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 589–594, 2010.
- WANG, Y. et al. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant, Cell & Environment**, v. 16, n. 5, p. 579–585, 1993.
- WONG, J. H. et al. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1888–1898, 2008.
- XIE, S. et al. Plant Growth Promotion by Spermidine-Producing *Bacillus subtilis* OKB105. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 7, p. 655–663, 2014.
- YAISH, M. W. ete al. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity

tolerance. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 1519–1532, 2015.

YOUSAF, M. et al. High-yielding Wheat Varieties Harbour Superior Plant Growth Promoting-Bacterial Endophytes. **Applied Food Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 143–154, 2017.

YOUSUF, J. et al. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 922–932, 2017.

ZHAO, L. et al. Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain MQ23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 567–575, 2011.

## Conclusão Geral

- *Bacillus toyonensis* BAC 3151 apresenta um plasmídeo, denominado pBt52. O plasmídeo possuiu 52 150 pb, 54 ORFs que codificam uma bacteriocina (Columbicina A), uma proteína VanZ que confere resistência ao antibiótico teicoplanina, três transposases de diferentes famílias de sequências de inserção, 20 proteínas hipotéticas e 29 proteínas com funções de metabolismo e transporte.
- *Bacillus toyonensis* BAC 3151 possui capacidade de promover crescimento vegetal por meio de diferentes mecanismos, entre eles, a fixação de nitrogênio, produção de enzimas hidrolíticas (protease, amilase e quitinase). Além disso, promove o aumento expressivamente de 31,5 % do comprimento e 33,6 % massa seca das raízes do feijoeiro.
- *Bacillus toyonensis* BAC 3151 possui capacidade de controlar o desenvolvimento do mofo-branco no feijoeiro e reduzir a severidade da antracnose em 39,3 %.