

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Esporulação da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9: aspectos biológicos, bases moleculares e o seu papel na interação com o milho

Mauricio Santos Rosa

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2024

Mauricio Santos Rosa
Engenheiro Agrônomo

Esporulação da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus thuringiensis*
RZ2MS9: aspectos biológicos, bases moleculares e o seu papel na interação com o
milho

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Rosa, Mauricio Santos

Esporulação da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9: aspectos biológicos, bases moleculares e o seu papel na interação com o milho/ Mauricio Santos Rosa. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

225 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Inoculantes 2. CRISPR-Cas9 3. Esporulação 4. Interação bactéria-planta I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e amigos, que me apoiaram e permitiram que este trabalho fosse concluído apesar de todos os desafios e percalços encontrados durante a jornada para conclusão desse mestrado.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais (Angelica e Geraldo) e minha tia Beth. Sem vocês qualquer ambição em fazer um mestrado dificilmente teria superado esse plano das ideias.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, agradeço imensamente por todo o seu apoio e orientação, sempre muito solícito ao apoiar as decisões que culminaram nesta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Quecine-Verdi por todo o apoio durante a execução do mestrado. Contando com a graduação já foram mais de 5 anos de trabalho conjunto, agradeço bastante todas as oportunidades e apoio em todo esse período.

Ao Zezo, por todo o apoio dado durante a execução de todos os experimentos em casa de vegetação e por manter a infraestrutura do laboratório sempre nas melhores condições possíveis.

À todos os meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e ajuda. Obrigado Joelma (Por toda a ajuda, compartilhamento de conhecimento e experiência), Everthon (por todo o apoio e dicas em relação ao mestrado e a todo o compartilhamento de conhecimento e experiência, principalmente com molecular e CRISPR), Ariane (por todo o apoio dado principalmente na reta final com os experimentos nocaute), Aline (pelo apoio e descontração, principalmente nas últimas tentativas de transformação), Carol H. (pela ajuda em vários experimentos durante a pandemia de COVID-19 e pelas sugestões e ajuda durante a escrita dessa dissertação), Gladys (Pela ajuda nas análises de bioinformática) e a restante da equipe do laboratório, que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Aos meus amigos. Agradeço à Madoka, Amanda e Enrico pela amizade, a pandemia acabou dificultando muitas conversas, mais ainda agradeço o apoio, amizade e descontração nos momentos difíceis, muito obrigado a todo o grupo dos “bananas”. Também agradeço ao Renan, Raphael, André, Kradh e Igor pela amizade e por proporcionarem muitos momentos de descontração durante vários momentos difíceis esse mestrado.

Ao Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira Pela disponibilização da estufa onde foram realizados grande parte dos experimentos de promoção de crescimento com milho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Carneiro Vieira por disponibilizar o uso do eletroporador enquanto o do laboratório não estava disponível.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela disponibilização do microscópio de contraste de fase para as primeiras avaliações de esporulação feitas, enquanto não era providenciado um para o laboratório.

Ao Nicolas pela ajuda e disponibilização do clorofilômetro usado no trabalho.

Ao Emerson, por todo o esforço de buscar e providenciar as sementes de milho utilizadas nos primeiros experimentos de promoção de crescimento de milho realizados.

À Dr^a. Celeste Paola D'Alessandro por providenciar as sementes de milho utilizadas nos últimos ensaios de promoção de crescimento realizados

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP e seu corpo de funcionários e professores, principalmente aos do Departamento de Genética, pelas oportunidades e por manterem funcionando toda essa estrutura universitária sem a qual este trabalho, e muitos outros, não conseguiria existir.

Ao financiamento do projeto propiciado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Processo N° 88887.614984/2021-00)

EPÍGRAFE

“A ciência é uma irmã caçula (talvez bastarda) da arte”.

César Lattes

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. BACILLUS THURINGIENSIS RZ2MS9, EFEITOS DO MODO DE APLICAÇÃO, ADUBAÇÃO FOSFATADA E TIPO DE INÓCULO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO EM MILHO	17
2.1. INTRODUÇÃO	17
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.2.1. Linhagens e condições de crescimento.....	20
2.2.2. Desinfestação das sementes de milho.....	20
2.2.3. Curva de esporulação do RZ2MS9 em LB	20
2.2.4. Ensaios de promoção de crescimento	21
2.2.4.1. Ensaio 1 – Efeito da forma de aplicação de RZ2MS9.....	21
2.2.4.2. Ensaio 2 – Efeito do fósforo	22
2.2.4.3. Ensaio 3 – Efeito da forma de aplicação e tipo de inóculo.....	24
2.2.5. Análises estatísticas.....	26
2.3. RESULTADOS	26
2.4. DISCUSSÃO	36
ANEXOS	49
3. DINÂMICA DE ESPORULAÇÃO E GERMINAÇÃO DO BACILLUS THURINGIENSIS RZ2MS9 E SEUS IMPACTOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MILHO	55
3.1. INTRODUÇÃO	55
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.2.1. Material biológico.....	57
3.2.2. Desinfestação das sementes de milho.....	57
3.2.3. Otimização da esporulação do RZ2MS9.....	58
3.2.3.1. Quantificação de células e endósporos.....	58
3.2.3.2. Otimização do meio de cultura	58
3.2.3.3. Avaliação dos efeitos da matéria prima no meio selecionado	60
3.2.3.4. Curva de crescimento e esporulação	60
3.2.4. Efeito do estado da linhagem RZ2MS9 nas suas dinâmicas de promoção de crescimento de milho	60
3.2.4.1. Preparação dos inóculos.....	60
3.2.4.2. Ensaio em germitest	60
3.2.4.3. Ensaio em casa de vegetação	61
3.2.5. Dinâmica de germinação dos endósporos de Bacillus.....	63
3.2.5.1. Quantificação da taxa de da germinação dos endósporos de RZ2MS9	63
3.2.5.2. Quantificação da taxa de germinação por diferença de OD _{600nm}	63
3.2.5.3. Quantificação da taxa de germinação por plaqueamento	64
3.2.5.4. Quantificação da taxa de germinação por microscopia de contraste de fase	64
3.2.5.5. Obtenção das suspensões de endósporos	64
3.2.5.6. Teste de germinação em L-Alanina	65
3.2.5.7. Triagem de possíveis germinantes dos endósporos dos Bacillus RZ2MS9 e 168.....	65
3.2.5.8. Efeitos dos germinantes selecionados na germinação dos endósporos	66
3.2.5.9. Análise de microscopia do efeito dos germinantes selecionados	67
3.2.5.10. Efeito dos exsudatos radiculares de milho na germinação dos endósporos das linhagens RZ2MS9 e 168	67
3.2.5.11. Avaliação do tempo de germinação dos endósporos do RZ2MS9	67
3.2.5.12. Curva de viabilidade do RZ2MS9.....	68
3.2.6. Análise in silico dos genes de esporulação da linhagem RZ2MS9.....	68
3.2.7. Buscas complementares de genes relacionados à esporulação na anotação do genoma do RZ2MS9	70
3.2.8. Análise estatística.....	70
3.3. RESULTADOS	70
3.3.1. Otimização da esporulação do RZ2MS9.....	70
3.3.2. Efeito do estado do RZ2MS9 nas suas dinâmicas de promoção de crescimento vegetal	73
3.3.2.1. Ensaio em germitest.....	73
3.3.2.2. Ensaio em casa de vegetação	75
3.3.3. Dinâmicas de germinação dos endósporos do RZ2MS9	77

3.3.3.1. Teste de germinação em L-Alanina.....	77
3.3.3.2. Análise da germinação dos endósporos dos <i>Bacillus</i> RZ2MS9 e 168 em diferentes substratos	78
3.3.3.3. Efeito dos exsudatos radiculares de milho na germinação dos endósporos das linhagens RZ2MS9 e 168 ..	85
3.3.3.4. Análise de metaboloma dos exsudatos radiculares de milho	89
3.3.3.5. Avaliação do tempo de germinação dos endósporos do RZ2MS9.....	92
3.3.3.6. Curva de viabilidade do RZ2MS9	94
3.3.4. Análise <i>in silico</i> dos genes de esporulação da linhagem RZ2MS9 de <i>Bacillus</i>	95
3.4. DISCUSSÃO.....	100
APÊNDICES.....	118
4. NOCAUTE DOS GENES <i>KINA</i> E <i>SIGF</i> ESSENCIAIS A ESPORULAÇÃO NO <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> RZ2MS9.....	165
4.1. INTRODUÇÃO.....	165
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	171
4.2.1. Material biológico	171
4.2.2. Antibiograma	172
4.2.3. Sequenciamento de DNA.....	172
4.2.4. Busca por sistemas anti-CRISPR na linhagem RZ2MS9	172
4.2.5. Seleção dos protoespaçadores	172
4.2.6. Construção dos plasmídeos carregando os protoespaçadores	173
4.2.6.1. Obtenção das células competentes de <i>E. coli</i> e dos plasmídeos pCas9, pCRISPR e pTarget	173
4.2.6.2. Clonagem de protoespaçadores nos plasmídeos pCas9, pCRISPR e pTarget.....	173
4.2.7. Construção dos cassetes de DNAs doadores para a edição <i>sítio dirigida</i>	176
4.2.8. Avaliação do fenótipo de esporulação.....	178
4.2.9. Tentativas e nocaute dos genes de esporulação.....	179
4.2.9.1. Células eletrocompetentes da linhagem RZ2MS9	179
4.2.9.2. Verificação da transformação	179
4.2.9.3. Construção das linhagem RZ2MS9::pCas9, RZ2MS9::pCRISPR e RZ2MS9::pCas9-pCRISPR	180
4.2.9.4. Tentativas de Nocaute dos genes de Esporulação.....	180
4.2.9.5. Avaliação dos plasmídeos pCas e pTargetF utilizados nas transformações com o RZ2MS9	181
4.2.10. Buscas complementares <i>in silico</i> por genes de resistência a antibióticos no genoma do RZ2MS9.....	182
4.3. RESULTADOS	182
4.3.1. Antibiograma	182
4.3.2. Seleção dos protoespaçadores	184
4.3.3. Busca por sistemas anti-CRISPR na linhagem RZ2MS9	185
4.3.4. Construção dos plasmídeos carregando os protoespaçadores	186
4.3.4.1. pCas9 e pCRISPR	186
4.3.4.2. pTargetF	187
4.3.5. Construção dos cassetes de DNAs doadores para a edição <i>sítio dirigida</i>	191
4.3.6. Tentativas e nocaute dos genes de esporulação.....	193
4.3.6.1. Avaliação dos plasmídeos pCas e pTargetF utilizados nas transformações com o RZ2MS9	201
4.3.7. Buscas complementares <i>in silico</i> por genes de resistência a antibióticos no genoma do RZ2MS9.....	203
4.4. DISCUSSÃO.....	204
APÊNDICES.....	218
5. CONCLUSÕES FINAIS.....	225

RESUMO

Esporulação da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Bacillus thuringiensis***RZ2MS9: aspectos biológicos, bases moleculares e o seu papel na interação com o milho**

Bacillus são um dos grupos de bactérias capazes de formar endósporos em resposta a condições ambientais adversas, garantindo a sobrevivência da bactéria a essas condições. Tal característica é bastante desejada para a formulação de bioprodutos para uso agrícola por reduzirem a infraestrutura necessária para armazenamento das bactérias. Ao mesmo tempo a esporulação cessa a atividade metabólica da bactéria, e por consequência seus efeitos de interesse. Nessa perspectiva o presente trabalho se concentrou em avaliar como a esporulação pode alterar a ação do *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 como promotor de crescimento de plantas. Sendo esta uma linhagem já bastante estudada em relação as suas capacidades como promotora de crescimento. Nesse aspecto o Capítulo 1 forneceu informações importantes a respeito dos melhores modos de aplicação da bactéria e confirmou novamente o efeito predominante desta sobre o sistema radicular das plantas, como já observado em estudos anteriores. Já o Capítulo 2 demonstrou que a aplicação da linhagem RZ2MS9 na forma de endósporos reduz drasticamente seu efeito sobre as plantas de milho, bem como que os exsudatos radiculares do milho podem atrapalhar a germinação dos endósporos de *Bacillus* spp. Sendo essa inibição de germinação também observada na linhagem *Bacillus subtilis* 168, utilizada como controle. Esses resultados vão de encontro ao geralmente alegado pela literatura a respeito da conveniência da aplicação de endósporos de *Bacillus* em culturas agrícolas. Ao mesmo tempo também foi observado que a inoculação da linhagem RZ2MS9 no estado vegetativo pode alterar a composição dos exsudatos radiculares do milho permitindo a germinação de alguns dos endósporos. Já as análises in silico comparando os genes relacionados a esporulação presentes em diferentes genomas de *Bacillus* revelaram uma grande variação na ocorrência e na identidade dos genes encontrados, muito em função de uma grande concentração de dados ao redor da espécie *B. subtilis*. Por fim no Capítulo 3 foi realizada a tentativa de nocaute dos genes *kinA* e *sigF*, essenciais para a esporulação, a fim de se obter linhagens do RZ2MS9 não esporulantes. As tentativas de nocaute não foram bem sucedidas sendo discutido as possíveis causas da baixa eficiência de nocaute encontrada.

Palavras-chave: Inoculantes, CRISPR-Cas9, Esporulação, Interação bactéria-planta

ABSTRACT

Sporulation of the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9: biological aspects, molecular bases and its role in the interaction with maize

Bacillus are one of the groups of bacteria capable of forming endospores in response to adverse environmental conditions, ensuring the bacteria's survival in these conditions. This characteristic is highly desired for the formulation of bioproducts for agricultural use as it reduces the infrastructure necessary for storing bacteria. At the same time, sporulation ceases the metabolic activity of the bacteria, and consequently its effects of interest. From this perspective, the present work focused on evaluating how sporulation can alter the action of *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 as a plant growth promoter. This is a strain that has already been extensively studied in relation to its capabilities as a growth promoter. In this aspect, Chapter 1 provide important information regarding the best ways to apply the bacteria and confirmed once again its predominant effect on the root system of plants, as already observed in previous studies. Chapter 2 demonstrate that the application of the RZ2MS9 strain in the form of endospores drastically reduces its effect on corn plants, as well as that corn root exudates can disturb the germination of *Bacillus* spp. endospores. This inhibition of germination was also observed in the *Bacillus subtilis* 168 strain, used as a control. These results are in line with what is generally claimed in the literature regarding the convenience of applying *Bacillus* endospores to agricultural crops. At the same time, it was also observed that inoculation of the RZ2MS9 strain in the vegetative state can change the composition of corn root exudates, allowing the germination of some of the endospores. *In silico* analyzes comparing genes related to sporulation present in different *Bacillus* genomes revealed a large variation in the occurrence and identity of the genes found, largely due to a large concentration of data surrounding the *B. subtilis* species. Finally, in Chapter 3, an attempt was made to knock out the *kinA* and *sigF* genes, essential for sporulation, in order to obtain non-sporulating RZ2MS9 strains. The knockout attempts were not successful and the possible causes of the low knockout efficiency found were discussed.

Keywords: Inoculants, CRISPR-Cas9, Sporulation, Bacteria-plant interaction

1. INTRODUÇÃO

A esporulação é um processo presente nas bactérias do gênero *Bacillus* e que permite a elas sobreviverem a condições ambientais desfavoráveis por meio da produção de uma estrutura de resistência denominada endósporo (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019). Os endósporos carregam o DNA da bactéria e alguns ribossomos em uma pequena célula com citoplasma desidratado recoberta por uma grossa parede de peptidoglicanos e uma capa proteica (LECCA et al., 2016; HIGGINS; DWORKIN, 2012). Neste estado esporulado a bactéria permanece metabolicamente inativa aguardando as condições ambientais ficarem novamente favoráveis para a retomada do ciclo de crescimento vegetativo, e consequente atividade metabólica (LECCA et al., 2016; HIGGINS; DWORKIN, 2012).

Essa característica permite que os *Bacillus* possam ficar meses armazenados em temperatura ambiente sem que haja perda de viabilidade de células. Facilitando a logística para criação de produtos para aplicação de bactérias desse gênero em campo. Somado a essa característica de resistência os *Bacillus* também são conhecidos produtores de enzimas de interesse econômico, fitormônios, antibióticos, e sideróforos além de também poderem apresentar atividade solubilizadora de nutrientes, indutores de resistência (HASHEM; TABASSUM; ABD ALLAH, 2019; BLAKE; CHRISTENSEN; KOVÁCS, 2021; TSOTETSI et al., 2022). Tais características tornam os *Bacillus* são um grupo de grande interesse para aplicação agrícola principalmente na perspectiva atual de desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e menos dependente de insumos químicos (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019; O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022).

Vários são os *Bacillus* descritos como promotores de crescimento de plantas (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019; HASHEM; TABASSUM; ABD ALLAH, 2019; BLAKE; CHRISTENSEN; KOVÁCS, 2021; TSOTETSI et al., 2022). Entretanto dentro deste gênero a espécie *B. thuringiensis*, apesar de bastante conhecida como um importante entomopatígeno agrícola, acaba sendo bastante negligenciada em relação ao seu potencial uso como promotor de crescimento de plantas (AZIZOGLU, 2019). Vidal-Quist et al. (2013) destacaram que uma grande parte das linhagens de *B. thuringiensis* não tem atividade inseticida relatada e apontam problemas na imagem dessa espécie como sendo exclusivamente um patógeno de insetos. Raddadi et al. (2008) investigaram o efeito benéfico de 16 linhagens de *B. thuringiensis* e observaram que todas as linhagens possuíam características relacionadas a promoção de crescimento vegetal, como solubilização de fósforo e produção de fitormônios. Já Armada et al. (2016) chegaram a relatar atividade de redução de stress hídrico em *Lavandula dentata* com a inoculação de isolados de *B. thuringiensis* e micorrizas.

Nessa perspectiva Vidal-Quist et al. (2013) chega a propor que as plantas seriam um reservatório intermediário importante para o ciclo de vida dos *B. thuringiensis*, com as características de promoção de crescimento vegetal sendo um reflexo dessa interação. Nesse modelo os *B. thuringiensis* colonizariam ativamente as plantas a fim de alcançar os demais tecidos da parte aérea da planta, aumentando a probabilidade de conseguirem infectar um novo hospedeiro invertebrado. Dado que esses hospedeiros em sua maioria são organismos fitófagos, se associar e colonizar ativamente os tecidos vegetais garantiria uma maior probabilidade da bactéria conseguir infectar seu hospedeiro do que se esta permanecesse no solo ou dependesse de ser carregada para a parte aérea das plantas de forma passiva por algum fator externo (VIDAL-QUIST et al., 2013; PALMA et al., 2014). Nesse aspecto Vidal-Quist et al. (2013) relata que apesar das linhagens de *B. thuringiensis* colonizarem as raízes de plantas de forma menos intensa que outras bactérias mais especializadas em se associarem a plantas, a habilidade de colonizar e promover o crescimento de plantas dos *B. thuringiensis* está agrupada filogeneticamente no grupo em linhagens taxonomicamente próximas. Sugerindo um processo de adaptação evolutiva para a interação dessa espécie de bacillus com plantas.

Nessa perspectiva a linhagem RZ2MS9 de *B. thuringiensis* apresenta algumas singularidades bastante características. Apresentando uma capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato inorgânico, produzir fitormônios e uma atividade promotora de crescimento de plantas bastante estudada (BATISTA et al., 2018; FIGUEREDO et al., 2023; BATISTA et al., 2021; ALMEIDA et al., 2021; LONGATTO, 2020; OLIVEIRA, 2021; ANICETO, 2016; TSCHOEKE, 2016), entretanto esta linhagem não apresenta uma boa atividade inseticida (LONGATTO, 2020). Tal ação como promotora de crescimento de plantas é bastante estudada pela equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, sendo bastante semelhantes os procedimentos para inoculação da bactéria nas culturas de interesse avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1. Ensaios de promoção de crescimento com o RZ2MS9

Referência	Condição de crescimento	Inoculação		Ensaio	
		Concentração	Procedimento	Ambiente	Cultura
ALMEIDA et al., 2021	28°C em LB	N.I.	Imersão das sementes na suspensão de células por 30 min	Câmara de crescimento	Milho
ANICETO, 2016	24h a 28°C 180 rpm em LB	10 ⁹ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células por 30 min	Campo	Milho
BATISTA et al., 2018	24h a 28°C 150 rpm em TSB	10 ⁸ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células por 30 min	Casa de vegetação	Soja e Milho
BATISTA et al., 2021	21h a 28°C 180 rpm em LB	10 ⁸ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células por 30 min	Casa de vegetação	Tomate
FIGUEREDO et al., 2023	24h a 28°C 180 rpm em LB	10 ⁸ UFC/ml	Adição de 10ul da suspensão de células por semente seguido de agitação para homogeneização	Câmara de crescimento	Milho
LONGATTO, 2020	9h a 28°C 180 rpm em LB	10 ⁸ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células por 30 min	Casa de vegetação	Milho
OLIVEIRA, 2021	24h a 28°C 150 rpm em LB	10 ⁸ UFC/ml	Aplicação de 8ml de suspensão de células por Kg de sementes	Campo	Soja
TSCHOEKE, 2016	28°C 180 rpm em LB	10 ⁸ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células por 20 min	Casa de vegetação	Soja

N.I. – Não Informado.

Além da padronização da inoculação nas sementes a compilação dos diferentes procedimentos para avaliação atividade promotora de crescimento de plantas da linhagem RZ2MS9 também aponta para a recorrente aplicação das células dessa bactéria no seu estado vegetativo. Não sendo avaliado o efeito da aplicação desta na forma de endósporos,

dado que os tempos de crescimento utilizados não ultrapassaram 24h, sendo insuficiente para uma formação significativa de endósporos no meio de cultura.

A esporulação é frequentemente descrita como um fator positivo para a inoculação de *Bacillus* em plantas (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019; AZIZOGLU, 2019; VIDAL-QUIST et al., 2013; RADDADI et al., 2008; RADDADI et al., 2007). Entretanto a ausência de atividade metabólica neste estado impõe um desafio ao uso dos *Bacillus*, sendo necessário mantê-los em seu estado vegetativo para que realizem as atividades de interesse (ZHANG; DUAN; WU, 2016). Sendo *B. thuringiensis* uma exceção quanto a sua produção das proteínas entomopatogênicas, realizada apenas durante a esporulação (DENG et al., 2014; AZIZOGLU, 2019). Dado que as atividades de interesse da linhagem *B. thuringiensis* RZ2MS9 se concentram na sua capacidade como promotora de crescimento e que esta linhagem não possui uma atividade inseticida relevante assume-se que o processo de esporulação pode ser antagônico as atividades de interesse dessa linhagem.

Neste aspecto a presente dissertação objetivou explorar o impacto da esporulação nas dinâmicas da bactéria *B. thuringiensis* RZ2MS9 como uma rizobactéria promotora de crescimento de plantas. Em uma primeira etapa inicial avaliou-se o efeito de práticas agrícolas relacionadas ao plantio (Modo de aplicação adubação e tipo de célula aplicada) na ação do RZ2MS9. Visando guiar a montagem e análise dos demais experimentos com plantas ao determinar quais seriam as melhores condições para aplicação da bactéria e quais são as principais características a serem avaliadas para a análise dos seus efeitos sobre as plantas de milho. Já no segundo capítulo focou-se em se observar o efeito do estado de aplicação dessa linhagem (vegetativo ou esporulada) na sua ação sobre as plantas de milho, bem como se observar e descrever quais fatores podem influenciar na germinação dos endósporos do RZ2MS9. Por fim no capítulo 3 tentou-se realizar o nocaute de dois genes essenciais ao processo de esporulação a fim de se obter uma linhagem do RZ2MS9 deficiente para este processo. O que permitiria uma análise mais profunda do impacto do processo de esporulação da bactéria na sua atividade como promotora de crescimento de plantas.

Referências

- ALMEIDA, Jaqueline Raquel de *et al.* *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **Environmental Microbiology Reports**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 812-821, 25 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.13004>.
- ALOO, B.N.; MAKUMBA, B.A.; MBEGA, E.R.. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 219, p. 26-39, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>.
- ANICETO, Rafael Martins. **Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2017.tde-06012017-155312>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- ARMADA, E. *et al.* Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. **Journal Of Plant Physiology**, [S.L.], v. 192, p. 1-12, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.11.007>.
- AZIZOGLU, Ugur. *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of bt. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 76, n. 11, p. 1379-1385, 17 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>.

- BATISTA, Bruna Durante *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 206, p. 33-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- BATISTA, Bruna Durante *et al.* The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 203, n. 7, p. 3869-3882, 19 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02361-z>.
- BLAKE, Christopher; CHRISTENSEN, Mathilde Nordgaard; KOVÁCS, Ákos T.. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 15-25, jan. 2021. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-08-20-0225-cr>.
- DENG, Chao *et al.* Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 2194-2209, 23 jul. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6072194>.
- FIGUEREDO, Everthon Fernandes *et al.* The key role of indole-3-acetic acid biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 in promoting maize growth revealed by the ipdC gene knockout mediated by the CRISPR-Cas9 system. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 266, p. 127218, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127218>.
- HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD ALLAH, Elsayed Fathi. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1291-1297, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.
- HIGGINS, Douglas; DWORKIN, Jonathan. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 131-148, jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>.
- LECCA, Paola *et al.* Time Series Analysis of the *Bacillus subtilis* Sporulation Network Reveals Low Dimensional Chaotic Dynamics. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, 7 nov. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01760>.
- LONGATTO, Daniel Prezotto. **New insights into Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 biology: entomopathogenic activity and molecular interaction with *Zea mays* L.** 2020. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.11.2020.tde-23032020-143407>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- O'CALLAGHAN, Maureen; BALLARD, Ross A.; WRIGHT, David. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: limitations and opportunities. **Soil Use And Management**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 1340-1369, 9 maio 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/sum.12811>.
- OLIVEIRA, Helena Gutierrez. **Effects of *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 on soybean (*Glycine max*) considering volatile organic compounds, plant development in the field, and soil microbiome diversity.** 2021. 94 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.64.2021.tde-28092022-140007>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- PALMA, Leopoldo *et al.* *Bacillus thuringiensis* Toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 11 dez. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6123296>.

- RADDADI, Noura et al. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 481-494, dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03175344>.
- RADDADI, Noura et al. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 47-52, mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03179444>.
- TSCHOEKE, Bruno Augusto Prohmann. **Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho**. 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2016.tde-05072016-160308>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- TSOTETSI, Teboho et al. *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: what have we learned?. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 19, p. 2482, 22 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11192482>.
- VIDAL-QUIST, J. Cristian et al. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 474- 489, 25 jul. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12175>.
- ZHANG, Kang; DUAN, Xuguo; WU, Jing. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, 16 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27943>.

2. *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, EFEITOS DO MODO DE APLICAÇÃO, ADUBAÇÃO FOSFATADA E TIPO DE INÓCULO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO EM MILHO

Resumo

Bacillus thuringiensis RZ2MS9 é uma bactéria promotora do crescimento de plantas já bastante estudada em relação as suas habilidades de promover o crescimento de plantas. Os experimentos visando avaliar essa habilidade foram rotineiramente feitos através de bacterização das sementes com as células vegetativas desse *Bacillus* de forma bastante padronizada. Não tendo sido avaliados outros fatores que possam interferir na ação dessa bactéria como o modo de aplicação ou o tipo de inóculo. O modo de aplicação é um fator importante na aplicação de um produto biológico em campo, com algumas bactérias apresentando diferenças significativas entre as aplicações direto na semente ou no sulco de plantio. Além disso sendo o RZ2MS9 um *Bacillus* existe uma predileção pela formulação de produtos biológicos com os endósporos desse gênero de bactérias em vez de suas células vegetativas. Nos ensaios realizados não foram observadas diferenças consistentes ente as aplicações no sulco de plantio ou na semente, para os efeitos de promoção de crescimento do RZ2MS9 em milho. Sendo somente observado o efeito atípico de redução de crescimento do milho quando combinada a adubação fosfatada com a inoculação, com essa redução sendo atenuada a medida que se aumentava a concentração do RZ2MS9 aplicada. Com relação ao tipo de inóculo foi observada uma tendencia de uma maior quantidade das variáveis analisadas apresentarem resultados estatisticamente superiores ao controle quando o RZ2MS9 foi aplicado na forma vegetativa. Os resultados de crescimento observados se concentraram consistentemente nos parâmetros radiculares, muitas vezes sem alterações da massa seca de raízes, indicando uma alteração da arquitetura do sistema radicular como o principal efeito da bactéria. Os resultados aqui encontrados reforçam outros resultados de promoção de crescimento já realizados com o RZ2MS9 e fornecem informações de como os procedimentos realizados para a aplicação e plantio podem afetar a eficiência de ação dessa bactéria.

Palavras Chave: Inoculantes; Modo de aplicação; Esporulação; Bacillus

2.1. Introdução

O uso de inoculantes na agricultura é uma pratica que vem crescendo largamente nos últimos anos em função das pressões para o aumento da sustentabilidade das práticas agrícolas. Esses usos podem se destinar aos mais diversos fins, desde aumentar a eficiência da adubação, maior resistência a patógenos, promoção do crescimento vegetal, dentre outras funções. Nessa perspectiva, o uso e desenvolvimento de inoculantes apresenta enormes potenciais, ao mesmo tempo os atuais estudos a respeito do assunto também apresentam grandes limitações (O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022). São incipientes os ensaios que avaliam detalhadamente os efeitos atribuídos as bactérias comercializadas como inoculantes, sendo poucos os inoculantes que possuem estudos robustos a respeito de seus efeitos, com destaque para os rizóbios em leguminosas. Mesmo para esses casos, há significativas variações de resultados entre os estudos, em alguns casos, a aplicação desses produtos não leva a ganhos reais de produtividade, sendo umas das principais razões a presença da comunidade de rizóbios já preestabelecia no solo por cultivos anteriores fazendo com que novas inoculações possam eventualmente ser desnecessárias (VIEIRA NETO et al., 2008; CAMPO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2018; O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022).

Apesar dos rizóbios formarem o grupo mais consolidado quanto ao uso como inoculantes quando observamos a lista de registros de inoculantes no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (CFIC, 2023) observamos a predominância de outros grupos de microrganismos (Figura 1), como *Azospirillum* e os *Bacillus*.

Azospirillum são muito aplicados por serem eficientes bactérias fixadora de nitrogênio de vida livre. Já *Bacillus*, são aplicados pela sua conhecida capacidade de produção e secreção de metabólitos, que associado à capacidade desse gênero de produzir endósporos fazem com que esse grupo de bactérias seja de grande interesse para formulação de produtos a base de microrganismos, não somente inoculantes, mas também biodefensivos (Figura 1).

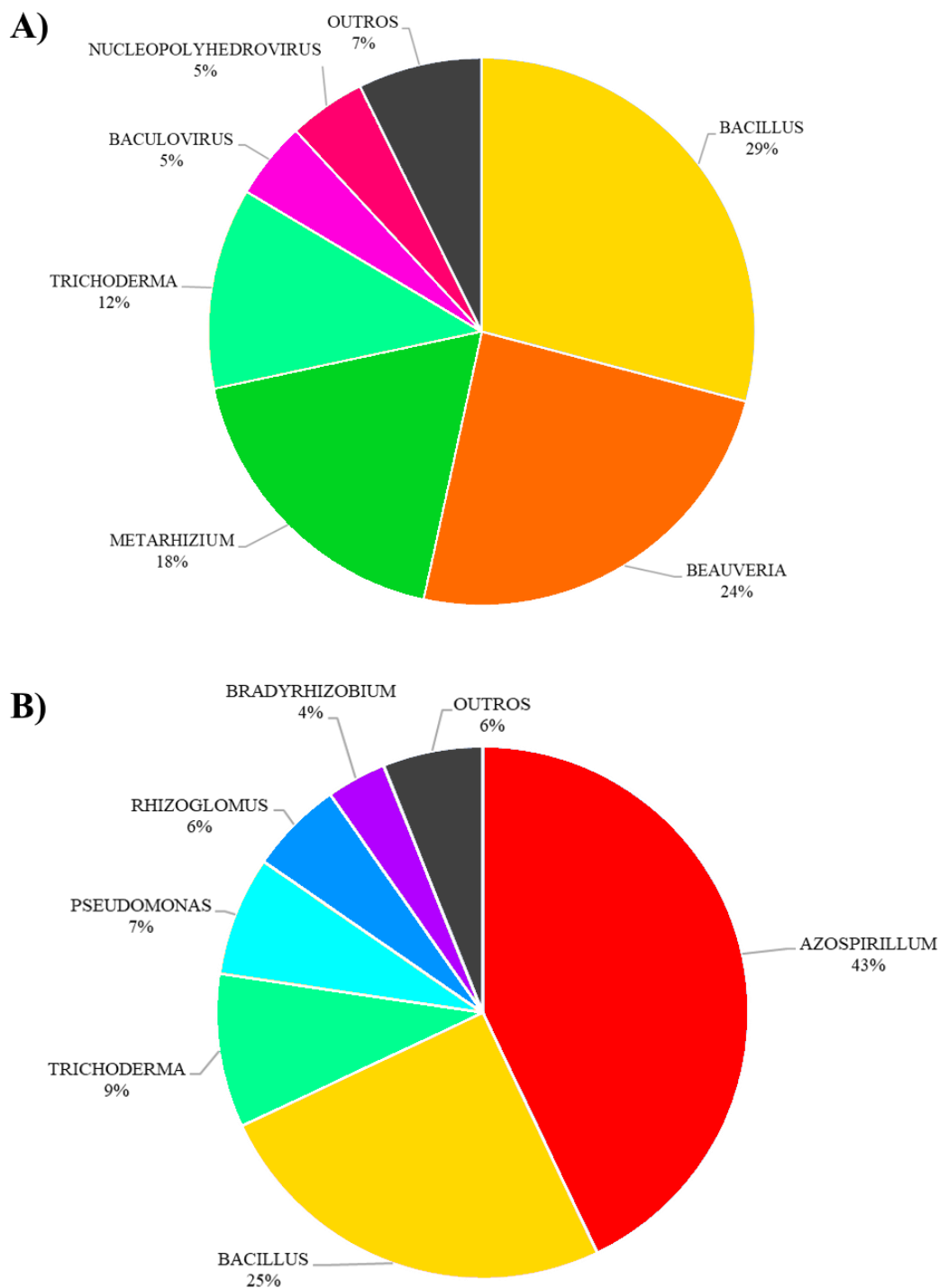


Figura 1. Distribuição percentual dos registros de produtos biológicos para a agricultura por gênero dos microrganismos registrados como matéria prima. A) Distribuição dos registros de pesticidas microbiológicos (MAPA, 2023). B) Distribuição dos registros de inoculantes agrícolas (CFIC, 2023).

Bacillus produzem muitos diferentes compostos que promovem o crescimento de plantas de forma direta e indireta, entre eles podem ser citadas enzimas, fitormônios, antibióticos, solubilizadores de nutrientes, indutores de

resistência e sideróforos (HASHEM; TABASSUM; ABD ALLAH, 2019; BLAKE; CHRISTENSEN; KOVÁCS, 2021; TSOTETSI et al., 2022) Compostos estes que conferem grande versatilidade a esse gênero de bactérias em suas possibilidades de aplicação. Concomitantemente, a capacidade de esporulação também confere, por meio dos endósporos, aos *Bacillus* a capacidade de resistirem as mais adversas condições ambientais. Facilitando a formulação, aplicação e aumentando o tempo de prateleira e a sobrevivência no ambiente de produtos formulados com *Bacillus* (HASHEM; TABASSUM; ABD ALLAH, 2019; TSOTETSI et al., 2022). Entretanto, muitos dos mecanismos de ação dos *Bacillus* ao interagirem com plantas ainda são pouco elucidados, principalmente com relação aos mecanismos de promoção de crescimento exercidos por isolados desse gênero, havendo muitas inconsistências entre os resultados obtidos a campo e nos ensaios de laboratório (TSOTETSI et al., 2022).

A observação de efeitos decorrentes da inoculação de microrganismos é algo bastante complexo, a começar a bactéria inoculada deve ter a capacidade de se estabelecer, mesmo que temporariamente, dentro da comunidade já pré existente no ambiente (O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022). Nesse primeiro aspecto o não estabelecimento de uma comunidade adequada pode impedir que as bactérias do inoculante realizem a função desejada. Ao mesmo tempo os efeitos deixados por elas podem persistir para além das mesmas no ambiente, por exemplo podendo ser observadas mudanças permanentes na microbiota após a aplicação de alguns inoculantes, para além do período de detecção do mesmo no campo (O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022).

A permanência de linhagens inoculadas no solo geralmente dura algumas semanas a alguns meses sendo também um desafio para a melhora da eficácia dos inoculantes (O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022). Os *Bacillus* apresentam o diferencial da esporulação, frequentemente descrito como uma habilidade trunfo, que convenientemente permitiria a bactéria se proteger de condições ambientais adversas ao mesmo tempo que frequentemente é dado que esses endósporos certamente germinaram quando necessário para promover sua ação nas culturas agrícolas de interesse, não tendo sido encontrados trabalhos demonstrando isso experimentalmente.

O impacto da habilidade de esporulação ou do estado em que os *Bacillus* estão sendo aplicados nas plantas quase não é abordado em grande parte dos estudos realizados (Anexo A). A maioria dos estudos a respeito da inoculação de *Bacillus* para as mais diversas espécies de plantas, não menciona o estado em que essas bactérias estão sendo aplicadas. Essas menções quase que se restringem à ensaios relacionados a produção dessas bactérias, onde observa-se um padrão de aplicação dos *Bacillus* testados na forma de endósporos. Onde grande parte dos produtos menciona que suas formulações são a base de endósporos das bactérias (Anexo B). Entretanto, na maioria dos estudos realizados quanto ao efeito de promoção de crescimento vegetal por *Bacillus*, não há referências quanto ao estado do inóculo, endósporo ou vegetativo (Anexo A). Pelo tempo de crescimento informado (geralmente não mais que 24 h) em uma parcela considerável dos estudos, principalmente em estudos preliminares, é possível inferir que aplica-se os *Bacillus* em seu estado vegetativo. Também havendo uma grande falta de padronização dos métodos de inoculação das plantas, havendo variações no local de aplicação (solo ou semente) e nas concentrações de células aplicadas (Anexo A).

Observando toda essa variação de metodologias aplicadas nos estudos a respeito de inoculantes, espera-se que haja uma grande variação entre os resultados observados. Nesse contexto o presente trabalho se propõe a avaliar se as diferentes formas de aplicação interferem nos resultados de promoção de crescimento da linhagem *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9. Esta linhagem foi isolada do guaranazeiro e apresentou um promissor potencial de promoção de crescimento de milho e soja (BATISTA et al., 2018), sendo objeto de vários estudos por parte da equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”. Onde padronizou-se a inoculação nas sementes com uma suspensão de células frescas, muito provavelmente células vegetativas (BATISTA et al., 2018; FIGUEREDO et

al., 2023; BATISTA et al., 2021; ALMEIDA et al., 2021; LONGATTO, 2020; OLIVEIRA, 2021; ANICETO, 2016; TSCHOEKE, 2016). Além disso tendo o RZ2MS9 a capacidade de solubilizar fósforo também se observou como a aplicação de adubação fosfatada altera a atividade de promoção de crescimento dessa bactéria.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Linhagens e condições de crescimento

Para os ensaios foi utilizado a linhagem bacteriana *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 (BATISTA et al., 2018), crescido a partir de um estoque em -80 °C em placas de meio de cultura LB (10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl e 5 g/l de extrato de levedura) a 28 °C. Também foi utilizado do produto comercial BiomaPhos® como controle do ensaio de efeito do fósforo (seguindo as instruções de aplicação e armazenagem contidas na bula do produto), este produto é formulado a partir das linhagens *Priestia megaterium* BRM 119 (antigo *Bacillus megaterium*) e *Bacillus subtilis* BRM 2084.

2.2.2. Desinfestação das sementes de milho

Foi utilizado o híbrido de milho SHS 7930 pró 2 da Santa Helena Sementes cedido Eng. Agr. Emerson. As sementes de milho usadas nos ensaios de promoção de crescimento foram previamente desinfestadas antes da inoculação com a linhagem RZ2MS9. As sementes foram inicialmente imersas em solução de hipoclorito de sódio 2 % por 5 min e submetidas a uma leve agitação intermitente. Em seguida as sementes foram imersas em etanol 70 % por 1 min também sob leve agitação, sendo essa lavagem em etanol repetida 2 vezes. Ao final as sementes foram lavadas 3 vezes com água deionizada autoclavada e espalhadas sobre papel Germitest autoclavado. Uma vez secas as sementes foram colocadas em tubos tipo Falcon (50 ml) e acondicionadas a 4 °C até a realização dos ensaios de promoção de crescimento.

2.2.3. Curva de esporulação do RZ2MS9 em LB

Para a curva de esporulação o RZ2MS9 foi crescido em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio LB suplementado com 1 ml/l de sais CCY (GLADSTONE; FILDES., 1940) (6,8 g/l de ZnCl, 101,6 g/l de MgCl₂.6H₂O, 1,96 g/l de MnCl₂.6H₂O, 29,4 g/l CaCl₂.2H₂O, 13,5 g/l de FeCl₃.6H₂O e 10ml/l de HCl 32%) a 28°C a uma agitação de 180 rpm.

A avaliação das concentrações de endósporos e células totais foi realizada a cada 12 h, até 216 h de crescimento, por meio de plaqueamento utilizando um protocolo por Buhr, McPherson e Gutting (2008) com modificações. Para cada tempo avaliado foram retiradas 2 alíquotas de 1 ml, uma para quantificação de endósporos e outra para células totais. Para quantificação dos endósporos, a alíquota foi tratada termicamente a 80°C por 20 min e depois resfriada em gelo por 1 min para morte das células vegetativas. A alíquota então foi submetida à uma diluição seriada em PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄, pH 7,4) seguida de plaqueamento em LB para contagem da quantidade de endósporos. Já a quantidade de células totais foi obtida simplesmente

submetendo à outra alíquota a diluição seriada e plaqueamento para contagem do total de células (endósporos e células vegetativas). O ensaio foi realizado em quadruplicada.

2.2.4. Ensaio de promoção de crescimento

2.2.4.1. Ensaio 1 – Efeito da forma de aplicação de RZ2MS9

Para o primeiro ensaio de promoção de crescimento realizado montou-se um experimento em casa de vegetação com delineamento casualizado em blocos no esquema fatorial. Foram avaliados 2 fatores com 2 níveis cada um, conforme descrito na tabela 2, em 4 blocos (com cada bloco sendo composto de 2 vasos por tratamento).

Tabela 2. Variáveis do ensaio 1 de promoção de crescimento (Efeito da aplicação de RZ2MS9)

Fatores	Tratamentos
Inoculação	Controle *
	RZ2MS9 10 ⁷ UFC/ml
Forma de aplicação	Aplicação na semente
	Aplicação na cova de plantio

*Utilizou-se meio de cultura LB suplementado com 1 ml/l de sais CCY e diluído com PBS como controle.

A linhagem RZ2MS9 foi crescida em meio LB por 24 h em Erlenmeyers de 250 ml com 100 ml de meio de cultura a uma temperatura de 28 °C e agitação de 180 rpm. Para produção da solução de inoculação, a linhagem RZ2MS9 crescida foi diluída em solução tampão PBS para uma densidade ótica, a 600nm de comprimento de onda, (OD_{600nm}) calculada de 0,1 (equivalente a 10⁷ UFC/ml). Para a solução controle utilizou-se o meio LB diluído em PBS na mesma proporção do inóculo bacteriano. Para bacterização de sementes, as mesmas foram adicionadas à solução de inoculação em uma dosagem de 0,1 ml por semente e agitadas para o máximo contado entre as sementes e o inóculo. Já para inoculação no sulco aplicou-se 0,1 ml da solução de inoculação sobre a semente já no sulco de plantio. A concentração do inóculo foi posteriormente confirmada por plaqueamento.

As sementes foram plantadas em vasos contendo 8 l de uma mistura de substrato comercial BRASPLAT BASE® e areia na proporção 1:1, sendo plantadas 5 sementes por vaso. Após 1 semana do plantio foi realizado o desbaste das plântulas, mantendo-se uma planta por vaso. Não foram realizados tratamentos fitossanitários para combate de possíveis patógenos e pragas.

As plantas foram amostradas no estádio de V4, sendo coletada uma planta por bloco para pesagem da massa seca da parte aérea e das raízes. As plantas restantes foram amostardas em V6, sendo mensurada as massas secas (raiz e parte aérea) e das dimensões do sistema radicular através do escaneamento das raízes e análise das imagens pelo programa WinRHIZO Arabidopsis®. Sendo nesse último avaliado o diâmetro médio das raízes e as medidas de comprimento, área superficial, área projetada e volume tanto totais como divididas por classe de diâmetro das raízes (Raízes com menos de 0,5mm, entre 0,5 e 1,0mm, entre 1,0 e 1,5mm, entre 1,5 a 2,0mm, entre 2,0 a 2,5mm, entre 2,5 a 3,0mm, entre 3,0 a 3,5 mm, entre 3,5 a 4,0 mm, entre 4,0 a 4,5 mm e entre 4,5 e 5,0 mm de diâmetro). Para a medição da massa seca as amostras vegetais foram mantidas em estufa a 65°C até terem atingido peso constante.

2.2.4.2. Ensaio 2 – Efeito do fósforo

Para o segundo ensaio de promoção de crescimento do milho foi montado um ensaio de casa de vegetação com delineamento casualizado em blocos no esquema fatorial visando avaliar o efeito da adubação, em especial da adubação fosfatada dado que a linhagem RZ2MS9 apresenta a capacidade de solubilizar fósforo inorgânico, no efeito de promoção de crescimento desta linhagem em milho. Foram avaliados 2 fatores com diferentes níveis cada um variando adubação fosfatada e inóculo aplicado, conforme descrito na tabela 3, em 4 blocos (com cada bloco sendo composto de 1 vaso por tratamento).

Tabela 3. Variáveis do ensaio 2 de promoção de crescimento (Efeito do fósforo)

Fatores	Tratamentos
Adubação	100% da dose de fósforo
	0% da dose de fósforo
Inoculação	Controle*
	RZ2MS9 10 ⁸ UFC/ml
	RZ2MS9 10 ⁷ UFC/ml
	RZ2MS9 10 ⁶ UFC/ml
	BiomaPhos®

*Utilizou-se meio de cultura LB suplementado com 1 ml/l de sais CCY e diluído com PBS como controle.

A linhagem RZ2MS9 foi crescida em meio LB por 24 h em Erlenmeyers de 250 ml com 100 ml de meio de cultura a uma temperatura de 28°C e agitação de 180 rpm. Para produção da solução de inoculação, a linhagem RZ2MS9 crescida foi diluída em PBS para as OD_{600nm} calculadas de 1,0, 0,1 e 0,01 (respectivamente equivalente a 10⁸, 10⁷, 10⁶ UFC/ml). Para a solução controle utilizou-se o meio LB diluído em PBS na mesma proporção do inóculo bacteriano de OD_{600nm} 1,0. Para solução de inoculação do BiomaPhos® este foi diluído em PBS de forma que o volume de inóculo por semente estabelecido (0,1ml por semente) carregue o mesmo volume de produto indicado na bula do mesmo (1,7 ul por semente). Para a inoculação foi adicionado a solução de inoculação nas sementes, na dosagem de 0,1ml por semente, que em seguida foram vigorosamente agitadas antes de serem plantadas nos vasos. As concentrações dos inóculos foram posteriormente confirmadas por plaqueamento.

As sementes foram plantadas em vasos contendo 8 l de uma mistura de solo e areia, na proporção de 1:1, sendo plantadas 5 sementes por vaso. O solo foi coletado na área experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) em um talhão (22,7077 S; 47,6378 O) com largo histórico de cultivo sucessivo de milho (pelo menos 15 anos de cultivo sucessivo), sem rotação de cultura e com manejo convencional do solo. A mistura de solo e areia foi enviada para análise de solo para o Laboratório de Análises Químicas do Solo da ESALQ-USP (Tabela 4). As interpretações descritas nessa tabela foram feitas de acordo com as circulares técnicas Sousa et al. (2016) e Coelho (2006), as mesmas que basearam as recomendações de adubação realizadas (Tabela 5). Não foram realizados tratamentos fitossanitários para combate de possíveis patógenos e pragas.

Tabela 4. Características físico-químicas do solo utilizado no experimento de efeito do fósforo

Determinação	Resultado	Interpretação
Ca	30,5 mmol _c /dm ³	
Mg	19,7 mmol _c /dm ³	Adequado
CTC	65,3 mmol _c /dm ³	
V%	82 %	Adequado
m%	0 %	Adequado
pH	6,41	Adequado
Matéria Orgânica	12,7 g/dm ³	
P	36,2 mg/dm ³	Muito Alto
K	3,18 mmol _c /dm ³	Alto
S	11,4 mg/dm ³	Alto
B	<0,12 mg/dm ³	Baixo
Cu	1,5 mg/dm ³	Médio
Fe	12,1 mg/dm ³	Alto
Mn	24,6 mg/dm ³	Alto
Zn	4 mg/dm ³	Alto
Areia Total	76,7 %	
Silte	5,8 %	
Argila	17,5 %	

Tabela 5. Recomendação de adubação

Nutriente	Recomendação	Aplicação por planta*	
		100% da dose de P	0% da dose de P
N	30 Kg/ha	0,91g uréia (0,4g de N)	0,91g uréia (0,4g de N)
P	100Kg/ha	7,41g SPS (1,3g de P ₂ O ₅)	-
K	60Kg/ha	1,38g KCl (0,8g de K ₂ O)	1,38g KCl (0,8g de K ₂ O)
B	1 Kg/ha	0,078g H ₃ BO ₃ (0,013g de B)	0,078g H ₃ BO ₃ (0,013g de B)
TOTAL		9,78g do formulado	2,37g do formulado

*Cálculos feitos adotando uma densidade média de 75.000 plantas/ha, e as concentrações de nutrientes nos adubos utilizados de 44% de N, 18% de P, 58% de K e 17% de B respectivamente para uréia, super fosfato simples (SPS), cloreto do potássio (KCl) e ácido bórico (H₃BO₃).

A formulação calculada foi pesada e moída para uma melhor homogeneização dos componentes. A aplicação foi realizada logo após o plantio, espalhando o pó por sobre o solo do vaso considerando a configuração final de 1 planta por vaso, sendo os vasos mantidos sob irrigação diária por gotejamento (aplicação de 0,5 l de água por dia por vaso ao longo de 4 aplicações). Após 1 semana de plantio foi realizado a avaliação da germinação e posterior desbaste deixando uma planta por vaso.

As plantas foram amostradas em V6. Foram mensurados os parâmetros: altura, índice SPAD (medido na porção mediana da última folha expandida do milho) e posterior coleta para medição das massas secas (raiz e parte aérea) e das dimensões do sistema radicular através do escaneamento das raízes e análise das imagens pelo programa WinRHIZO Arabidopsis®. Sendo nesse último avaliado o diâmetro médio das raízes, ramificação das raízes (número de pontas) e as medidas de comprimento, área superficial, área projetada e volume tanto totais como divididas por classe de diâmetro das raízes (Raízes com menos de 0,5mm, entre 0,5 e 1,0mm, entre 1,0 e 1,5mm, entre 1,5 a 2,0mm, entre 2,0 a 2,5mm, entre 2,5 a 3,0mm, entre 3,0 a 3,5 mm, entre 3,5 a 4,0 mm, entre 4,0 a 4,5 mm e entre 4,5 e 5,0 mm de diâmetro). Para medição da massa seca as amostras vegetais foram mantidas em estufa a 65°C até terem atingido peso constante.

2.2.4.3. Ensaio 3 – Efeito da forma de aplicação e tipo de inóculo

O terceiro ensaio de promoção de crescimento do milho, visando avaliar o efeito da forma de aplicação (na cova de plantio, na semente ou no sulco com reaplicação via foliar) e do tipo de inóculo (se vegetativo ou esporulado), foi realizado em casa de vegetação com delineamento casualizado em blocos sendo avaliado tanto a forma de aplicação quanto o tipo de inóculo utilizado, conforme descrito na tabela 6, totalizando 9 tratamentos mais um controle. Esses tratamentos foram organizados em 7 blocos cada um composto por 1 vaso por tratamento.

Tabela 6. Variáveis do ensaio 3 de promoção de crescimento (Efeito da forma de aplicação e tipo de inóculo)

Forma de aplicação	Tipo de inóculo	Tratamento
Aplicação na semente	RZ2MS9 em estado vegetativo	1
	RZ2MS9 em estado esporulado	2
	RZ2MS9 parcialmente esporulado	3
Aplicação na cova de plantio	RZ2MS9 em estado vegetativo	4
	RZ2MS9 em estado esporulado	5
	RZ2MS9 parcialmente esporulado	6
Aplicação na cova de plantio com reaplicação foliar	RZ2MS9 em estado vegetativo	7
	RZ2MS9 em estado esporulado	8
	RZ2MS9 parcialmente esporulado	9
Aplicação na semente	Meio de cultura LB + sais CCY (Controle)	10

A linhagem RZ2MS9 foi crescido em meio LB acrescido de 1 ml/l de sais CCY por em Erlenmeyers de 250 ml com 100 ml de meio de cultura a uma temperatura de 28°C e agitação de 180 rpm, sendo variado o tempo de crescimento para a obtenção dos diferentes inóculos. Para a obtenção de células vegetativas de RZ2MS9 o cultivo foi realizado por 24 h. Para obtenção de células parcialmente esporuladas de RZ2MS9 (aproximadamente 50% de endósporos e 50% de células vegetativas) o cultivo foi realizado por 156 h. Para obtenção de células totalmente esporuladas o cultivo foi realizado por 216h. A concentração dos inóculos foi ajustada para 10⁸ UFC/ml com tampão PBS para produção da solução de inoculação. Como controle, o meio LB foi diluído em PBS na mesma proporção do inóculo bacteriano vegetativo. Para bacterização das sementes, as mesmas foram adicionadas junto à solução de inoculação em uma dosagem de 0,1ml por semente e agitadas manualmente. Para inoculação no sulco aplicou-se 0,1 ml da solução de inoculação sobre a semente já no sulco de plantio. As reaplicações foliares por sua vez foram realizados borrifando-se 5ml da solução de inoculação sobre as folhas de milho, tendo ocorrido no estádio V4. A concentração dos inóculos foi posteriormente confirmada por plaqueamento.

As sementes foram plantadas em vasos contendo 20 l uma mistura de substrato comercial BRASPLAT BASE® e areia na proporção 2:1, sendo plantadas 5 sementes por vaso. Após 2 semanas do plantio foi realizado o desbaste das plântulas, restando uma planta por vaso. Durante a execução do ensaio foram realizadas 4 adubações, com adubo formulado comercial NPK + micronutrientes, 4 medições da altura e diâmetro das plantas (diâmetro do caule logo abaixo da primeira folha verdadeira), e uma medição do índice SPAD (medido na porção mediana da última folha expandida do milho) das folhas (Tabela 7). Não foram realizados tratamentos fitossanitários para combate de possíveis patógenos e pragas.

Tabela 7. Atividades realizadas no ensaio 3 de promoção de crescimento

Semanas de experimento	Estádio Fenológico	Atividade realizada	Descrição
0	-	Plantio	Plantio do milho e início do experimento
1	VE	Adubação	27,0 mg de N/vaso 21,6 mg de P ₂ O ₅ /vaso 36,0 mg de K ₂ O/vaso
		Desbaste	Desbaste das plantas mantendo-se uma planta por vaso
2	V3	Adubação	130 mg de N/vaso 50 mg de P ₂ O ₅ /vaso 130 mg de K ₂ O/vaso 0,6 mg de B/vaso 0,5 mg de Cu/vaso 2,2 mg de Fe/vaso 1 mg de Mn/vaso 0,05 mg de Mo/vaso 2 mg de Zn/vaso
		Inoculação foliar	Reinoculação foliar do RZ2MS9
		Adubação	130 mg de N/vaso 50 mg de P ₂ O ₅ /vaso 130 mg de K ₂ O/vaso 0,6 mg de B/vaso 0,5 mg de Cu/vaso 2,2 mg de Fe/vaso 1 mg de Mn/vaso 0,05 mg de Mo/vaso 2 mg de Zn/vaso
		Medição	Medição de altura e diâmetro das plantas
3	V4	Adubação	130 mg de N/vaso 50 mg de P ₂ O ₅ /vaso 130 mg de K ₂ O/vaso 0,6 mg de B/vaso 0,5 mg de Cu/vaso 2,2 mg de Fe/vaso 1 mg de Mn/vaso 0,05 mg de Mo/vaso 2 mg de Zn/vaso
		Medição	Medição de altura e diâmetro das plantas
		Adubação	130 mg de N/vaso 50 mg de P ₂ O ₅ /vaso 130 mg de K ₂ O/vaso 0,6 mg de B/vaso 0,5 mg de Cu/vaso 2,2 mg de Fe/vaso 1 mg de Mn/vaso 0,05 mg de Mo/vaso 2 mg de Zn/vaso
4	V6	Medição	Medição de altura e diâmetro das plantas
		Medição	Medição do índice SPAD, altura e diâmetro das plantas
5	V7	Medição	Medição de altura e diâmetro das plantas
6	V9	Finalização	Coleta de parte aérea e raízes para pesagem e medição do comprimento do sistema radicular do milho

O ensaio foi finalizado quando pelo menos 95% das plantas atingiram o estágio V9. Sendo tomadas as últimas medições altura e diâmetro, coletas as partes área e raízes para medição das raízes e massa e medidos os comprimentos das raízes (da base do caule rente ao solo até a ponta de raiz mais distante) para aferição da profundidade do sistema radicular. Para medição da massa as amostras vegetais foram mantidas em estufa a 65°C até terem atingido peso constante.

2.2.5. Análises estatísticas

A análise estatística dos ensaios foi realizada utilizando o programa R (versão 4.3.0). Foram realizados os testes (ANOVA, teste F e Scott Knott) para a análise de dados, sendo utilizado os pacotes Lattice (versão 0.21-8) e lmtest (versão 0.9-37) para avaliação das pressuposições da ANOVA e o pacote ScottKnott (versão 1.3-0) para realização dos testes de média. Os resultados foram primeiramente analisados quanto às pressuposições da ANOVA antes da realização da mesma a fim de se determinar como os dados seriam analisados (principalmente no caso de ensaios no esquema fatorial para determinar se os resultados para um mesmo fator seriam analisados juntos, em caso de efeito de interação não significativo, ou separados, para interação significativa entre os dois fatores). Sendo observada a diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (pela ANOVA e pelo teste F) foi realizado o teste de Scott Knott para agrupamento das médias estatisticamente iguais. Para todos os ensaios adotou-se um alfa de 5%. Os gráficos foram obtidos utilizando os softwares R e Excel (Office Home and Student 2019).

2.3. Resultados

Em relação aos efeitos da forma de aplicação da linhagem RZ2MS9 (ensaio 1) não foi observado efeito significativo de interação entre forma de aplicação e a inoculação com a linhagem RZ2MS9. Também não sendo observado efeito significativo do modo de aplicação com ambos, aplicação no sulco ou bacterização nas sementes, apresentando resultados estatisticamente iguais. Foi observado efeito significativo nas plantas coletadas em V6 sobre as variáveis de diâmetro das raízes e dimensões das raízes com diâmetro entre 1,5 e 2,0 mm (comprimento total, superfície radicular e volume) em função da inoculação (tabela 8), sendo o efeito de inoculação o único que apresentou diferenças estatisticamente significativas para este ensaio. Para as demais variáveis e efeitos os resultados foram estatisticamente iguais.

Tabela 8. Efeito da inoculação do RZ2MS9 sobre as raízes de milho

Inoculação	Diâmetro de Raízes (mm)	Dimensões das raízes entre 1,5-2,0mm de diâmetro		
		Comprimento total (cm)	Superfície radicular (cm ²)	Volume (cm ³)
RZ2MS9	0,473 a	888,43 a	468,39 a	19,77 a
Controle	0,447 b	594,46 b	311,51 b	13,08 b

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste F a 95% de confiança.

Apesar dos ganhos serem estatisticamente significativos somente para as raízes com classe de diâmetro entre 1,5 a 2,0mm, constatou-se uma consistente tendência de incremento do comprimento total das diferentes classes de raízes analisadas. A fim de se melhor visualizar esses dados os valores de comprimento radicular de cada classe de diâmetro foram divididos pelos respectivos comprimentos do tratamento controle, obtendo-se uma medida relativa do incremento de comprimento das raízes em função do tratamento e facilitando a visualização geral do efeito da bactéria sobre as diferentes classes de diâmetro das raízes (figura 2).

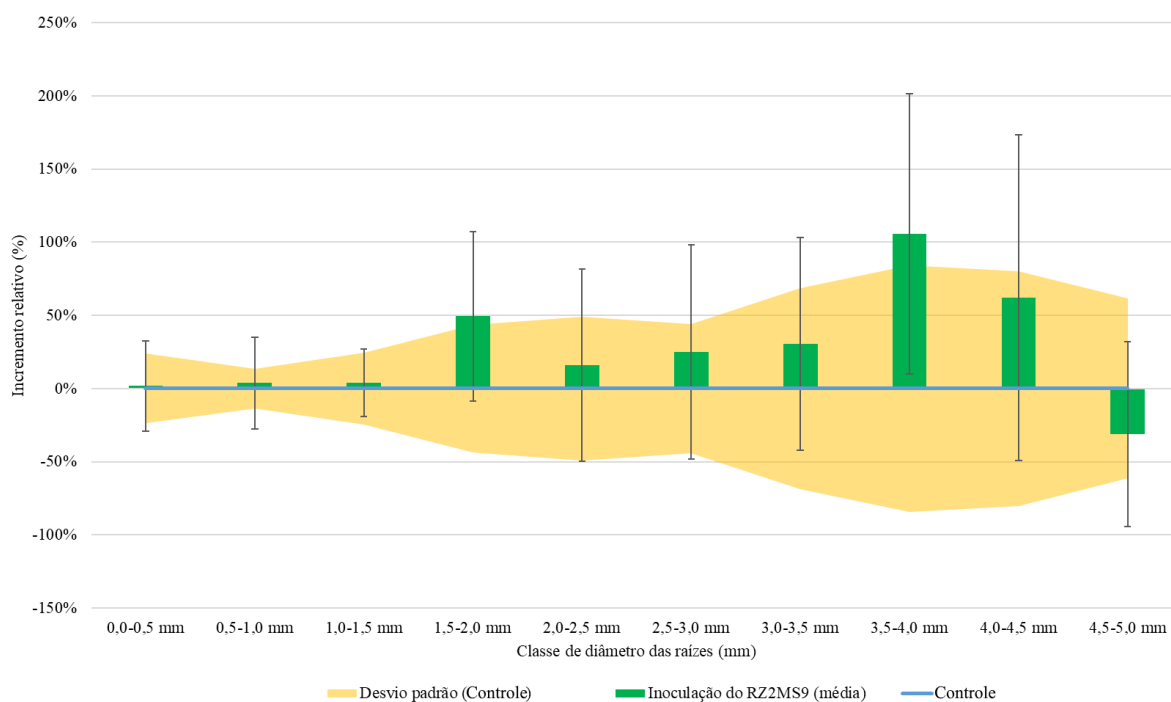


Figura 2. Efeito da inoculação do RZ2MS9 sobre o comprimento das diferentes classes de diâmetro de raízes analisadas. Barras indicam o incremento percentual médio obtido com a inoculação e a área pintada sinaliza o desvio padrão médio de variação percentual do tratamento controle com meio de cultura.

Em relação ao ensaio de efeito do fósforo observou-se uma baixa germinação das sementes, juntamente com o aparecimento de sintomas de podridão durante o desbaste das plantas (Figura 3). Foi observada uma maior severidade do ataque da doença nos tratamentos com inoculação das bactérias (Tabela 9). Não foi realizada a caracterização dos possíveis agentes causais dos sintomas observados.

Tabela 9. Taxa de germinação de sementes observada no ensaio 2 de promoção de crescimento

Inoculação	Dose de fósforo	
	100%	0%
RZ2MS9 a 10^8 UFC/ml	27,5%	10,0%
RZ2MS9 a 10^7 UFC/ml	15,0%	22,5%
RZ2MS9 a 10^6 UFC/ml	15,0%	12,5%
BioPhos	20,0%	17,5%
Controle	62,5%	55,0%

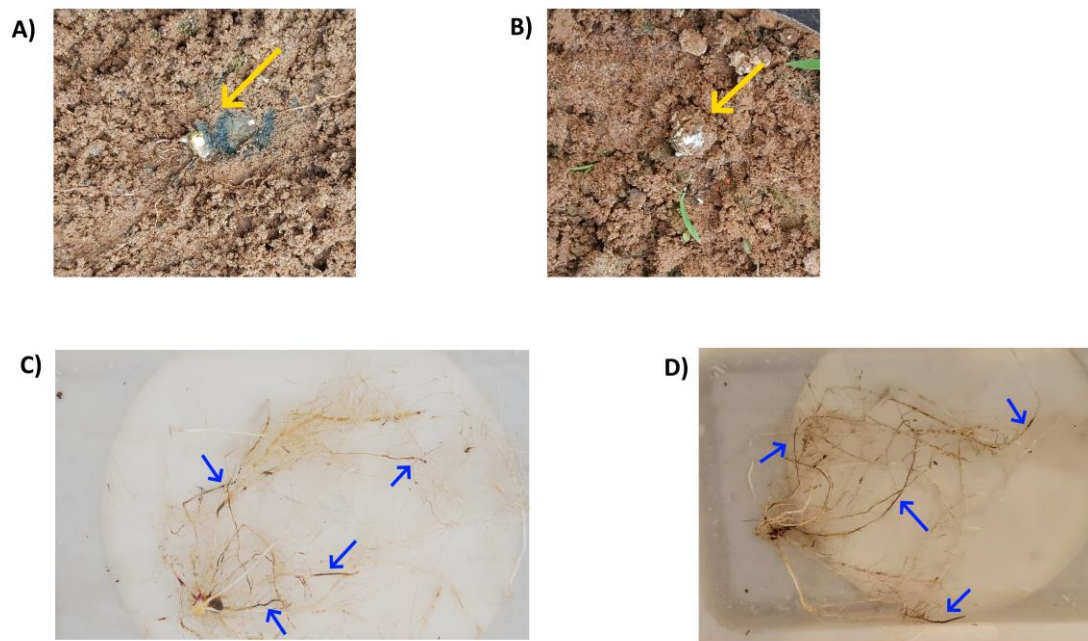


Figura 3. A e B) sementes de milho exibindo apodrecimento por fungos, apontado pelas setas amarelas. C e D) Raízes de milho, já durante a desmontagem do experimento exibindo sintomas de podridão radicular, evidenciados pelas setas azuis.

Observou-se a redução do crescimento das plântulas de milho inoculadas nos tratamentos que receberam a adubação fosfatada, com redução significativa de alguns dos parâmetros avaliados. Essa redução, entretanto, não foi observada nas plantas que não receberam fósforo na adubação.

Assim, observou-se também um efeito significativo de interação entre a aplicação de adubação da adubação fosfatada e a inoculação. Os dados foram analisados separadamente em função da adubação aplicada. As diferenças significativas em função da inoculação foram observadas somente nos tratamentos que receberam a adubação fosfatada e ocorreram nas medições de massa seca de raízes, índice SPAD, comprimento radicular total, concentração de fósforo foliar e nas dimensões de raízes com diâmetros menores de 0,5mm, entre 3,5 e 4,0mm e entre 4,0 e 4,5mm (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito da inoculação sobre o milho adubado com fósforo

		Inoculação				
		RZ2MS9 a 10 ⁸ UFC/ml	RZ2MS9 a 10 ⁷ UFC/ml	RZ2MS9 a 10 ⁶ UFC/ml	BiomaPhos	Controle
Índice SPAD		27,50 a	21,90 b	23,66 a	18,95 b	25,75 a
Massa seca de raiz (g)		0,90 b	0,79 b	0,77 b	0,62 b	1,48 a
Comprimento Radicular Total (cm)		3864,2 a	3158,46 a	1832,62 b	3465,06 a	3057,87 a
Concentração de fósforo foliar (g/kg)		2,50 a	2,72 a	2,62 a	2,83 a	2,08 b
Dimensões de raízes de diâmetro menor que 0,5mm	Comprimento Total (cm)	2769,01 a	2334,57 a	1259,49 b	2532,71 a	2093,33 a
	Superfície Radicular (cm ²)	210,04 a	169,19 a	96,77 b	189,68 a	158,52 a
	Area Projetada (cm ²)	66,86 a	53,85 a	30,80 b	60,38 a	50,46 a
	Volume (cm ³)	1,55 a	1,19 a	0,71 a	1,37 a	1,16 a
	Comprimento Total (cm)	2,70 b	3,31 b	3,98 b	5,42 b	9,84 a
Dimensões de raízes de diâmetro entre 3,5 a 4,0mm	Superfície Radicular (cm ²)	4,68 b	3,18 b	3,86 b	6,38 b	11,48 a
	Area Projetada (cm ²)	1,49 b	1,01 b	1,23 b	2,03 b	3,65 a
	Volume (cm ³)	0,44 b	0,36 b	0,30 b	0,60 b	1,07 a
	Comprimento Total (cm)	3,67 b	1,90 b	1,21 b	3,64 b	6,64 a
	Superfície Radicular (cm ²)	4,89 b	2,53 b	1,59 b	4,88 b	8,78 a
Dimensões de raízes de diâmetro entre 4,0 a 4,5mm	Area Projetada (cm ²)	1,56 b	0,80 b	0,51 b	1,55 b	2,79 a
	Volume (cm ³)	0,52 b	0,27 b	0,17 b	0,52 b	0,92 a

Letras iguais na mesma linha estão agrupadas juntas pelo teste scott knott a 95% de confiança

Compilando os resultados do ensaio de efeito do fósforo em função dos agrupamentos obtidos na análise estatística para o efeito de inoculação tem-se os resultados observados nas tabelas 11 e 12. Onde observa-se que de maneira geral a maioria das variáveis analisadas não diferiu do controle (tabela 11). Entretanto nas variáveis onde se observou diferenças estatísticas entre os tratamentos estas tendencialmente se apresentavam como uma redução dos parâmetros em relação ao controle, com o aumento da concentração do RZ2MS9 atenuando esse efeito deletério (tabela 12). Tendência também observada nos valores de incremento relativo do comprimento das diferentes classes de raízes (figura 4).

Tabela 11. Compilação dos resultados do ensaio de efeito do fósforo na promoção de crescimento de milho

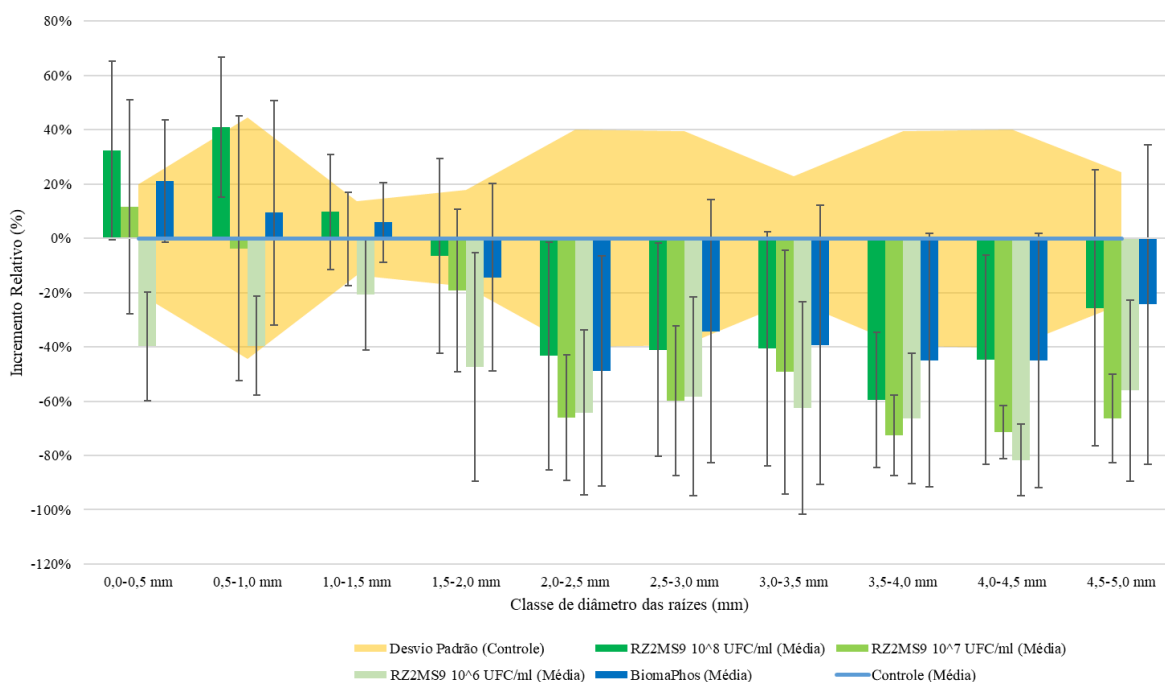
Inoculação	% de efeitos analisados que se agruparam*		
	Inferior ao controle	junto ao controle	Superior ao controle
RZ2MS9 a 10 ⁸ UFC/ml	17,65% (9)	80,39% (41)	01,96% (1)
RZ2MS9 a 10 ⁷ UFC/ml	19,61% (10)	78,43% (40)	01,96% (1)
RZ2MS9 a 10 ⁶ UFC/ml	25,49% (13)	72,55% (37)	01,96% (1)
BiomaPhos	19,61% (10)	78,43% (40)	01,96% (1)
Controle	00,00% (0)	100,0% (51)	00,00% (0)

*Agrupamento dos diferentes tratamentos do milho adubado com fósforo pelo teste de scott knott para todos os efeitos analisados independente de terem sido achadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F, ambos a 95% de confiança. Valores entre parênteses indicam o número absoluto de efeitos agrupados.

Tabela 12. Compilação dos resultados do ensaio de efeito do fósforo na promoção de crescimento em milho para as variáveis que apresentaram diferenças estatisticamente significativas

Inoculação	% de efeitos estatisticamente significativos que se agruparam*		
	Inferior ao controle	junto ao controle	Superior ao controle
RZ2MS9 a 10 ⁸ UFC/ml	60,00% (9)	33,33% (5)	06,67% (1)
RZ2MS9 a 10 ⁷ UFC/ml	66,66% (10)	26,67% (4)	06,67% (1)
RZ2MS9 a 10 ⁶ UFC/ml	86,66% (13)	06,67% (1)	06,67% (1)
BiomaPhos	66,66% (10)	26,67% (4)	06,67% (1)
Controle	00,00% (0)	100,0% (15)	00,00% (0)

* Agrupamento dos diferentes tratamentos do milho adubado com fósforo pelo teste de scott knott para todos os efeitos analisados onde foram achadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F, ambos a 95% de confiança. Valores entre parênteses indicam o número absoluto de efeitos agrupados.

**Figura 4.** Efeito da inoculação sobre o comprimento das diferentes classes de diâmetro de raízes analisadas. Barras indicam o incremento percentual médio obtido com a inoculação e a área pintada sinaliza o desvio padrão médio de variação percentual do tratamento controle com meio de cultura.

Já compilando-se resultados do ensaio de efeito do fósforo em função dos agrupamentos obtidos na análise estatística para o efeito de adubação observa-se que esta foi significativa para pelo menos 60% das variáveis analisadas (tabela 13). Com grande parte das variáveis apresentando aumentos estatisticamente significativos em função da adição de fosforo.

Tabela 13. Efeito da adubação fosfatada no ensaio 2 de promoção de crescimento

Inoculação	% de efeitos significativos com a adubação fosfatada*	% dos efeitos onde a adubação não fez efeito significativo**	
		Total	Excluindo onde houve efeito da inoculação
RZ2MS9 a 10 ⁸ UFC/ml	62,75% (32)	37,25% (19)	21,57% (11)
RZ2MS9 a 10 ⁷ UFC/ml	68,63% (35)	31,37% (16)	15,69% (8)
RZ2MS9 a 10 ⁶ UFC/ml	60,78% (31)	39,22% (20)	15,69% (8)
BiomaPhos	84,31% (43)	15,69% (8)	15,69% (8)
Controle	78,43% (40)	21,57% (11)	21,57% (11)

*Agrupamento dos diferentes tratamentos que tiveram efeitos significativos de incremento com a adição de fósforo na adubação do milho para o teste F a 95% de confiança. ** Agrupamento dos diferentes tratamentos onde não se observaram efeitos significativos de incremento com a adição de fósforo na adubação do milho para o teste F a 95% de confiança. Valores entre parênteses indicam o número absoluto de efeitos significativos.

Referente à curva de esporulação do RZ2MS9 em meio LB suplementado com sais CCY observou-se a formação de endósporos no meio de cultura já após 72 h de crescimento. Entretanto, a proporção de endósporos aferida pelo plaqueamento permaneceu inferior a 15% até 168 h de crescimento. Foi detectada a completa esporulação da bactéria após 192h de crescimento (Figura 5). A partir desse resultado adotou-se os tempos de crescimento de 24 h, 156 h e 216 h para obtenção dos inoculo vegetativos, em fase de transição e completamente esporulado, respectivamente.

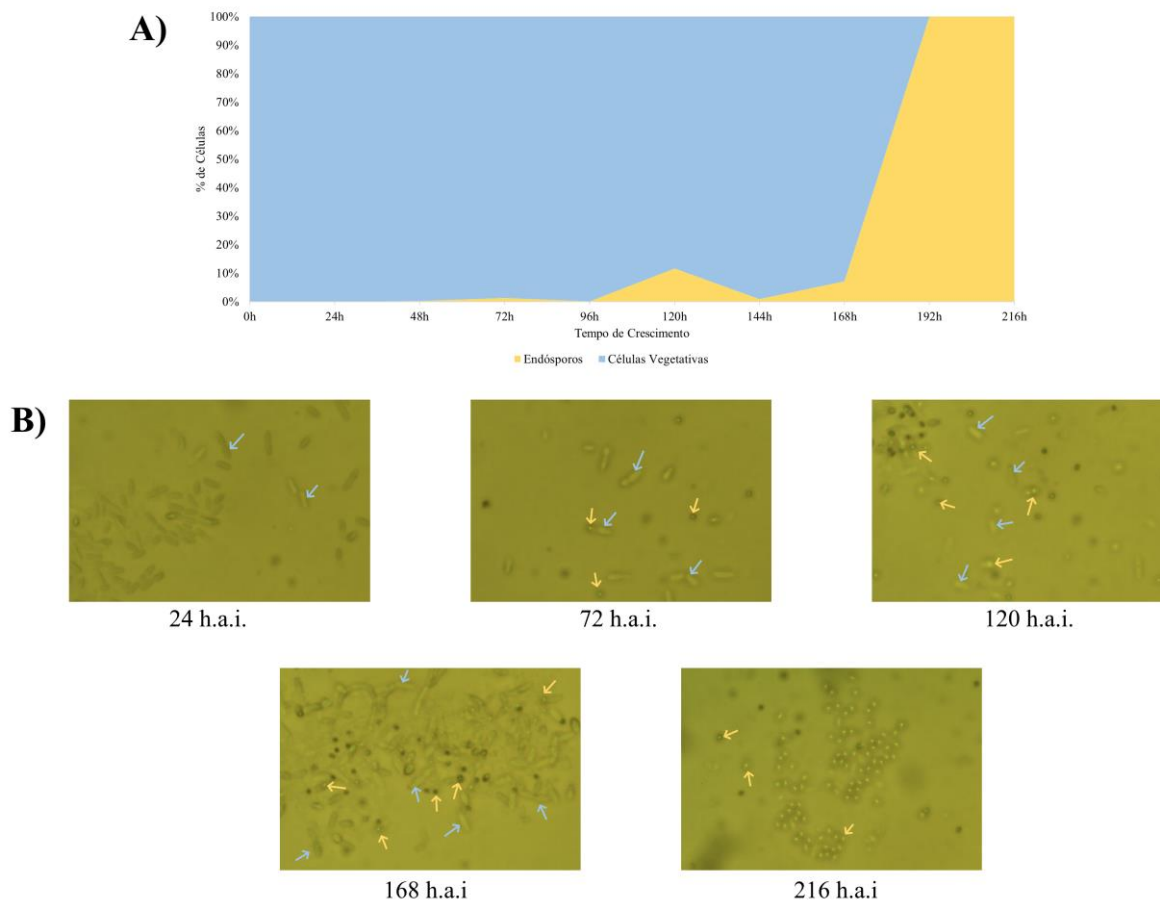


Figura 5. Curva de esporulação da linhagem RZ2MS9 em meio LB suplementado com sais CCY. A) Curva de esporulação do RZ2MS9 em meio LB suplementado com 1 ml/l da solução de sais CCY. B) Imagens do RZ2MS9 por microscopia de contraste de fase em 5 diferentes tempos de crescimento, setas azuis evidenciam células vegetativas e amarelas endósporos nas imagens.

Em relação ao efeito do tipo de inóculo e modo de aplicação (ensaio 3) na promoção de crescimento foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto aos parâmetros massa seca da parte aérea, profundidade do sistema radicular (Figuras 6 e 7), altura das plantas e diâmetro do colmo (tabelas 14 e 15).

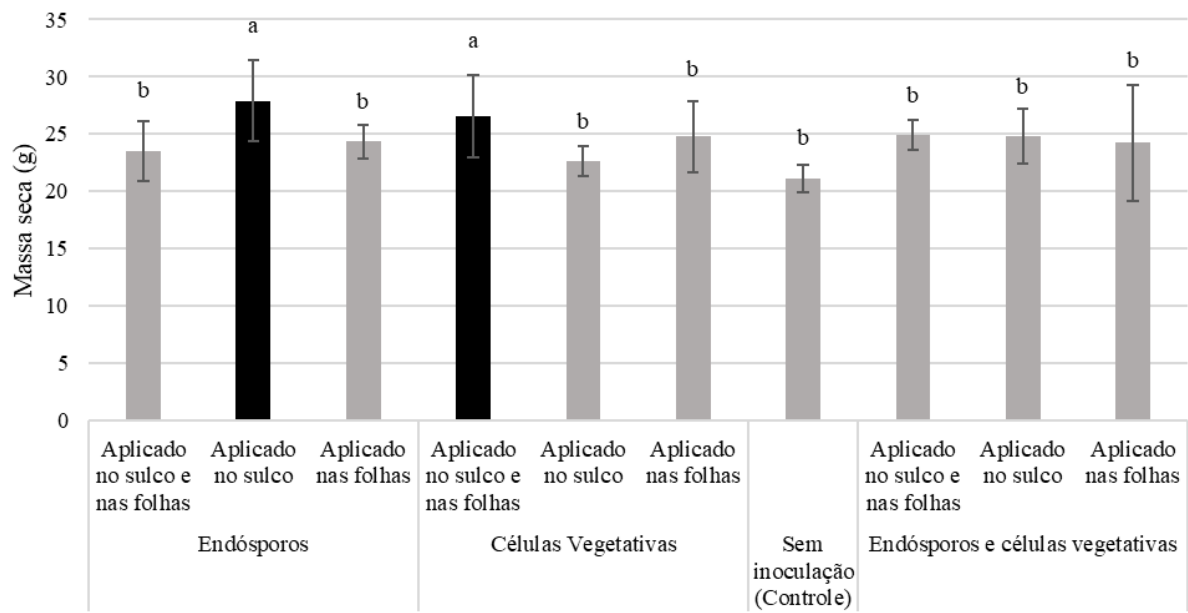


Figura 6. Efeito da inoculação sobre a massa seca da parte aérea do milho no estágio V9. Letras iguais estão agrupados juntos pelo teste Scott Knott a 95% de confiança.

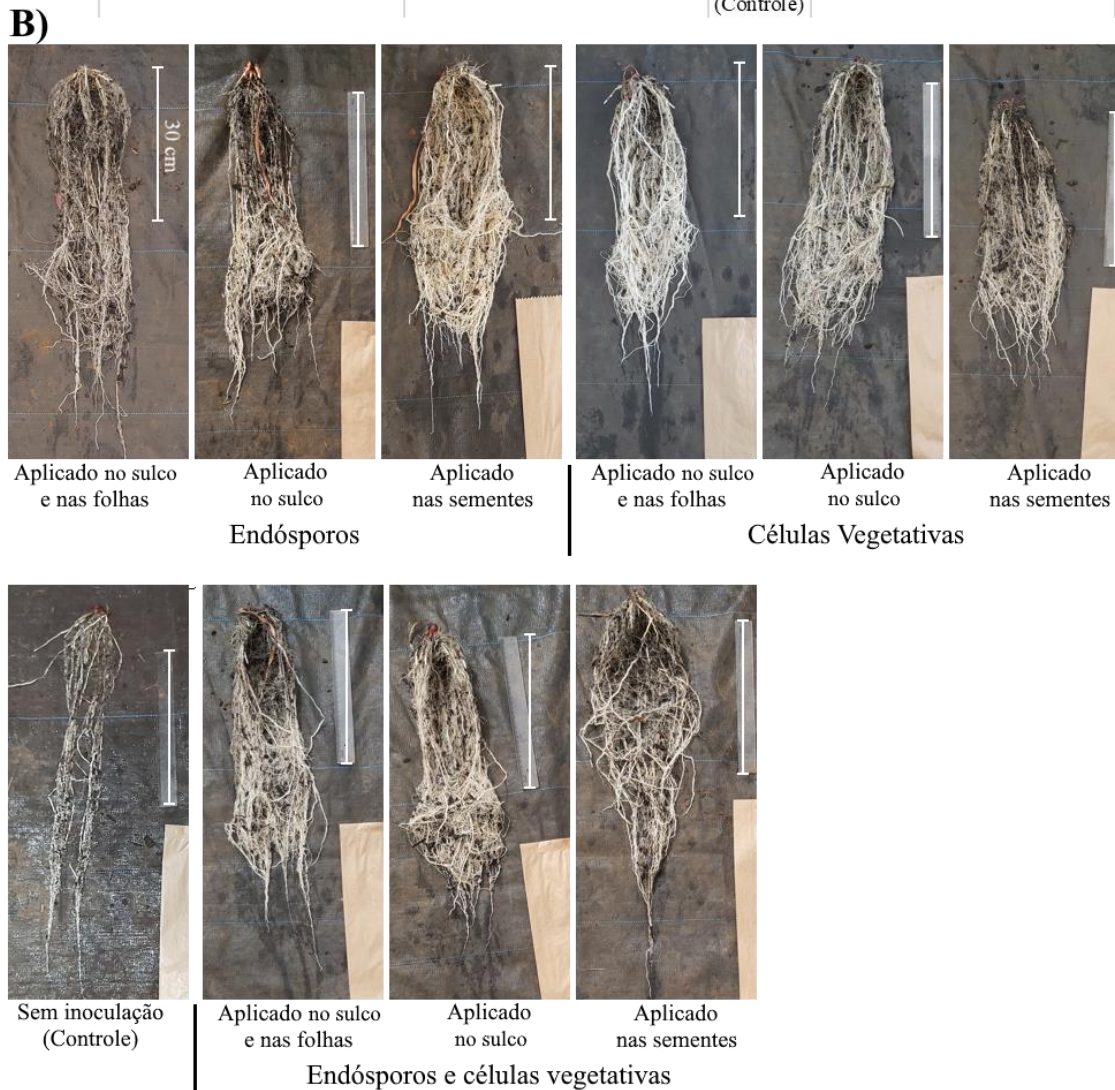
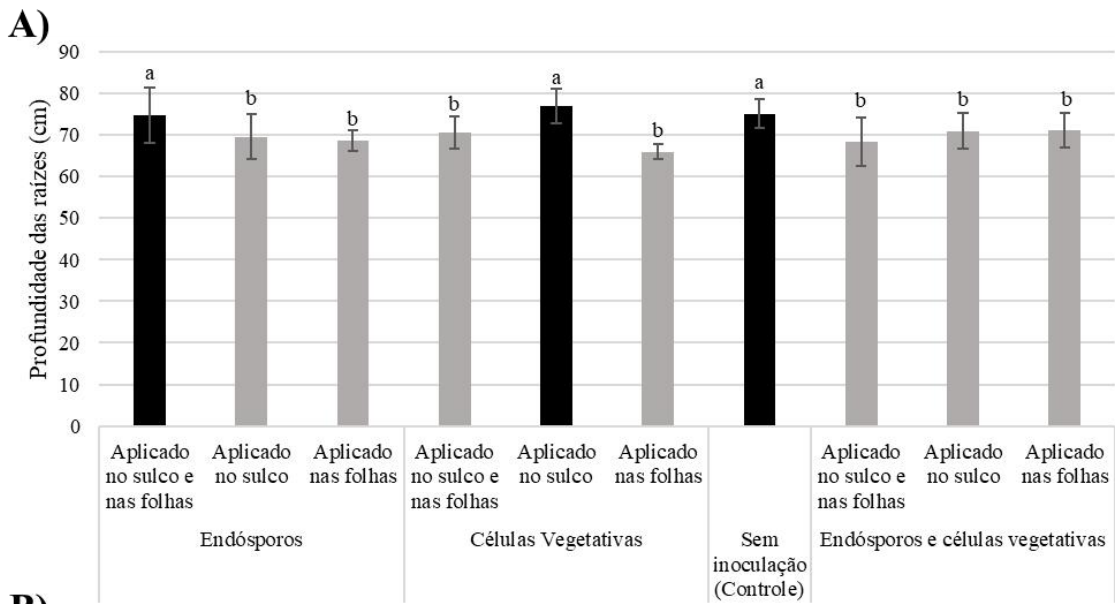


Figura 7. Efeito da inoculação sobre a profundidade do sistema radicular de milho. A) Profundidade média das raízes medida. B) fotos das raízes coletadas mostrando as diferenças entre os tratamentos. Letras iguais estão agrupadas juntas pelo teste scott knott a 95% de confiança.

Tabela 14. Altura do milho (cm) ao longo do experimento 3 de promoção de crescimento (Efeito da forma de aplicação e tipo de inóculo)

Inóculo	Forma de inoculação	Semana do experimento			
		3	4	5	6
	Semente	44,94 b	62,24 a	97,21 a	137,71 a
	Cova	45,96 b	63,57 a	94,57 a	134,57 a
Endósporos	Cova e folhas	46,86 a	63,21 a	97,00 a	135,86 a
	Semente	45,11 b	62,79 a	94,93 a	132,07 b
Células vegetativas	Cova	48,01 a	64,83 a	95,86 a	139,07 a
	Cova e folhas	47,16 a	63,34 a	95,64 a	130,93 b
Endósporos e células vegetativas	Semente	46,94 a	62,64 a	94,14 a	136,21 a
	Cova	45,01 b	60,14 a	92,86 a	131,00 b
Controle	Cova e folhas	47,40 a	63,89 a	94,93 a	134,86 a
		44,89 b	59,71 a	94,00 a	133,86 b

Letras iguais na mesma coluna estão agrupadas juntas pelo teste scott knott a 95% de confiança.

Tabela 15. Diâmetro do colmo do milho (mm) ao longo do experimento 3 de promoção de crescimento (Efeito da forma de aplicação e tipo de inóculo)

Inóculo	Forma de inoculação	Semana do experimento			
		3	4	5	6
	Semente	7,00 a	13,03 a	19,73 a	22,06 a
	Cova	6,91 a	12,42 b	18,29 a	21,26 b
Endósporos	Cova e folhas	6,91 a	12,69 b	18,92 a	21,31 b
	Semente	6,65 b	12,90 a	18,97 a	22,28 a
Células vegetativas	Cova	6,90 a	13,20 a	19,51 a	21,92 a
	Cova e folhas	7,04 a	13,45 a	18,95 a	22,51 a
Endósporos e células vegetativas	Semente	6,38 b	12,15 b	18,36 a	21,20 b
	Cova	6,53 b	12,51 b	18,14 a	20,80 b
Controle	Cova e folhas	6,88 a	12,45 b	18,45 a	21,64 b
		7,01 a	12,23 b	18,72 a	21,60 b

Letras iguais na mesma coluna estão agrupadas juntas pelo teste scott knott a 95% de confiança.

A compilação das variáveis medidas ao longo do experimento (altura e diâmetro do colmo) em relação a ocorrência de agrupamentos de médias acima dos respectivos controles é exposta na tabela 16. Havendo, na maioria do tempo, uma maior proporção de variáveis agrupadas acima do controle quando o inóculo é a base de células vegetativas.

Tabela 16. Evolução dos parâmetros de altura e diâmetro do caule no ensaio 3 de promoção de crescimento de plantas

Tratamentos	Semana do experimento			
	3	4	5	6
Quanto a inoculação*				
Endósporos	16,67%	16,67%	0,00%	66,67%
Células vegetativas	33,33%	50,00%	0,00%	66,67%
Endósporos e células vegetativas	33,33%	0,00%	0,00%	33,33%
Quanto a forma de aplicação*				
Semente	16,67%	33,33%	0,00%	66,67%
Cova	16,67%	16,67%	0,00%	50,00%
Cova e folhas	50,00%	16,67%	0,00%	50,00%

* Ocorrência de observações que se agruparam com valores acima do controle pelo teste de scott knott (95% de confiança) para as variáveis altura e diâmetro do milho ao longo das semanas do ensaio.

2.4. Discussão

Poucos estudos abordam os diferentes parâmetros relacionados ao impacto do modo de aplicação na eficiência de inoculação de bactérias benéficas em plantas, com grande parte dos ensaios do tipo se restringindo a inoculação de rizóbios em leguminosas. Tais estudos com leguminosas acabam sendo a pouca base para um melhor entendimento e otimização do processo de inoculação de bactérias, principalmente por permitirem uma avaliação fácil e direta do processo de inoculação através dos nódulos formados pela simbiose de rizóbios e leguminosas, permitindo assim uma avaliação quantitativa e qualitativa do processo de inoculação (quantidade de nódulos e percentual de nódulos ativos) (VIEIRA NETO et al., 2008; CAMPO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2018).

De maneira geral os resultados de ensaios de inoculação de rizóbios em leguminosas tendem a apresentar um melhor resultado para inoculação na semente quando o plantio é realizado em áreas novas que não receberam cargas significativas de rizóbios para estabelecer uma população nativa (VIEIRA NETO et al., 2008; CAMPO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2018; CORREIA, 2015). Em contrapartida em áreas já com histórico de inoculações prévias a aplicação dos rizóbios no sulco de plantio tende a gerar resultados iguais ou até mesmo superiores aos da inoculação nas sementes (VIEIRA NETO et al., 2008; CAMPO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2018), sendo que em algumas áreas com amplo histórico de aplicação de rizóbios os efeitos de novas inoculações tendem a permanecer incipientes em função da comunidade de bactérias já estabelecidas no solo (VIEIRA NETO et al., 2008; O'CALLAGHAN; BALLARD; WRIGHT, 2022). Ao mesmo tempo tem sido observado que o estabelecimento dessa comunidade permanente é muito dependente do manejo do solo e das condições edafoclimáticas do local sendo esperado um melhor resultados para a inoculação de *Bradyrhizobium* no sulco de plantio da soja para áreas com alto teor de matéria orgânica no solo, clima mais ameno e solo sem muita acidez, condições essas que são mais favoráveis a bactéria (VIEIRA NETO et al., 2008).

Os ensaios realizados por Vieira Neto et al. (2008), Campo et al. (2010) e Oliveira et al. (2018) também sugerem a redução da eficiência da inoculação das sementes, tanto pelo histórico anterior de aplicação de rizóbios quanto pelos fungicidas aplicados conjuntamente no tratamento de sementes. Os resultados obtidos por Oliveira et al. (2018) também reforçam a importância da capacidade competitiva do inoculante com a microbiota local, onde nos seus ensaios com a inoculação de *Rhizobium etli* em feijão os autores não observaram ganhos de nodulação com a

inoculação, mas sim expressivos ganhos de produtividade. Nesse caso a microbiota nativa era eficiente em nodular o feijão de forma independente, mas estas não eram tão eficientes como fixadoras biológicas de nitrogênio quanto a linhagem aplicada pelo inoculante. Entretanto a interação entre rizóbios e leguminosas é bastante específica (CANGIOLI et al., 2022; YANG et al., 2022) o que pode representar alguma barreira para a extrapolação dos resultados referentes a métodos e eficiência de inoculação para as demais bactérias não simbiotes utilizadas como inoculantes agrícolas.

Comparando os resultados obtidos no ensaio 1 de promoção de crescimento não foi observado diferenças estatísticas em função do método de aplicação, sendo estatisticamente iguais os resultados obtidos pela aplicação no sulco ou na semente. Apesar do RZ2MS9 pertencer ao gênero *Bacillus* a aplicação deste no ensaio foi em sua forma vegetativa, ou seja, na forma em que essa bactéria está mais sujeita as adversidades ambientais e de manejo da cultura.

De forma similar os trabalhos de Lopes et al. (2022) e Galindo et al. (2020) com *Azospirillum brasilense* em milho não observaram diferenças do efeito da bactéria em função de sua forma de aplicação, seja no sulco ou na semente. Galindo et al. (2020) chegaram a observar um efeito significativamente menor do *Azospirillum* em função de uma aplicação somente foliar, para as aplicações no solo (sulco e semente) os resultados foram estatisticamente iguais. Lopes et al. (2022) observaram um ganho de crescimento do milho enquanto Galindo et al. (2020) observaram ganhos significativos na produtividade de grãos com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, sendo a aplicação em sulco e na semente estatisticamente equivalentes em relação a esses ganhos.

A inoculação por meio da aplicação no sulco de plantio é algo bastante demandado em função da maior compatibilidade com os tratamentos, adubos e pesticidas frequentemente aplicados nas sementes antes do plantio. Além de que para plantios em larga escala a inoculação da bactéria na semente em campo pode representar um significativo gargalo durante as operações agrícolas (VIEIRA NETO et al., 2008; CAMPO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2018). Ao mesmo tempo a aplicação do inoculante no sulco de plantio pode reduzir a velocidade e a eficiência das operações de plantio e encarecer o custo da operação agrícola, ao mesmo tempo em que também demanda algum maquinário especializado para aplicação de inoculante líquido no sulco aberto para o plantio da semente (CORREIA, 2015). Apesar disso as maiores doses de inoculantes aplicadas no sulco de plantio podem compensar os maiores gastos operacionais e em insumos com a maior produtividade da soja (CORREIA, 2015).

A produtividade é uma variável importante para avaliação da eficiência e inoculação dado que esta é feita principalmente para esta finalidade. Além de que para os microrganismos não simbiotes, de vida livre, é desafiador uma mensuração quantitativa da inoculação da planta. Nos três ensaios não se chegou a fazer medições da produção de grãos e as alterações de massa seca ou de pigmentos foliares com a inoculação nem sempre foram significativas. Apesar disso em todos esses ensaios observou-se uma alteração da estrutura do sistema radicular com a inoculação, observando-se mudanças nos comprimentos, diâmetro e outras variáveis de distribuição das raízes sem necessariamente ser observado uma mudança na massa seca das mesmas. Essas alterações na estrutura das raízes estão em consonância com os resultados já observados por Figueredo et al. (2023) estudando o efeito da produção de auxina pela linhagem RZ2MS9 em plantas de milho.

Essa alteração na estrutura das raízes, entretanto, nem sempre foi positiva, como observada nos ensaios visando entender o efeito da dosagem de fósforo. Observando-se decréscimos em vários parâmetros de crescimento do milho, como a redução do comprimento total das diferentes classes de raízes analisadas independente da inoculação. Havendo também uma tendência de redução dos efeitos deletérios em função do aumento da dose da linhagem RZ2MS9 aplicada (figura 4 e tabelas 11 e 12).

Esse efeito ocorreu também quanto utilizado o produto BiomaPhos, já amplamente testado como promotor de crescimento e solubilizador de fósforo (GIOVELLI; TABALDI, 2023; OLIVEIRA et al., 2020a; OLIVEIRA et al., 2020b). Os decréscimos ocorreram somente quando aplicada a adubação fosfatada. Com os principais efeitos de redução ainda se concentrarem na arquitetura da raiz e em sua distribuição entre as diferentes classes de diâmetro. Destaca-se que a inoculação da linhagem RZ2MS9 em maiores dosagens apresentou uma menor quantidade de variáveis onde se observou reduções significativas em relação ao controle, com este decréscimo sendo observado para a inoculação com a concentração de 10^8 UFC/ml em 60,00 % das variáveis onde foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre pelo menos dois tratamentos. Já a aplicação dessa bactéria nas menores dosagens (10^6 UFC/ml) esta redução chegou a afetar 86,66 % das variáveis onde foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Tal resultado ajuda a corroborar a hipótese que o efeito de redução de crescimento observado não se deu pela ação direta das bactérias, mas sim pela interação delas com os microrganismos do solo, de tal forma que as dosagens maiores de RZ2MS9 ajudaram a amenizar o desbalanço causado pela inoculação.

Mediante a redução do crescimento de milho restrita ao tratamento com adubação fosfatada podem ser propostas duas principais hipóteses. A primeira hipótese estaria relacionada ao conceito da lei do mínimo, ou lei de Liebig, onde o efeito de redução de crescimento só foi observado nos tratamentos adubados pois a falta de fósforo para a planta estaria sendo mais severa que os demais fatores de redução do crescimento, dificultando a mensuração dos mesmos. Essa primeira hipótese é corroborada pelos dados de germinação e de efeito da aplicação do fósforo. Em relação a germinação, por mais que os efeitos de redução de crescimento só tenham sido significativos nos tratamentos adubados os percentuais de germinação foram semelhantes entre todos os tratamentos inoculados independente da adubação (tabela 9). Somado a isso se observarmos os efeitos significativos da adubação fosfatada para as variáveis analisadas observamos que para pelo menos 60 % delas a adição de fósforo levou a incrementos estatisticamente significativos (tabela 13). Entretanto esta hipótese esbarra nos resultados das análises de solo e das folhas do milho. Onde o solo apresentava níveis muito elevados de fósforo disponível, ou seja, em teoria o teor de fósforo no solo não deveria ser limitante ao milho, e os teores foliares desse elemento também estavam dentro da faixa considerada como adequada para todos os tratamentos realizados.

A segunda hipótese, propõe que a excessiva adubação fosfatada somada a não aplicação de produtos para controle fitossanitários de pragas e patógenos possa ter levado ao um desequilíbrio microbiológico que foi potencializado pela atividade solubilizadora de fósforo das bactérias inoculadas, ou seja o teor de fósforo disponível que já era muito alto naturalmente se tornou ainda mais excessivo pela ação das bactérias inoculadas. Essa segunda hipótese se assenta principalmente na não observação de redução de crescimento com a inoculação nos tratamentos controle e na observação de um incremento significativo do teor de fósforo foliar dos tratamentos adubados e inoculados.

O maior ataque de doenças em função de uma adubação excessiva é algo já relatado para algumas doenças fúngicas com relação a adubação nitrogenada. Entretanto de maneira geral a adubação com fosforo está relacionada na literatura a uma melhora da resistência da planta a stress biótico, dado que o fósforo é utilizado para muitas moléculas que atuam como sinalizadoras da invasão de microrganismos fitopatogênicos (TRIPATHI et al., 2022). Assim a priori é inesperado que as maiores doses de fósforo tenham estimulado a maior severidade do ataque do patógeno. No entanto ensaios em arroz tem demonstrado um aumento da susceptibilidade ao ataque de fungos, como o causador de bruzone, em função da adubação excessiva de fósforo (CAMPOS-SORIANO et al., 2020). Também avaliando plantas de arroz Takagi et al. (2020) observaram cloroses e necroses foliares em função da adubação excessiva de fósforo, juntamente com uma redução da atividade da rubisco em uma super expressão dos genes relacionados a

síntese de ácido fítico, demonstrando que um fornecimento excessivo desse elemento pode prejudicar o desenvolvimento das plantas. Comparando os teores de fósforo foliar medidos no ensaio com dos valores de referência para milho (IAC, 2022) observa-se que nenhum dos valores medidos se encontra fora dos teores adequados de fósforo foliar, não sendo observadas leituras excessivas de fósforo foliar total. Ao mesmo tempo Campos-Soriano et al. (2020) relata que a maior sensibilidade do arroz ao fungo da bruzone esteve relacionado aos teores de fosfato foliar livre e não necessariamente ao fósforo total.

Concomitantemente observa-se que a inoculação com os *Bacillus* resultou em um aparente maior ataque de fungos às plantas, sendo observado uma grande quantidade de sementes mofadas. As interações entre *Bacillus* e fungos descritas na literatura basicamente se concentram em dois tipos de relações, supressão de fungos patogênicos (LAHLALI et al., 2022; YI et al., 2022; RAMÍREZ et al., 2021; KHAN et al., 2018) e promoção de crescimento de fungos benéficos, principalmente de micorrizas (NANJUNDAPPA et al., 2019; BONFANTE; ANCA, 2009; FREY-KLETT; GARBAYE; TARKKA, 2007; HORII; ISHII, 2006). A priori promovendo o gênero *Bacillus* como um intrínseco promotor da fitossanidade de plantas suprimindo fungos prejudiciais e favorecendo fungos benéficos. Entretanto vale ressaltar que a classificação de um microrganismo como benéfico ou prejudicial está dentro de um contexto da utilidade de determinada atividade humana e como esse microrganismo impacta nela. *Fusarium* é um gênero de fungos comumente retratado como um patógeno de plantas (KHAN et al., 2018) entretanto Radhakrishnan et al. (2014) relatam o potencial de um isolado de *Fusarium verticillioides* de promover a resistência de plantas de soja ao stress salino e Bravim et al. (2021) apontam o potencial também de um isolado de *Fusarium verticillioides* na biorremediação de áreas contaminadas com altas dosagens de herbicidas. Nessa perspectiva aponta-se que essa visão dualista da interação entre *Bacillus* e fungos pode acabar limitando o entendimento da interação entre esses grupos.

Frey-Klett, Garbaye e Tarkka (2007) apontam que a produção de antibióticos é um fator importante na modulação da interação entre fungos e bactérias associadas as raízes de plantas, abordando principalmente as bactérias auxiliaadoras de micorrizas. Esse grupo de bactérias, onde se destaca o gênero *Bacillus*, costuma ser tratado como intrinsecamente benéfico justamente em função de sua capacidade de promover o crescimento das micorrizas associadas as plantas (NANJUNDAPPA et al., 2019; BONFANTE; ANCA, 2009; FREY-KLETT; GARBAYE; TARKKA, 2007; HORII; ISHII, 2006; A MEDINA et al., 2003). Entretanto também são observados alguns relatos de bactérias auxiliaadoras de micorrizas promovendo também o crescimento de fungos potencialmente fitopatogênicos (FREY-KLETT; GARBAYE; TARKKA, 2007; LEHR et al., 2007). Frey-Klett, Garbaye e Tarkka (2007) relataram o isolado de *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 auxiliando o patógeno do trigo *Gaeumannomyces graminis* e Lehr et al. (2007) relataram o efeito do isolado *Streptomyces* sp. O AcH 505 de promover uma maior colonização do fungo patogênico de abeto *Heterobasidion* em raízes.

Concomitante a isso o extenso uso de pesticidas nas áreas agrícolas favorece a seleção de microrganismos com resistência as mais diversas moléculas desde antibióticos (CYCON et al., 2019), herbicidas (BRAVIM et al., 2021) a fungicidas (DOUGHTY et al., 2021; FRAAIJE et al., 2020; GAMBHIR, 2020; BRENT; HOLLOMON, 2007; MASSI et al., 2021; HAHN, 2014). Sendo que o ambiente agrícola é amplamente relatado como um hotspot para o surgimento de resistência a compostos antimicrobianos, com especial atenção para o surgimento de resistências fúngicas (BRAVIM et al., 2021; DOUGHTY et al., 2021; FRAAIJE et al., 2020; GAMBHIR, 2020; BRENT; HOLLOMON, 2007; MASSI et al., 2021; FISHER et al., 2022; HAHN, 2014; CYCON et al., 2019), sendo inclusive um hotspot de resistência de grande relevância médica (DOUGHTY et al., 2021; FRAAIJE et al., 2020; FISHER et al., 2022). Em consonância com esses dados o trabalho de Ferrarezi et al. (2023) analisando a comunidade microbioma

do solo coletado no mesmo local do utilizado para o ensaio avaliando as dosagens de fósforo encontrou uma grande quantidade de grupos relacionados a degradação de compostos xenobióticos.

Dado que o solo usado no experimento foi coletado em uma área com longo histórico de cultivo convencional de milho sem rotação de culturas é bastante esperado que a pressão de seleção nesse solo tenha selecionado fungos capazes de infectar milho e com algum grau de resistência a gama de produtos rotineiramente usados no manejo fitossanitário. Somado ao fato de que não foram realizadas aplicações de agrotóxicos para controle de doenças no ensaio pode-se hipotetizar que a carga de fungos patogênicos do solo que normalmente seria contida pela aplicação de fungicidas durante o plantio e manejo do milho não sofreu tal controle. Sendo uma comunidade potencialmente já selecionada pela rotineira aplicação de fungicidas propõe-se que esta teria mais facilidade para superar a produção natural de compostos antimicrobianos das bactérias inoculadas e se associarem a elas de forma oportunista causando o aumento da severidade da doença observada.

Tal hipótese acaba sendo corroborada ao se observar a atenuação da severidade do ataque com o aumento da dosagem do RZ2MS9 aplicado (Tabelas 10 e 11), nessa perspectiva entende-se que as maiores dosagens do RZ2MS9 aplicado podem de alguma forma ter criado uma maior resistência ao estabelecimento dos fungos fitopatogênicos. Sendo necessários mais estudos para compreender como as bactérias inoculadas podem estar interagindo com a microbiota do solo, com a adubação aplicada e em que condições essas interações podem acabar favorecendo microrganismos oportunistas. Entretanto em função da grande gama de outros ensaios de promoção de crescimento com resultados positivos envolvendo as bactérias inoculadas, principalmente as que compõem o BiomaPhos, por terem sido extensivamente testadas em campo em uma ampla gama de regiões (GIOVELLI; TABALDI, 2023; OLIVEIRA et al., 2020a; OLIVEIRA et al., 2020b), compreende-se os resultados do ensaio de promoção de crescimento avaliando dosagem de fósforo como pontuais. Merecendo atenção para compreensão das condições que podem fazer essas bactérias favorecerem o ataque de fungos fitopatogênicos, mas não representando os efeitos de promoção de crescimento normalmente apresentados por estas.

Com relação ao efeito da forma de aplicação e tipo de inóculo (ensaio 3) na promoção de crescimento é possível também observar a mudança na arquitetura radicular do milho com a inoculação do RZ2MS9. Sendo observada uma significativa mudança na profundidade das raízes em função da inoculação (Figura 7) sem que tenha sido observada uma mudança na massa seca das mesmas. Entretanto para muitos dos tratamentos observou-se redução da profundidade das raízes, com maior parte da massa de raízes se concentrando mais próxima da superfície. Como neste ensaio a adubação foi realizada de forma parcelada com o adubo sendo aplicado na superfície do vaso sem incorporação se levanta a hipótese que parte dessa observação pode ter se dado por um maior acúmulo de nutrientes na superfície do vaso, em especial do fósforo, pouco solúvel e aplicado na forma de super fosfato simples. Sendo observados grânulos de superfosfato simples próximo a superfície do vaso durante a desmontagem do ensaio. Dois tratamentos inoculados chegaram a apresentar um significativo maior acúmulo de massa da parte aérea que o tratamento controle (figura 6) e vários dos tratamentos inoculados apresentaram ganhos significativos de altura e diâmetro do caule durante a execução do ensaio, reforçando novamente o potencial do RZ2MS9 como promotor de crescimento (Tabela 16).

Compilando os resultados de altura e diâmetro dos tratamentos medidos ao longo do experimento e agrupando os resultados significativos em função ou do tipo de inóculo ou do modo de aplicação, independentemente um do outro, temos os resultados apresentados na tabela 16. A maior parte dos tratamentos teve medições estatisticamente superiores ao controle na quinta semana após a germinação. Tal resultado acaba trazendo alguma surpresa pois o esperado seria que o efeito da inoculação acabasse sendo mais proeminente logo após a aplicação.

Chegou-se a se observar algum efeito de crescimento com a reinoculação da bactéria com metade dos tratamentos que tinham sofrido reinoculação nas folhas alguns dias antes da medição da semana 3 apresentaram incrementos significativos de altura e diâmetro do colmo, bem acima do observado nos tratamentos com as demais formas de aplicação.

Outra tendência observada é um aparente atraso no efeito da inoculação com endósporos, com os tratamentos que receberam o inoculo desse tipo apresentando uma menor observação de diâmetros e alturas estaticamente superiores ao controle nas semanas de medição 3 e 4, mas sendo igual ao tratamento com células vegetativas na semana 6. Tal resultado parece indicar para uma menor velocidade de ação da aplicação de endósporos do que da de células vegetativas, ao mesmo tempo que a aplicação da mistura de endósporos e células vegetativas apresentou os piores resultados entre os três tipos de inóculos testados. Nesse último caso acaba-se questionando se esse resultado se deu pela mistura de tipos de células ou pelo momento em que o inóculo foi colhido, em tese no meio do processo de conversão das células vegetativas em endósporos.

Ao final desses ensaios foi possível avaliar que o modo de aplicação do RZ2MS9 não foi um fator relevante para a sua atuação como promotor de crescimento de plantas, bem como a consistente atuação dessa bactéria na modificação da arquitetura das raízes do milho, sendo os efeitos de ganho de massa aparecendo de forma mais secundária. Ao mesmo tempo fatores como a origem (e histórico) do substrato de cultivo, adubação e estado das células aplicadas se apresentaram como relevantes ao longo dos ensaios realizados. Por fim o atraso nos efeitos observados de promoção de crescimento com aplicação de endósporos no ensaio 3 também levanta questionamentos sobre o consenso das vantagens da aplicação de *Bacillus* na forma em endósporos, sendo necessários mais estudos para uma melhor observação das diferenças no efeito do RZ2MS9 em relação ao seu estado quando aplicada.

Referências

- A MEDINA, *et al.* Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). **Applied Soil Ecology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 15-28, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0929-1393\(02\)00112-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0929-1393(02)00112-9).
- AGAKE, Shin-Ichiro *et al.* Plant Growth-promoting Effects of Viable and Dead Spores of *Bacillus pumilus* TUAT1 on *Setaria viridis*. **Microbes And Environments**, [S.L.], v. 37, n. 1, 2022. Japanese Society of Microbial Ecology. <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.me21060>.
- ALI, Qurban *et al.* Revealing plant growth-promoting mechanisms of *Bacillus* strains in elevating rice growth and its interaction with salt stress. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 13, 2 set. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.994902>.
- ALMEIDA, Jaqueline Raquel de *et al.* *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **Environmental Microbiology Reports**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 812-821, 25 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.13004>.

- ANICETO, Rafael Martins. **Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2017.tde-06012017-155312>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- ATRIH, A.; FOSTER, S.J.. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 364-372, 2 ago. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01394.x>.
- BATISTA, Bruna Durante *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 206, p. 33-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- BATISTA, Bruna Durante *et al.* The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 203, n. 7, p. 3869-3882, 19 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02361-z>.
- BLAKE, Christopher; CHRISTENSEN, Mathilde Nordgaard; KOVÁCS, Ákos T.. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 15-25, jan. 2021. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-08-20-0225-cr>.
- BONFANTE, Paola; ANCA, Iulia-Andra. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: a network of interactions. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 363-383, 1 out. 2009. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>.
- BRAVIM, Nara Priscila Barbosa *et al.* Selection of filamentous fungi that are resistant to the herbicides atrazine, glyphosate and pendimethalin. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [S.L.], v. 43, p. e51656, 5 jul. 2021. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.51656>.
- BRENT, Keith J; HOLLOMON, Derek W. **FUNGICIDE RESISTANCE IN CROP PATHOGENS: how can it be managed?**. 2. ed. Brussels: Croplife International, 2007. 60 p. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BUDI HARJO, Anto. **Plant-Bacteria Interactions: Molecular Mechanisms of Phytostimulation by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Humboldt-Universität, Berlin, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.18452/16333>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BUHR, T.L.; MCPHERSON, D.C.; GUTTING, B.W.. Analysis of brothcultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 105, n. 5, p. 1604-1613, nov. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03899.x>.
- CAMPO, Rubens José *et al.* In-furrow inoculation of soybean as alternative to fungicide and micronutrient seed treatment. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 1103-1112, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832010000400010>.
- CAMPOS-SORIANO, Lidia *et al.* Phosphate excess increases susceptibility to pathogen infection in rice. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 555-570, 19 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12916>.
- CANGIOLI, Lisa *et al.* Scent of a Symbiont: the personalized genetic relationships of rhizobium.: plant interaction. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 3358, 20 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23063358>.

- CFIC. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Lista de inoculantes e microorganismos promotores de crescimento de plantas**. [S.I.]: Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos (CFIC), 2023. 15 p. Consulta Pessoal à CFIC através do canal oficial de contato pelo e-mail cfic.dfia@agricultura.gov.br.
- CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas *et al.* Efficiency of *Bacillus subtilis* Bs10 as a plant growth promoting inoculant in soybean crop under field conditions. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 14, p. e441101422141, 8 nov. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22141>.
- CHOWDHURY, Soumitra Paul *et al.* Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. e68818, 23 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068818>.
- CHUMTHONG, Amornrat *et al.* Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of rice sheath blight: formulation, bacterial viability and efficacy testing. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 2499-2507, 19 jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9774-7>.
- CHUNG, Soohee. Powder Formulation Using Heat Resistant Endospores of Two Multi-functional Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Bacillus* Strains Having Phytophthora Blight Suppression and Growth Promoting Functions. **Journal Of The Korean Society For Applied Biological Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 485-492, ago. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3839/jksabc.2010.074>.
- COELHO, Antônio Marcos. **Nutrição e Adubação do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2006. 10 p. (CIRCULAR TÉCNICA). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/490410/1/Circ78.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- COMEAU, Dominique *et al.* Interactions Between *Bacillus* Spp., *Pseudomonas* Spp. and *Cannabis sativa* Promote Plant Growth. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 20 set. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.715758>.
- CORREIA, Tiago Pereira da Silva. **Eficiência operacional, econômica e agrônômica da inoculação de soja via sulco de semeadura**. 2015. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Unesp, Botucatu, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/134287>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- CYCON, Mariusz *et al.* Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1, 8 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>.
- DISI, Joseph O.; KLOEPPER, Joseph W.; FADAMIRO, Henry Y.. Seed treatment of maize with *Bacillus pumilus* strain INR-7 affects host location and feeding by Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera* virgifera. **Journal Of Pest Science**, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 515-522, 26 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-017-0927-z>.
- DOUGHTY, Kevin J. *et al.* Selection and Amplification of Fungicide Resistance in *Aspergillus fumigatus* in Relation to DMI Fungicide Use in Agronomic Settings: hotspots versus coldspots. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 2439, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9122439>.
- FERRAREZI, Jessica Aparecida *et al.* Meta-omics integration approach reveals the effect of soil native microbiome diversity in the performance of inoculant *Azospirillum brasilense*. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 14, 29 jun. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2023.1172839>.
- FIGUEREDO, Everthon Fernandes *et al.* The key role of indole-3-acetic acid biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 in promoting maize growth revealed by the ipdC gene knockout mediated by the CRISPR-Cas9 system.

- Microbiological Research**, [S.L.], v. 266, p. 127218, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127218>.
- FISHER, Matthew C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 20, n. 9, p. 557-571, 29 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>.
- FRAAIJE, Bart *et al.* The Multi-Fungicide Resistance Status of *Aspergillus fumigatus* Populations in Arable Soils and the Wider European Environment. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1, 15 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.599233>.
- FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M.. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytologist**, [S.L.], v. 176, n. 1, p. 22-36, 30 ago. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>.
- GALINDO, Fernando Shintate *et al.* Investigation of Azospirillum brasilense Inoculation and Silicon Application on Corn Yield Responses. **Journal Of Soil Science And Plant Nutrition**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 2406-2418, 27 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42729-020-00306-x>.
- GAMBHIR, Nikita. **FUNGICIDE RESISTANCE**: surveillance, risk assessment and evolution in two soil-borne pathogens. 2020. 167 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Filosofia, University Of Nebraska, Lincoln, 2020. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/359664550>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- GAO, Jun-Lian *et al.* Characterization of an Endophytic Antagonistic Bacterial Strain Bacillus halotolerans LBG-1-13 with Multiple Plant Growth-Promoting Traits, Stress Tolerance, and Its Effects on Lily Growth. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2022, p. 1-12, 25 ago. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/5960004>.
- GIOVELLI, Jéssica; TABALDI, Luciane Almeri. Níveis de Fósforo e Inoculação de Sementes por *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) e *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) no Crescimento e Desenvolvimento de Plantas de Soja. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 451-458, 30 jan. 2023. Editora e Distribuidora Educacional. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2022v26n4p451-458>.
- GLADSTONE, G. P.; FILDES., Paul. A SIMPLE CULTURE MEDIUM FOR GENERAL USE WITHOUT MEAT EXTRACT OR PEPTONE. **The British Journal Of Experimental Pathology**. [s.l.], p. 161-173. ago. 1940. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2065450/pdf/brjexppathol00190-0002.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2023.
- GLADSTONE, G. P.; FILDES., Paul. A SIMPLE CULTURE MEDIUM FOR GENERAL USE WITHOUT MEAT EXTRACT OR PEPTONE. **The British Journal Of Experimental Pathology**. [s.l.], p. 161-173. ago. 1940. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2065450/pdf/brjexppathol00190-0002.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2023.
- GOHIL, Rinkal B. *et al.* Plant Growth-Promoting Activity of *Bacillus* sp. PG-8 Isolated From Fermented Panchagavya and Its Effect on the Growth of *Arachis hypogea*. **Frontiers In Agronomy**, [S.L.], v. 4, 4 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fagro.2022.805454>.
- GUIMARÃES, Alexandre Martins *et al.* Utilização da rizobactéria *Bacillus amyloliquefaciens* na promoção de crescimento de alface (*Lactuca sativa* L.), em cultivo agroecológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 8., 2013, Porto Alegre. **Resumos**. [S.I.]: Associação Brasileira de Agroecologia, 2013. Disponível em: <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/14302>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- GÜL, A.; KIDOGLU, F.; TÜZEL, Y.. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum*, L.) growing in perlite. **Spanish Journal Of Agricultural Research**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 422, 1 set.

2008. Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria (INIA). <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2008063-335>.
- HAHN, Matthias. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: botrytis as a case study. **Journal of Chemical Biology**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 133-141, 28 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>.
- HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD ALLAH, Elsayed Fathi. Bacillus subtilis: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1291-1297, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.
- HORII, Sachie; ISHII, Takaaki. Identification and function of Gigaspora margarita growth-promoting microorganisms. **Symbiosis**, [S.I.], v. 41, p. 135-141, jul. 2006. Disponível em: <https://dalspace.library.dal.ca/bitstream/handle/10222/78240/VOLUME41-NUMBER%203-2006-PAGE%20135.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- IAC. **BOLETIM 100**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2022. 500 p.
- Ji, Chenglong *et al.* Genomic Analysis Reveals Potential Mechanisms Underlying Promotion of Tomato Plant Growth and Antagonism of Soilborne Pathogens by Bacillus amyloliquefaciens Ba13. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 9, n. 3, 22 dez. 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01615-21>.
- KASHYAP, Abhijeet Shankar *et al.* Screening and Biocontrol Potential of Rhizobacteria Native to Gangetic Plains and Hilly Regions to Induce Systemic Resistance and Promote Plant Growth in Chilli against Bacterial Wilt Disease. **Plants**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 2125, 7 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10102125>.
- KAVAMURA, Vanessa Nessner *et al.* Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 168, n. 4, p. 183-191, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>.
- KHAN, Noor *et al.* Antifungal Activity of Bacillus Species Against Fusarium and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, 2 out. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>.
- KONDO, Yanka Rocha. **Manejo de inoculantes de bactérias promotoras de crescimento vegetal em Araucaria angustifolia para a produção de mudas com elevada qualidade fisiológica nutricional**. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/76632>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- LAHLALI, Rachid *et al.* Biological Control of Plant Pathogens: a global perspective. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 596, 9 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10030596>.
- LAL, Sadhana; TABACCHIONI, Silvia. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 2-10, mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>.
- LEHR, Nina A. *et al.* Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. **New Phytologist**, [S.L.], v. 174, n. 4, p. 892-903, 22 fev. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02021.x>.
- LONGATTO, Daniel Prezotto. **New insights into Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 biology: entomopathogenic activity and molecular interaction with *Zea mays* L.** 2020. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.11.2020.tde-23032020-143407>. Acesso em: 13 nov. 2023.

- LOPES, Marlo Markus *et al.* Pulverização dirigida no sulco e inoculação na semente de milho com *Azospirillum brasilense*. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. e19511427401, 16 mar. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27401>.
- MAGOTRA, Shanu *et al.* Field evaluation of PGP Bacillus sp. strain D5 native to *Crocus sativus*, in traditional and non traditional areas, and mining of PGP genes from its genome. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, 9 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-84585-z>.
- MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **AGROFIT**. 2023. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 13 nov. 2023.
- MASHABELA, Manamele D. *et al.* Untargeted metabolite profiling to elucidate rhizosphere and leaf metabolome changes of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) treated with the plant growth-promoting rhizobacteria Paenibacillus alvei (T22) and Bacillus subtilis. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, 25 ago. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.971836>.
- MASSI, Federico *et al.* Fungicide Resistance Evolution and Detection in Plant Pathogens: *Plasmopara viticola* as a case study. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 119, 6 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9010119>.
- MATSUMURA, A.T.S. *et al.* Efeito de Três Formulações de *Bacillus amyloliquefaciens* ICBB200 sobre o Crescimento de Plantas de Alface (*Lactuca sativa* L.) em Cinco Condições Edafoclimáticas. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 146-152, 30 jun. 2016. Revista Scientia Agraria Paranaensis (SAP). <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n2p146-152>.
- MAY, Andre *et al.* Effect of *Bacillus aryabhatai* on the initial establishment of pre-sprouted seedlings of sugarcane varieties. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. e11510212337, 7 fev. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12337>.
- MORAIS, Jorge Fernandes Albano de. **Avaliação de consórcios bacterianos para mitigar os efeitos do estresse hídrico em culturas de soja**. 2018. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2019.tde-17012019-160813>. Acesso em: 12 nov. 2023.
- NANJUNDAPPA, Anuroopa *et al.* Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus* spp. in soil enhancing growth of crop plants. **Fungal Biology And Biotechnology**, [S.L.], v. 6, n. 1, 28 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40694-019-0086-5>.
- NEPHALI, Lerato *et al.* A Metabolomic Landscape of Maize Plants Treated With a Microbial Biostimulant Under Well-Watered and Drought Conditions. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 12, 3 jun. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.676632>.
- O'CALLAGHAN, Maureen; BALLARD, Ross A.; WRIGHT, David. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: limitations and opportunities. **Soil Use And Management**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 1340-1369, 9 maio 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/sum.12811>.
- OLIVEIRA, Christiane Abreu de *et al.* **Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2020. 19 p. (CIRCULAR TÉCNICA). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214364/1/Circ-Tec.-260.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- OLIVEIRA, Christiane Abreu de *et al.* **Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja**. Sete Lagoas:

- EMBRAPA, 2020a. 21 p. (BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217542/1/Bol-210.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- OLIVEIRA, Dâmiany Pádua *et al.* Viability of liquid medium-inoculation of *Rhizobium etli* in planting furrows with common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 394-398, mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2018000300015>.
- OLIVEIRA, Helena Gutierrez. **Effects of *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 on soybean (*Glycine max*) considering volatile organic compounds, plant development in the field, and soil microbiome diversity**. 2021. 94 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.64.2021.tde-28092022-140007>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- RADHAKRISHNAN, Ramalingam *et al.* A comparative study of phosphate solubilization and the host plant growth promotion ability of *Fusarium verticillioides* RK01 and *Humicola* sp. KNU01 under salt stress. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 585-593, 1 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-014-0894-z>.
- RAMÍREZ, Verónica *et al.* *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 132, n. 1, p. 470-482, 6 jul. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.15179>.
- SAMARAS, A. *et al.* Biocontrol potential and plant-growth-promoting effects of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato. **Acta Horticulturae**, [S.L.], n. 1207, p. 139-146, jul. 2018. International Society for Horticultural Science (ISHS). <http://dx.doi.org/10.17660/actahortic.2018.1207.18>.
- SEEMA, Kumari; MEHTA, Kuldeep; SINGH; Niranjan. Studies on the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, physiological parameters, yield and fruit quality of strawberry cv. Chandler. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 383-387, fev. 2018.
- SOUSA, Djalma Martinhão Gomes de *et al.* **Manejo da Adubação Fosfatada para Culturas Anuais no Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, 2016. 10 p. (CIRCULAR TÉCNICA). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/154889/1/CT-33.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- TAKAGI, Daisuke *et al.* Phosphorus toxicity disrupts Rubisco activation and reactive oxygen species defence systems by phytic acid accumulation in leaves. **Plant, Cell & Environment**, [S.L.], v. 43, n. 9, p. 2033-2053, 9 jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13772>.
- TIMMUSK, Salme. **Mechanism of Action of the Plant Growth Promoting Bacterium *Paenibacillus polymyxa***. 2003. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Filosofia, Uppsala University, Uppsala, 2003. Disponível em: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:163648/fulltext01.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- TRIPATHI, Ruchi *et al.* Plant mineral nutrition and disease resistance: a significant linkage for sustainable crop protection. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 13, 20 out. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.883970>.
- TSCHOEKE, Bruno Augusto Prohmann. **Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho**. 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2016.tde-05072016-160308>. Acesso em: 13 nov. 2023.

- TSOTETSI, Teboho *et al.* *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: what have we learned?. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 19, p. 2482, 22 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11192482>.
- VENANCIO, Wilson Story *et al.* Lettuce Production under Reduced Levels of N-fertilizer in the Presence of Plant Growth-promoting *Bacillus* spp. Bacteria. **Journal Of Pure And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 1941-1952, 30 dez. 2019. Journal of Pure and Applied Microbiology. <http://dx.doi.org/10.22207/jpam.13.4.06>.
- VIEIRA NETO, Santiel Alves *et al.* Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 861-870, abr. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832008000200040>.
- YANG, Jun *et al.* Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. **Journal Of Integrative Plant Biology**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 244-267, fev. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.13207>.
- YAO, A. V. *et al.* Effect of FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 323-328, ago. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03235400600655347>.
- YI, Yanjie *et al.* Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Properties of *Bacillus mojavensis* B1302 against *Rhizoctonia Cerealis*. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1682, 20 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10081682>.
- ZARPELON, Talyta Galafassi. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus® no enraizamento e crescimento de eucalipto**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/4360>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- ZECCHIN, Vivian Jaskiw Szilagy. **Uso da bactéria promotora do crescimento vegetal, *Bacillus amyloliquefaciens* SUBSP, plantarum FZB-42, tomateiro em cultivo orgânico**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/44121>. Acesso em: 13 nov. 2023.

Anexos

ANEXO A. Revisão de trabalhos estudando promoção de crescimento vegetal por bactérias do gênero *Bacillus*

Referência	Condições de crescimento dos <i>Bacillus</i>			Inóculo		Local do ensaio	Cultura	
	Tempo	Temperatura e Agitação	Substrato	Aplicação	Concentração			Modo de aplicação e Tipo de inóculo
GOHIL et al., 2022	24 h	30 °C	Caldo nutriente	5ml/vaso	8×10 ⁶ UFC/ml	Aplicação no solo junto as plantas	casa e vegetação	Amendoim
CHUMTHONG et al., 2008	4 dias	30-35 °C a 200RPM	Batata Dextrose	100ml/vaso	10 ⁸ UFC/ml	Pulverização de suspensão de endósporos	casa e vegetação	Arroz
CHUMTHONG et al., 2008	4 dias	30-35 °C a 200RPM	Batata Dextrose	300ml/m ²	10 ⁸ UFC/ml	Pulverização de suspensão de endósporos	campo	Arroz
NEPHALI et al., 2021	Produto comercial formulado (BACSTIM ® 100)			2l/ha	N.I.	suspensão de endósporos no sulco de plantio junto a semente	campo	Milho
CHUNG, 2010	3 dias	35 °C	LB	10 ⁹ UFC/vaso	N.I.	Aplicação no solo junto as plantas da suspensão de endósporos	Casa de vegetação	Pimenta vermelha
CHAGAS JUNIOR et al., 2021	Produto formulado			2, 4, 6 ou 8 ml/Kg de semente	10 ⁸ UFC/ml	Aplicação de endósporos nas sementes	Campo	Soja
DISI; KLOEPPER; FADAMIRO, 2017	2 dias	28 °C sem agitação (Placas)	TSA	1ml/semte	10 ⁷ UFC/ml	Aplicação no sulco de plantio junto as sementes	Casa de vegetação	Milho
SEEMA; MEHTA; SINGH, 2018	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	10 ⁹ UFC/ml	Aplicação na irrigação junto as raízes e por pulverização	Campo	Morango
KASHYAP et al., 2021	48 h	28 °C Sem agitação (Placas)	NA	5ml/planta	10 ⁸ UFC/ml	Aplicação no solo junto as plantas	Casa de vegetação	Pimenta
MAGOTRA et al., 2021	48 h	35 °C a 180RPM	Caldo nutriente	N.I.	10 ⁸ UFC/ml	Cobertura dos bulbos com a formulação em pó de endósporos	Casa de vegetação	Açafrão
MASHABELA et al., 2022	Overnight	28 °C a 140 RPM	LB	N.I.	N.I.	Imersão das sementes na suspensão de células	Câmara de crescimento	Trigo

ALI et al., 2022	Overnight	37 °C	LB	N.I.	10 ⁷ UFC/ml	Aplicação da suspensão de células nos vasos com as plantas	Casa de vegetação	Arroz
GAO et al., 2022	24 h	30 °C a 220 RPM	LB	N.I.	2,2×10 ⁸ UFC/ml	Imersão dos bulbos na suspensão de células	Campo	Lirio
COMEAU et al., 2021	N.I.	37 °C a 120 RPM	TSB	10ml/planta	10 ⁸ UFC/ml	Aplicação da suspensão de células nos vasos com as plantas	Câmara de crescimento	Canabis
Jl et al., 2021	48 h	37 °C a 180 RPM	Caldo de extrato de bife e peptona	150ml/planta	10 ⁷ UFC/ml	Aplicação da suspensão de células junto a irrigação	Casa de vegetação	Tomate
AGAKE et al., 2022	24h p/ células vegetativas 72h p/ endósporos	30 °C a 180 RPM	T-soy p/ células vegetativas DSM p/ endósporos	1ml/planta	10 ⁷ UFC/ml	Aplicação da suspensão (células vegetativas, endósporos e endósporos mortos) nas plantas	Casa de vegetação	Setaria viridis
KAVAMURA et al., 2013	1 dia	28 °C	TSA	N.I.	10 ⁸ UFC/ml	Aplicação da suspensão de células nas sementes	Casa de vegetação	Milho
MAY et al., 2021	72 h	25 °C a 120 RPM	GY	N.I.	10 ⁸ UFC/ml	Pulverização da suspensão de células sobre as plantas	Casa de vegetação	Cana de Açúcar
MORAIS, 2018	24 h	28 °C	TSB	N.I.	10 ⁸ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células	Casa de vegetação	Soja
KONDO, 2022	Produto formulado			50ml/vaso	9,9×10 ⁶ - 3,1×10 ⁹ UFC/ml	Aplicação da suspensão de endósporos nos vasos com as plantas	Casa de vegetação	Araucária
GIOVELLI; TABALDI, 2023	Produto formulado (BiomaPhos®)			1ml para cada 600 sementes	4×10 ⁹ UFC/ml	Aplicação da suspensão no tratamento de sementes	Casa de vegetação	Soja
OLIVEIRA et al., 2020a	Produto formulado (BiomaPhos®)			100ml/ha	4×10 ⁹ UFC/ml	Aplicação da suspensão no tratamento de sementes	Campo	Milho e soja
OLIVEIRA et al., 2020b	3 dias	28 °C a 120 RPM	TSB	100ml/ha	10 ⁸ UFC/ml	Aplicação da suspensão no tratamento de sementes	Campo	Milho
GUIMARÃES et al., 2013	Produto formulado (ICB NUTRISOLO BACILLUS ®)			50ml/ha	1×10 ⁹ UFC/ml	Pulverização da suspensão de endósporos	Campo	Alface
MATSUMURA et al., 2016	Produto formulado			50ml/ha	1×10 ⁹ UFC/ml	Pulverização da suspensão de endósporos	Campo	Alface
CHOWDHURY et al., 2013	3 dias	28 °C sem agitação (placa)	NA	11,6ml/planta	1×10 ⁷ UFC/ml	Pulverização da suspensão de endósporos sobre as mudas	Campo	Alface
BUDIHARJO, 2011	N.I.	N.I.	LB	N.I.	1×10 ⁵ UFC/ml	Imersão das sementes na suspensão de células	Câmara de crescimento	Arabdopsis

ZECCHIN, 2016	N.I.	N.I.	N.I.	64-256 ul/g de semente	1×10^{11} UFC/ml	Aplicação da suspensão de células no tratamento de sementes	Casa de vegetação	Tomate
GÜL; KIDOGLU; TÜZEL, 2008	N.I.	N.I.	N.I.	Imersão + 20ml por planta	N.I.	Imersão das sementes na suspensão de endósporos e aplicação de suspensão de endósporos nas plantas	Casa de vegetação	Tomate
YAO et al., 2006	Produto formulado			3,6g/Kg de semente	1×10^{11} UFC/g	Aplicação da suspensão de endósporos no tratamento de sementes	Campo	Algodão
VENANCIO et al., 2019	Produto formulado			300ml/ha	10^8 UFC/ml	Imersão das plântulas na suspensão de células e pulverização da calda restante	Campo	Alface
ZARPELON, 2007	Produto formulado			1ml/50ml de substrato	$4,6 \times 10^7$ - $6,4 \times 10^8$ UFC/ml	Mistura da suspensão de células no substrato	Casa de vegetação	Eucalipto
SAMARAS et al., 2018	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	10^7 - 10^9 UFC/ml	Suspensão de células aplicada na semente e no substrato de plantio	Casa de vegetação	Tomate

N.I. – Não Informado

ANEXO B.Revisão de produtos agrícolas formulados com bactérias do gênero *Bacillus*

Produto					Artigos usando as linhagens do produto
Nome	Linhagem(s)	Função Vendida	Concentração e formulação	Aplicação	
AURAS® - NOOA	<i>B. aryabhatai</i> CMAA 1363	Promotor de crescimento (Resistência a seca)	1x10 ⁸ UFC/mL	TS – 4ml/Kg de semente (milho) P – 200-350ml/ha (Capim)	(KAVAMURA et al., 2013; MAY et al., 2021; MORAIS, 2018)
BIOTRIO® - Briotrop	<i>B. pumilus</i> CCTB05, <i>B. subtilis</i> CCTB04 e <i>B. amyloliquefaciens</i> CCTB09	Promotor de crescimento e nematocida	1×10 ⁸ UFC/ml de endósporos	TS – 100 mL/ha SP – 200 mL/ha P – 300 mL/ha	(KONDO, 2022)
AccMax® - Total Bio	<i>B. pumilus</i> CCTB05, <i>B. subtilis</i> CCTB04 e <i>B. amyloliquefaciens</i> CCTB09	Promotor de crescimento	1×10 ⁸ UFC/ml de endósporos	TS – 100 mL/ha SP – 200 mL/ha P – 300 mL/ha	(KONDO, 2022)
BiomaPhos® - Bioma	<i>B. subtilis</i> CNPMS B2084 e <i>B. megaterium</i> CNPMS B119	solubilizador de fósforo	4x10 ⁹ UFC/ml	TS – 1ml para cada 600 sementes (milho e soja)	(GIOVELLI; TABALDI, 2023; OLIVEIRA et al., 2020a; OLIVEIRA et al., 2020b)
ICB NUTRISOLO BACILLUS® - ICB	<i>B. amyloliquefaciens</i> ICBB200	promotor de crescimento e solubilizador de fósforo	1×10 ⁹ UFC/ml de endósporos	P – 50ml/ha (alface)*	(GUIMARÃES et al., 2013; MATSUMURA et al., 2016)
RHIZOVITAL 42® - OCP	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	promotor de crescimento, controle de fungos e nematoides	2,5×10 ¹⁰ UFC/ml de endósporos	TS – 4ml/kg de semente (feijão)	(CHOWDHURY et al., 2013; BUDIHARJO, 2011; ZECCHIN, 2016; GÜL; KIDOGLU; TÜZEL, 2008; YAO et al., 2006)
BS10® - JCO	<i>B. subtilis</i> CBMAI 2479	Promotor de crescimento, solubilizador de fósforo, ciclagem de nutrientes e modulador metabólico vegetal	1×10 ⁸ UFC/ml	TS – 4ml/kg de semente (soja)	

BOMBARDEIRO® - BIOTROP	<i>B. pumilus</i> CNPSo 3203 <i>Bacillus velezensis</i> CNPSo 3602 <i>B. subtilis</i> CNPSo 2720	Fungicida e promotor de crescimento	1×10 ⁸ UFC/ml	P – 300ml/ha (Soja, milho e alface)	(VENANCIO et al., 2019)
Rizolyptus® - Bio Soja	<i>B. subtilis</i> UFV S1	Enraizador, produtor de fitormônios e fixador de nitrogênio	1×10 ⁸ UFC/ml	SU – 20ml/Kg de substrato (Eucalipto)	(ZARPELON, 2007)

TS – Tratamento de sementes

P – Pulverização em área total

SP – Aplicação no sulco de plantio

SU – Aplicação no substrato para plantio

*informações obtidas pelos artigos que testaram a eficiência do produto durante sua fase de teste de eficiência durante a produção (GUIMARÃES et al., 201

3. DINÂMICA DE ESPORULAÇÃO E GERMINAÇÃO DO *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 E SEUS IMPACTOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MILHO.

Resumo

A esporulação é um processo comum as bactérias do gênero *Bacillus*, produzindo uma estrutura denominada endósporo que confere a essas bactérias uma grande resistência a condições ambientais adversas. Essa característica confere grande praticidade a formulação de bioprodutos para uso agrícola a base de bactérias desse gênero, pois a resistência dos endósporos facilita a logística de aplicação e armazenamento. Ao mesmo tempo a literatura frequentemente atribui a esse processo de esporulação a uma maior adaptabilidade e resiliência dessas bactérias em campo, tratando a esporulação como uma característica exclusivamente benéfica. Nessa perspectiva o presente capítulo se concentrou em avaliar o efeito do estado celular (vegetativo ou esporulado) do *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 na ação dessa bactéria como promotora de crescimento de plantas. Visando principalmente avaliar se a aplicação dessa linhagem na forma de endósporos conseguiria apresentar resultados equivalentes ou superiores a aplicação da mesma no estado vegetativo para a promoção de crescimento em milho. Sendo um dos primeiros trabalhos a testar essa equivalência. Os resultados encontrados demonstraram que a aplicação da linhagem RZ2MS9 na forma de endósporos praticamente elimina toda sua ação como promotora de crescimento do milho e que os exsudatos radiculares do milho podem atuar inibindo a germinação dos endósporos de *Bacillus*. Também foi observado que a aplicação da linhagem RZ2MS9 na forma vegetativa conseguiu alterar a composição dos exsudatos radiculares do milho permitindo alguma germinação dos endósporos avaliados. Somado a isso os ensaios de germinação de endósporos realizados utilizando o *Bacillus subtilis* 168 como controle permitiram observar grandes diferenças no comportamento de germinação entre essas duas linhagens, principalmente quanto a sensibilidade a ácidos orgânicos, um dos principais grupos de moléculas presentes nos exsudatos radiculares de plantas. Sendo observado uma maior resistência da linhagem RZ2MS9 aos ácidos orgânicos e a germinação de alguns endósporos dessa linhagem nas soluções ácidas.

Palavras chave: Esporulação; *Bacillus*; Inoculantes; Interação Planta-Bactéria;

3.1. Introdução

O gênero *Bacillus* compreende um grupo de bactérias com amplo espectro de uso para as atividades humanas, onde se inserem linhagens utilizadas como probióticos, biofábricas, agentes de controle biológicos e promotores de crescimento vegetal. Para o uso agrícola, esse gênero acaba tendo grande destaque em função da sua capacidade de produzir estruturas de resistência, denominadas endósporos, que conferem a produtos formulados com estes uma maior praticidade na armazenagem e aplicação (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019). De maneira geral é comum nos artigos relatando o uso de *Bacillus* a menção da habilidade de esporulação como um processo positivo que permite a aplicação junto com outros agroquímicos, a sobrevivência por mais tempo do microrganismo no ambiente, dentre outras supostas vantagens advindas da habilidade da bactéria de produzir essas estruturas de resistência (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019; AZIZOGLU, 2019; VIDAL-QUIST et al., 2013; RADDADI et al., 2008; RADDADI et al., 2007). Tal ponto de vista sobre a esporulação acaba sendo contrário ao exposto para o uso de *Bacillus* para processos industriais e como probióticos, onde a esporulação é vista como um empecilho, dado que no estágio de endósporos a bactéria fica com metabolismo praticamente inativo, de modo que esta para de exercer as funções e processos de interesse. Além de que os endósporos podem apresentar um desafio a mais para separação e esterilização

dos metabólitos produzidos por essas bactérias em processos industriais (ZHOU et al., 2019; ZHANG; DUAN; WU, 2016; BERNARDEAU et al., 2017).

Apesar dessa aparente divergência a atividade metabólica dos *Bacillus* para realização de processos de interesse, independentemente se no campo, como probióticos ou dentro de uma indústria, dependem destes germinarem do estágio de endósporos para o de células vegetativo (caso sejam inicialmente aplicados esporulados) e se manterem como células vegetativas (ZHANG; DUAN; WU, 2016). Assim, há exceção de casos bastante específicos, como no caso das proteínas entomopatogênicas de *Bacillus thuringiensis* produzidas durante o processo de esporulação (DENG et al., 2014), as características de interesse dos *Bacillus*, principalmente quanto sua aplicação na agricultura, não estão relacionadas a esporulação. Essas características de interesse podem inclusive serem antagonizadas pela esporulação caso os endósporos aplicados não encontrem condições favoráveis a germinação ou as condições ambientais favoreçam a esporulação antes que a bactéria consiga ter algum efeito significativo no local aplicado.

Há poucos estudos moleculares relacionados ao processo de esporulação dos *Bacillus* no ambiente. O processo de esporulação nessas bactérias é bastante complexo, envolvendo a expressão coordenada de dezenas de genes diferentes e sendo regulado por uma complexa rede de enzimas que monitoram diversas condições ambientais (HIGGINS; DWORKIN, 2012). Sendo incipientes estudos relacionados à regulação gênica da esporulação no processo de interação *Bacillus*-planta (MOLINA-SANTIAGO et al., 2019; CHARRON-LAMOUREUX; BEAUREGARD, 2019). Ao mesmo tempo, os mecanismos de regulação do processo de esporulação também estão relacionados a vários outros processos celulares relacionados a interação bactéria-planta-ambiente, como a produção de biofilmes, criando uma possibilidade de interface entre os processos (HIGGINS; DWORKIN, 2012; BEAUREGARD et al., 2013). Molina-Santiago et al. (2019), Charron-Lamoureux e Beauregard (2019) observaram a capacidade de exsudatos radiculares de plântulas de melão e *Arabidopsis*, respectivamente, de promoverem a germinação de endósporos de *B. subtilis*, bem como a indução a esporulação dos *Bacillus* após alguns dias em contato com os exsudatos radiculares de *Arabidopsis*.

Os ensaios envolvendo o possível efeito de compostos germinantes em *Bacillus* geralmente avaliam moléculas nutrientes de baixo peso molecular como D-açúcares e L-aminoácidos, sendo a L-alanina utilizado como padrão geral para germinação em *Bacillus* (CHRISTIE; SETLOW, 2020; LU et al., 2021), e também em outros grupos esporulantes como *Clostridium* (BLOCHER; BUSTA, 1985). Entretanto tais moléculas não são tão comumente presentes no solo e rizosfera, sendo que estudos descrevendo a composição de exsudatos radiculares também se observam outros grupos de moléculas presentes até em maior quantidade que os açúcares e proteínas, com destaque para os ácidos orgânicos (FAN et al., 2012; JONES; NGUYEN; FINLAY, 2009; JIN et al., 2019; KRAFFCZYK; TROLLDENIER; BERINGER, 1984). De maneira geral é relatado que ácidos orgânicos podem inibir de forma reversível a germinação de endósporos de *Bacillus* (YI; SETLOW, 2010; BLOCHER; BUSTA, 1985; CIARCIAGLINI et al., 2000; SUN; VERMEULEN; DEVLIEGHERE, 2021), também sendo observado esses efeitos com alguns ácidos graxos (ácidos láurico, oleico e linoleico) em *B. cereus* (ABABOUC; BOUQUARTACHA; BUSTA, 1994).

Já o processo de esporulação é descrito por ser principalmente desencadeado pela falta de nutrientes no meio onde está a bactéria, como um último recurso desta para resistir a condições adversas prolongadas (NARULA et al., 2012; HIGGINS; DWORKIN, 2012; CHO; CHUNG, 2020). Entretanto, os parâmetros para o que seria considerado uma situação de condição adversa não são bem definidos, sendo relatado uma manutenção de 20% a 30% de células em estado vegetativo para um isolado de *B. subtilis* após 100 dias em um meio sem fonte de carbono (GRAY et al., 2019). Os mesmos autores também apontam que linhagens de *B. subtilis* nocauteadas para a esporulação podem sobreviver e se multiplicar em meio LB diluído 10.000 vezes, mesmo que bastante lentamente. Ao mesmo tempo,

Mutlu et al. (2020) apontam uma significativa diversidade na sensibilidade de linhagens de *B. subtilis* a esporulação. Indicando a existência de toda uma estratégia evolutiva em função de uma produção de endósporos de maior qualidade logo no início da privação de nutrientes (mas em menor quantidade) ou produzir endósporos em grande quantidade após um bom período do início da falta de nutrientes (mas de menor qualidade). Tais resultados complexificam os modelos pré-existent sobre as dinâmicas de esporulação e germinação dos *Bacillus* ao lançarem mais dúvidas sobre a dinâmica destes aplicados como inoculantes nos ambientes agrícolas e em suas possíveis adversidades.

Em contrapartida o desenvolvimento de bioinsumos a base de endósporos bacterianos fornece várias vantagens. A formulação de bactérias em estado vegetativo exige um cuidado extra na sua produção. Nas formulações sólidas deve se atentar a forma de secagem de forma a danificar o mínimo possível as células. Já nas formulações líquidas deve-se criar um ambiente na qual a bactéria resista com uma grande quantidade de células viáveis a longos períodos de armazenamento, sendo que em ambos os casos acabam sendo necessário o uso de vários aditivos a fim de proteger essas células da lise (BERNINGER et al., 2017). Além disso, a aplicação de endósporos permite maior viabilidade em condições de seca, radiação solar, pH e temperatura (BERNINGER et al., 2017). Entretanto também existem exemplos de produtos formulados com bactérias não esporulantes, com especial destaque a produtos a base de rizóbios e de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Pseudomonas* (BERNINGER et al., 2017; CFIC, 2023).

Nesse contexto o presente estudo objetivou avaliar o impacto do estado de aplicação do isolado *B. thuringiensis* RZ2MS9 (se vegetativo ou como endósporo) no seu efeito como promotor de crescimento de plantas. Essa linhagem oriunda da rizosfera do guaranazeiro (*Paullinia cupana*) tem apresentado resultados promissores como promotor de crescimento vegetal, com um destaque a sua capacidade de sintetizar fitormônios (BATISTA et al., 2018; FIGUEREDO et al., 2023) já sendo amplamente estudada pela equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" (ESALQ-USP). Entretanto, até o presente momento os estudos com esta bactéria se concentraram somente em seu estado vegetativo, sendo este um dos primeiros estudos avaliando os efeitos de seus endósporos nas dinâmicas de crescimento vegetal e um dos primeiros estudos avaliando o efeito dos endósporos de *Bacillus thuringiensis* como promotores de crescimento vegetal.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Material biológico

Foram utilizadas as linhagens bacterianas *B. thuringiensis* RZ2MS9, *B. subtilis* 168. As linhagens foram crescidas a partir de estoque em -80 °C, em meio de cultura Luria Bertani (LB; SAMBROOK; RUSSELL, 2006) a 28 °C, para obtenção de colônias isoladas. A linhagem RZ2MS9 foi isolada da rizosfera do guaranazeiro (*Paullinia cupana*) e mostrou atividade como bactéria promotora de crescimento vegetal de milho e soja (BATISTA et al., 2018) e o 168 uma linhagem modelo para estudo do gênero *Bacillus* e das dinâmicas de esporulação (SU et al., 2020), sendo usada nesse estudo como um controle. Para os ensaios de promoção de crescimento de plantas foi utilizado o híbrido SHS 7939 pró 2.

3.2.2. Desinfestação das sementes de milho

As sementes de milho usadas nos ensaios de promoção de crescimento foram previamente desinfestadas antes da inoculação com o RZ2MS9. Para tal as sementes foram primeiramente imersas em solução de hipoclorito de

sódio 2% por 5 minutos e submetidas a uma leve agitação intermitente. Em seguida as sementes foram imersas em etanol 70% por 1 minuto também sob leve agitação, sendo essa lavagem em etanol repetida 2 vezes. Ao final as sementes foram lavadas com água deionizada autoclavada 3 vezes e espalhadas sobre papel germitest autoclavado dentro de câmara de fluxo laminar para secagem. Uma vez secas as sementes foram colocadas em tubos falcom estéreis e acondicionadas a 4°C até a realização dos ensaios de promoção de crescimento.

3.2.3. Otimização da esporulação do RZ2MS9

3.2.3.1. Quantificação de células e endósporos

A quantificação de células vegetativas e de endósporos foi realizada por meio de plaqueamento, conforme descrito por Buhr, McPherson e Gutting (2008) e Atrih e Foster (2001). Uma alíquota de 1 mL do meio contendo a bactéria crescida é diretamente submetida a diluição seriada em tampão PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄ e pH 7,4) e plaqueamento em meio LB sólido para contagem do número total de células. Para contagem do número de endósporos uma alíquota do meio com a bactéria foi submetida a aquecimento a 80 °C por 20 min, seguido de resfriamento em gelo por 1 min antes da realização também de diluição seriada em PBS e plaqueamento para contagem de colônias.

3.2.3.2. Otimização do meio de cultura

Para a otimização das condições de esporulação foram avaliados 16 meios de cultura conforme descrito na Tabela 17. A linhagem RZ2MS9 foi inoculada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios testados a uma densidade ótica inicial (OD_{600nm}) de 0,1 (aproximadamente 10⁷ UFC/ml), sendo incubados a 28 °C sob agitação de 180 rpm por 72 h. Após esse período foi realizado a medição da quantidade total de células e de endósporos do RZ2MS9. Foi considerado eficiente o meio onde foi obtida uma taxa de germinação igual ou superior a 75% das células totais de RZ2MS9. Foi considerado um mínimo de 2*10⁸ UFC/mL, para classificação dos meios testados como bons para o crescimento desta linhagem. Valor próximo ao previamente observado do crescimento do RZ2MS9 nos meios normalmente utilizados para o seu crescimento. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

Tabela 17. Meios de cultura testados para esporulação do RZ2MS9

	Meio	Referência	Composição
Meios referenciados como para esporulação de <i>Bacillus</i>	M11	POSADA-URIBE; ROMERO-TABAREZ; VILLEGAS-ESCOBAR, 2015	Glicose 5 g/l, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,5 g/l, KH_2PO_4 6 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l, extrato de carne 5 g/l e peptona 3 g/l. pH 6,5
	Y1	HORNSTRA et al., 2006	Glicose 1,8 g/l, ácido glutâmico 2,9 g/l, leucina 0,8 g/l, valina 0,3 g/l, treonina 0,2 g/l, metionina 0,1 g/l, histidina 0,05 g/l, lactato de sódio 0,5 g/l, Ácido Acético 0,06 ml/l, $FeCl_2$ 6,3 mg/l, $CuCl_2$ 0,3 mg/l, $ZnCl_2$ 1,7 mg/l, $MnSO_4$ 10 mg/l, $MgCl_2$ 0,1 mg/l, $(NH_4)_2SO_4$ 0,7 mg/l, Na_2MoO_4 0,5 mg/l, $CoCl_2$ 0,3 mg/l e $Ca(NO_3)_2$ 0,2 mg/l. pH 7,2.
	CCY	ATRIH; FOSTER, 2001	Caseína hidrolisada 2 g/l, extrato de levedura 0,4 g/l, glicerol 0,756 ml/l, K_2HPO_4 4,5 g/l, KH_2PO_4 1,8 g/l, $MgCl_2$ 0,05 g/l, $CaCl_2$ 0,2 g/l, glutamina 20 mg/l, $MnCl_2$ 2 mg/l, $FeSO_4$ 6,4 mg/l e $ZnCl_2$ 6,8 mg/l. pH 7,2.
	CDSM	HAGEMAN et al., 1984	MOPS 9,25 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3 g/l, glicose 3,6 g/l, ácido láctico 0,4 g/l, ácido glutâmico 1,2 g/l, $MgCl_2$ 0,4 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,2 g/l, $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ 12 mg/l, $ZnCl_2$ 0,3 mg/l e $FeCl_2$ 1,3 g/l. pH 7,0.
	SM	DONNELLAN; NAGS; LEVINSON, 1964	Glicose 0,8 g/l, ácido glutâmico 1,5 g/l, NH_4Cl 0,5 g/l, Na_2SO_4 0,5 g/l, KH_2PO_4 0,07 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,11 g/l, NH_4NO_3 0,1 g/l, $FeCl_2$ 0,5 mg/l, $MgCl_2$ 3,9 mg/l e $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ 12,6 mg/l. pH 7,1.
	EMBRAPA	MONNERAT et al., 2020	Extrato de levedura 2,875 g/l, peptona 3,125 g/l, NaCl 5 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $CaCO_3$ 0,1 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10 mg/l e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l. pH 7,0.
Meios usados no crescimento de rotina do RZ2MS9	LB		Triptona 10 g/l, NaCl 10 g/l e extrato de levedura 5 g/l. pH 7,0.
	LB 5%		Triptona 0,5 g/l, NaCl 0,5 g/l e extrato de levedura 0,25 g/l. pH 7,0.
	TSB		Triptona 17 g/l, peptona de soja 3 g/l, glicose 2,5 g/l, NaCl 5 g/l e K_2HPO_4 2,5 g/l. pH 7,3.
	TSB 5%		Triptona 0,85 g/l, peptona de soja 0,15 g/l, glicose 0,125 g/l, NaCl 0,25 g/l e K_2HPO_4 0,125 g/l. pH 7,3.
Meios suplementados com a solução de sais do meio CCY para esporulação	LB + CCY		Triptona 10 g/l, NaCl 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l e sais CCY 1 ml/l. pH 7,0.
	LB 5% + CCY		Triptona 0,5 g/l, NaCl 0,5 g/l, extrato de levedura 0,25 g/l e sais CCY 1 ml/l. pH 7,0.
	TSB + CCY		Triptona 17 g/l, peptona de soja 3 g/l, glicose 2,5 g/l, NaCl 5 g/l, K_2HPO_4 2,5 g/l e sais CCY 1 ml/l. pH 7,3.
	TSB 5% + CCY		Triptona 0,85 g/l, peptona de soja 0,15 g/l, glicose 0,125 g/l, NaCl 0,25 g/l, K_2HPO_4 0,125 g/l e sais CCY 1 ml/l. pH 7,3.
Meios formulados com base em conversas com empresas de inoculantes	GM 2		Extrato de levedura 24 g/l, glicose 24 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,03 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,04 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l e K_2HPO_4 0,5 g/l. pH 6,8.
	GM 200		Triptona 5 g/l, extrato de levedura 5 g/l, glicose 2 g/l, NaCl 1,2 g/l e sais CCY 1 ml/l. pH 6,8.
Solução de sais CCY	GLADSTONE; FILDES, 1940		$ZnCl_2$ 6,8 g/l, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 101,6 g/l, $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,96 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 29,4 g/l, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 13,5 g/l e HCl 32% 10ml/l.

3.2.3.3. Avaliação dos efeitos da matéria prima no meio selecionado

O meio GM 200 selecionado foi avaliado utilizando reagentes mais baratos visando viabilizar o custo de produção da linhagem RZ2MS9. Foi preparado o meio GM 200 modificado substituindo os seus componentes por equivalentes sem pureza laboratorial. A triptona foi substituída por caseína (granel), a glicose por açúcar cristal e o extrato de levedura por levedura liofilizada, sendo mantidas as mesmas quantidades do meio original. O ensaio foi realizado em quadruplicata de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.3.1.

3.2.3.4. Curva de crescimento e esporulação

A curva de crescimento e esporulação foi realizada com o meio GM 200. A linhagem RZ2MS9 foi crescida em Erlenmeyers de 250ml com 50ml de meio GM 200 a 28°C e 180 rpm de agitação. O crescimento foi iniciado a uma OD_{600nm} de 0,1 (aproximadamente 10⁷ UFC/ml) sendo avaliado o crescimento e a esporulação a cada 12h até 96h de crescimento (item 3.2.3.1). O percentual de esporulação foi calculado dividindo-se os valores de endósporos contados no plaqueamento pelo total de células viáveis no mesmo tempo. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

3.2.4. Efeito do estado da linhagem RZ2MS9 nas suas dinâmicas de promoção de crescimento de milho

3.2.4.1. Preparação dos inóculos

Para inoculação, a linhagem RZ2MS9 foi crescida em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio GM 200, a 28 °C por 24 h e 72 h respectivamente para obtenção dos inóculos de células vegetativas e completamente esporulado, sendo o estado das mesmas confirmado por observação em microscópio de contraste de fase. Para produção da solução de inoculação, a cultura bacteriana foi diluída em tampão PBS para as OD_{600nm} 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001, respectivamente, para obtenção dos inóculos de 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵ e 10⁴ UFC/mL. Para obtenção dos controles com meio de cultura GM 200, o mesmo foi diluído em PBS nas mesmas proporções das realizadas para o inóculo vegetativo. As concentrações dos inóculos, tanto de endósporos quanto de células totais, foram posteriormente confirmadas por plaqueamento, sendo também confirmada o estado das células dos inóculos (se vegetativas ou esporuladas) por observação em microscópio de contraste de fase.

3.2.4.2. Ensaio em germitest

Para o ensaio de promoção de crescimento de milho em papel germitest, o experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial, tendo dois fatores: tipo do inóculo da linhagem RZ2MS9 e concentração, sendo os níveis desses fatores descritos na tabela 18. O ensaio foi montado com 8 repetições.

Tabela 18. Delineamento do ensaio de promoção de crescimento em germitest

Fatores	Tratamentos
Tipo do Inóculo	RZ2MS9 em estado vegetativo
	RZ2MS9 em estado esporulado
	Meio de Cultura GM 200 (Controle)
Concentração do Inóculo	RZ2MS9 10 ⁸ UFC/ml
	RZ2MS9 10 ⁷ UFC/ml
	RZ2MS9 10 ⁶ UFC/ml
	RZ2MS9 10 ⁵ UFC/ml
	RZ2MS9 10 ⁴ UFC/ml

Para inoculação nas sementes a solução bacteriana foi utilizada na dosagem de 0,1 mL por semente, sendo em seguida agitadas vigorosamente para homogeneização da inoculação. Após, as sementes foram dispostas em papel germitest previamente molhado com água deionizada autoclavada (na proporção de 3 mL de água para cada grama de papel seco) e acondicionadas em câmara de crescimento BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h até emissão da primeira folha verdadeira (V1).

Após esse período as plântulas foram coletadas para medição de sua massa seca total (semente, raiz e parte aérea), da raiz e da parte aérea. As raízes também foram escaneadas e analisadas pelo programa WinRHIZO Arabidopsis®, os parâmetros avaliados foram: o diâmetro médio das raízes, ramificação das raízes (número de pontas) e as medidas de comprimento, área superficial, área projetada e volume tanto totais como divididas por classe de diâmetro das raízes (Raízes com menos de 0,5 mm, entre 0,5 e 1,0 mm, entre 1,0 e 1,5 mm, entre 1,5 a 2,0 mm e entre 2,0 a 2,5 mm). Para a obtenção da massa seca as amostras vegetais foram mantidas em estufa a 65 °C até terem atingido peso constante.

3.2.4.3. Ensaio em casa de vegetação

Para o ensaio de promoção de crescimento em casa de vegetação, o experimento foi montado com delineamento casualizado em blocos no esquema fatorial. Os tratamentos avaliados foram os mesmos do item 3.2.4.2. Os tratamentos foram distribuídos em 5 blocos, contendo uma planta por tratamento.

Adicionalmente foram mantidas 4 plantas a mais para os tratamentos inoculado com RZ2MS9 a 10⁸ UFC/ml em estado vegetativo e inoculado com meio de cultura GM 200 diluído na mesma proporção para a inoculação a 10⁸ UFC/ml. Essas plantas foram dispostas ao longo dos blocos do experimento sendo posteriormente utilizadas para coleta dos exsudatos radiculares do milho.

Para inoculação nas sementes a solução bacteriana foi adicionada na proporção de 0,1 ml por semente, que em seguida foram vigorosamente agitadas para homogeneização da inoculação. Após, as sementes foram plantadas em recipientes contendo 0,5 l de solo coletado da Estação Experimental de Genética – Anhumas (22,8463 S, 48,0194 O), sendo plantadas 4 sementes por vaso. O solo foi coletado em uma área de pousio com histórico de cultivo anterior de soja.

Antes do plantio o solo foi enviado para análise no Laboratório de Análises Químicas do Solo da ESQAQ-USP. As interpretações foram realizadas de acordo com as circulares técnicas Coelho (2006) e Sousa et al. (2016) as mesmas que basearam as recomendações de adubação e calagem (Tabelas 19 e 20). Sendo a calagem feita 4 semanas antes do plantio, com o calcário sendo misturado ao solo, que depois foi umedecido para a ocorrência das reações de neutralização da acidez. O cálculo da calagem foi feito através do método de elevação da saturação de bases considerando um calcário com PRNT de 95%.

Tabela 19. Características químicas do solo utilizado no experimento na casa de vegetação

Determinação	Resultado	Interpretação
Ca	5,1 mmol _c /dm ³	
Mg	3,1 mmol _c /dm ³	Baixo
CTC	46,6 mmol _c /dm ³	
V%	28 %	Baixo
m%	44 %	Inadequado
pH	4,18	Inadequado
Matéria Orgânica	16,4 g/dm ³	
P	<7 mg/dm ³	Baixo
K	4,92 mmol _c /dm ³	Adequado
S	<7,6 mg/dm ³	Baixo
B	0,14 mg/dm ³	Baixo
Cu	0,4 mg/dm ³	Baixo
Fe	59,4 mg/dm ³	Alto
Mn	6,1 mg/dm ³	Médio
Zn	0,4 mg/dm ³	Baixo

*Interpretação dos resultados e interpretação dos teores no solo feitas de acordo com as circulares técnicas Coelho (2006) e Sousa et al. (2016).

Tabela 20. Adubação aplicada no experimento em casa e vegetação

Nutriente	Recomendação	Aplicação por planta*
N	30 Kg/ha	0,91g uréia (0,4g de N)
P	120 Kg/ha	8,89g SPS (1,6g de P ₂ O ₅)
K	60 Kg/ha	1,38g KCl (0,8g de K ₂ O)
B	1 Kg/ha	0,078g H ₃ BO ₃ (0,013g de B)
Zn	0,5 Kg/ha	0,033g ZnSO ₄ (0,007g de Zn)
TOTAL		11,29g do formulado
Calagem	2,5 t/há	34g calcário dolomítico

*Cálculos feitos adotando uma densidade média de 75.000 plantas/ha, e as concentrações de nutrientes nos adubos utilizados de 44 % de N, 18 % de P, 58 % de K, 17 % de B e 20 % de Zn respectivamente para ureia, super fosfato simples (SPS), cloreto do potássio (KCl), ácido bórico (H₃BO₃) e sulfato de zinco (ZnSO₄).

Após as plantas emergirem foi realizando o desbaste a fim de se manter apenas 1 planta por vaso. A avaliação do experimento ocorreu quando pelo menos 95% das plantas atingiram V4 sendo coletada para medição das massas secas (raiz e parte aérea) e das dimensões do sistema radicular pelo escaneamento das raízes e análise das imagens pelo programa WinRHIZO Arabidopsis®. Os parâmetros avaliados foram: o diâmetro médio das raízes, ramificação das raízes (número de pontas) e as medidas de comprimento, área superficial, área projetada e volume tanto totais como divididas por classe de diâmetro das raízes (Raízes com menos de 0,5mm, entre 0,5 e 1,0mm, entre 1,0 e 1,5mm, entre 1,5 a 2,0mm, entre 2,0 a 2,5mm, entre 2,5 a 3,0mm, entre 3,0 a 3,5 mm e entre 3,5 a 4,0 mm). Para medição da massa seca as amostras vegetais foram mantidas em estufa a 65°C até terem atingido peso constante.

Para coleta dos exsudatos as plantas de milho previamente separadas também foram coletadas em V4. As plantas foram submetidas a lavagem das raízes para remoção do solo e depois adicionadas em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de água deionizada autoclavada (4 plantas por erlenmeyer). Estes por sua vez foram mantidos em câmara de crescimento B.O.D a 25°C com 12 h de fotoperíodo por 72h para liberação dos exsudatos radiculares na

água. Após esse período as plantas foram retiradas e a solução obtida foi filtrada em filtro de 0,22µm, para remoção de bactérias e fungos, e armazenada a -80°C para futuras utilizações.

Adicionalmente, logo antes do plantio, e consequente inoculação do RZ2MS9, uma porção do solo utilizada foi coletada para extração de um extrato de solo. Para tanto, 20 g de solo foram acondicionados em tubo tipo Falcom, misturados a 40 ml de água, agitado vigorosamente em vórtex e depois centrifugado a 12.000g por 10min para separação da parte sólida. A porção líquida foi filtrada em filtro 0,22 µm, para remoção de bactérias e fungos, e armazenada a -80°C para futuras aplicações.

Os exsudatos radiculares de milho foram enviados para o Laboratório “Max Feffer” de Genética de Plantas da ESALQ-USP para a análise do metaboloma. Sendo este feito através de cromatografia gasosa (GC).

3.2.5. Dinâmica de germinação dos endósporos de *Bacillus*

3.2.5.1. Quantificação da taxa de da germinação dos endósporos de RZ2MS9

Das várias metodologias possíveis de serem usadas para quantificação dos endósporos (TEHRI et al., 2018) foram utilizadas três nos diferentes ensaios realizados. A absorbância a 600nm foi utilizada para avaliação da germinação por diferença de OD_{600nm}, a resistência térmica dos endósporos foi avaliada no plaqueamento e a perda de refratibilidade foi observada em microscópio de contraste de fase. Para os ensaios de germinação foram avaliadas a linhagem RZ2MS9 e a linhagem 168, sendo a segunda utilizado como um padrão (SU et al., 2020).

3.2.5.2. Quantificação da taxa de germinação por diferença de OD_{600nm}

Para a quantificação da germinação dos endósporos em função da OD_{600nm} a suspensão de endósporos a ser avaliada foi adicionada e misturada em uma solução germinante, descritas na tabela 21, (50 µL de suspensão de endósporos para 1 mL de solução germinante) e imediatamente medida a OD_{600nm}. Após isso a suspensão foi mantida a 37°C por 1 h e novamente avaliada quanto a OD_{600nm} da mesma. A porcentagem de germinação foi inferida em função da redução da OD_{600nm} após a incubação, dado que durante esse processo ocorre a redução da OD_{600nm} da suspensão de células (TEHRI et al., 2018), sendo calculado o percentual de redução da mesma e depois descontada a redução de OD_{600nm} do controle com água deionizada, conforme ilustrado na formula abaixo.

$$R\% = \frac{ODf - ODi}{ODi} - \frac{cODf - cODi}{cODi}$$

Onde:

R% = Redução percentual da OD_{600nm}

ODf = OD_{600nm} após a incubação de 1h

ODi = OD_{600nm} inicial da amostra

cODf = OD_{600nm} média do controle com água após a incubação de 1h

cODi = OD_{600nm} inicial média do controle.

3.2.5.3. Quantificação da taxa de germinação por plaqueamento

Para a quantificação dos endósporos por plaqueamento utilizou-se da termoresistência dos endósporos para fazer a contagem dos mesmos antes e depois do tratamento para germinação avaliado. De forma análoga ao procedimento descrito no item 3.2.3.1 foi coletada uma alíquota da suspensão de endósporos misturada ao germinante avaliado. A alíquota foi submetida a aquecimento a 80 °C por 20 min, seguido por resfriamento em gelo por 1 min, diluição seriada e plaqueamento para contagem de endósporos resistentes termicamente. A germinação mensurada em função da redução percentual da quantidade de endósporos quantificados entre as leituras do controle (água) e dos germinantes testados. Também foi realizado o plaqueamento de uma alíquota não tratada termicamente para contagem do total de células viáveis, sendo contabilizados os possíveis efeitos tóxicos dos germinantes em função da redução da contagem total de células comparado com o controle em água.

3.2.5.4. Quantificação da taxa de germinação por microscopia de contraste de fase

Para avaliação da taxa de germinação dos endósporos por microscopia de contraste de fase, 2 µL da suspensão de endósporos foram misturados a solução germinante e então coletadas amostras após o tempo estipulado para germinação. A avaliação da germinação foi realizada observando-se a forma, tamanho e brilho das células da amostra avaliada em microscópio de contraste de fase, bem como pela comparação entre as amostras e o controle, composto por água deionizada.

3.2.5.5. Obtenção das suspensões de endósporos

A lavagem e purificação dos endósporos foi realizada seguindo o protocolo descrito por (Wax, Freese e Cashel (1967), com algumas modificações. Para obtenção das suspensões de endósporos as linhagens RZ2MS9 e 168 foram crescidas em meio GM 200 por 72 h. As células bacterianas foram observadas em microscópio de contraste de fase para confirmação da esporulação completa e acondicionadas em tubos tipo Falcom (50 mL) para centrifugação a 9000 rpm (8700 g) por 10 min para precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspenso em 2 mL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA, pH 8,0).

Para obtenção da suspensão de endósporos digeridos as células bacterianas ressuspendidas em TE foram primeiramente submetidas à digestão por lisozima (0,1 µg/ml de concentração final) por 1 h, seguido de adição de SDS (1% de concentração final) por 30 min, com todo esse processo ocorrendo a temperatura ambiente. Após, a mistura foi centrifugada a 9000 rpm (8700g) por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 2 mL de água deionizada autoclavada para lavagem dos endósporos, sendo esse processo de lavagem com água repetido pelo menos 6 vezes para remoção da camada de debris celular. O pellet final foi também ressuspenso em 2 mL de água e acondicionado a 4°C até a realização dos ensaios de germinação, sendo submetido a ativação térmica (70°C por 1 h seguido de resfriamento a 0°C por pelo menos 1 min) logo antes da realização dos ensaios de germinação.

Para obtenção da suspensão de endósporos lavada a amostra ressuspenso em TE foi somente lavada em água por pelo menos 6 vezes como descrito anteriormente (centrifugação a 9000 rpm (8700g) e ressuspenso do pellet em 2 mL de água deionizada autoclavada). Após as lavagens o pellet final foi ressuspenso novamente em 2 ml de

água e acondicionado a 4°C até a realização dos ensaios de germinação. As suspensões lavadas foram testadas quanto a ativação térmica (70°C por 1h seguido de resfriamento a 0°C por pelo menos 1 min) sendo esta ativação feita sempre logo antes dos ensaios de germinação e não sendo aplicada em todas as amostras de endósporos lavados (sendo utilizados endósporos lavados e não ativados termicamente em alguns ensaios).

3.2.5.6. Teste de germinação em L-Alanina

Para avaliação da germinação das diferentes suspensões de endósporos avaliados (RZ2MS9 e 168) avaliou-se a diferença de OD_{600nm} das mesmas na presença de uma solução de L-Alanina (10mM), um controle positivo para a germinação (LU et al., 2021). O controle foi a suspensão digerida em água deionizada autoclavada. Todo o ensaio foi realizado em quadruplicada. O efeito das diferentes formas de obtenção da solução de endósporos para o ensaio de germinação foi avaliado a fim de se determinar quais seriam utilizadas para os testes subsequentes.

3.2.5.7. Triagem de possíveis germinantes dos endósporos dos *Bacillus* RZ2MS9 e 168

Para triagem de possíveis germinantes foram preparadas soluções a 10 mM de alguns dos compostos descritos como presentes em exsudatos radiculares (com foco em milho), descritos em Fan et al. (2012), Jones; Nguyen e Finlay (2009), Jin et al. (2019) e Krafczyk, Trolldenier e Beringer (1984). Para os ensaios envolvendo ácidos orgânicos foram preparados solução tanto do ácido quanto do respectivo sal sódico, sendo também avaliado adicionalmente o triptofano, o ácido 3 indol acético e o HCl (como um controle de ácido inorgânico). O controle foi a água deionizada autoclavada, sendo todas as soluções avaliadas listadas na Tabela 21.

Tabela 21. Compostos testados na triagem de possíveis germinantes

Categoria	Composto Testado	Concentração Testada	
Aminoácidos	L-Alanina	10mM	
	DL-Alanina	10mM	
	DL-Leucina	10mM	
	Glicina	10mM	
	L-Ácido Glutâmico	10mM	
	DL- Ácido Aspártico	10mM	
	L-Triptofano	10mM	
Açúcares	D-Glicose	10mM	
	D-Frutose	10mM	
	L-Arabinose	10mM	
Ácidos	Ácidos orgânicos	Ácido Málico	10mM
		Ácido Lático	10mM
		Ácido Acético	10mM
		Ácido Cítrico	10mM
		Ácido Oxálico	10mM
		Ácido 3 Indol Acético	10mM
	Ácido Inorgânico	Ácido Clorídrico	10mM
Sais de ácidos Orgânicos	Lactato de sódio	10mM	
	Acetato de Sódio	10mM	
	Citrato de Sódio	10mM	
	Oxalato de Sódio	10mM	
Controle	Água Deionizada Autoclavada		

Para essa triagem a germinação foi quantificada por plaqueamento, comparando o crescimento das colônias provenientes de endósporos termo resistentes. Para tal as suspensões de endósporos digeridos (RZ2MS9 e 168) foram adicionadas nas diversas soluções (Tabela 21; na proporção de 50ul de suspensão para 1 ml de solução testada) e incubadas a 37°C por 2 h. Após foi realizado tratamento térmico das amostras (80°C por 20 min seguido por resfriamento a 0°C por 1 min) e plaqueamento para avaliação de endósporos termo resistentes.

A avaliação foi realizada de forma qualitativa comparando as placas dos tratamentos com o controle. Para tal, foi selecionada para avaliação as placas uma diluição abaixo das contáveis (entre 30 a 300 colônias na placa) para o controle em água. As placas selecionadas foram então categorizadas quanto ao efeito de redução no número de colônias em relação ao controle, sendo considerado sem efeito aquelas que também estavam incontáveis (mais de 300 colônias, efeito mediano aquelas que estavam com quantidade contável de colônias (entre 30 e 300) e efeito alto para as placas com menos de 30 colônias. O ensaio foi realizado em quadruplicada sendo selecionadas para os ensaios posteriores os compostos que levaram a redução na viabilidade dos endósporos em pelo menos uma das linhagens bacterianas avaliadas.

3.2.5.8. Efeitos dos germinantes selecionados na germinação dos endósporos

A avaliação dos germinantes selecionados foi realizada tanto por quantificação da diferença de OD_{600nm} quanto por plaqueamento, sendo avaliados tanto os endósporos das linhagens RZ2MS9 e 168. Para tal, foram utilizadas tanto as suspensões de endósporos digeridos quanto a suspensão somente lavada em água e sem ativação térmica. As suspensões de endósporos foram misturadas aos compostos germinantes (na proporção de 50 uL de suspensão para 1 mL de solução germinante), e imediatamente após a mistura foi aferida a OD_{600nm} inicial. As amostras foram então incubadas a 37°C por 1 h e novamente medidas quanto a OD_{600nm}, sendo também realizada a quantificação de células

totais e endósporos por plaqueamento. Concomitantemente foram aferidos o pHs das soluções germinantes. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

3.2.5.9. Análise de microscopia do efeito dos germinantes selecionados

Para análise de microscopia as suspensões de endósporos lavados e não ativados termicamente do RZ2MS9 e 168 foram misturadas às soluções germinantes na proporção de 50 μ L de suspensão para 1 mL de solução germinante. Estas então foram acondicionadas em tubos tipo Falcons de 15ml (1ml por Falcon) e incubadas a 28°C e agitação de 180 rpm por 24h. Após esse período foram retiradas alíquotas das misturas de células para avaliação das mesmas por meio do microscópio de contraste de fase. Para esse ensaio foram utilizados como controles positivos e negativos para germinação, meio de cultura LB e água deionizada autoclavada, respectivamente. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

3.2.5.10. Efeito dos exsudatos radiculares de milho na germinação dos endósporos das linhagens RZ2MS9 e 168

Para análise do efeito dos exsudatos radiculares de milho na germinação dos endósporos da linhagem RZ2MS9 e 168 foram utilizadas tanto as suspensões de endósporos digeridos quanto os lavados em água e não ativados termicamente. Foram avaliados como possíveis germinantes os exsudatos radiculares do milho híbrido SHS 7939 pró 2 (tanto do milho inoculado, quanto não inoculado com o RZ2MS9) e o extrato do solo utilizado nos ensaios de promoção de crescimento do milho. O efeito da germinação foi aferido pela redução de OD_{600nm}, por plaqueamento e por observação no microscópio de contraste de fase de acordo com os itens 3.2.5.2, 3.2.5.3 e 3.2.5.4 respectivamente. O controle foi o uso de água e as soluções testadas.

Para as análises de microscopia foi adicionado o meio LB como controle positivo da germinação. Sendo somente utilizadas as suspensões de endósporos lavados e não ativados termicamente. As amostras foram incubadas a 28°C e agitação de 180 rpm por 24h. Após esse período, foram retiradas alíquotas das misturas de células para avaliação do estado das mesmas através do microscópio de contraste de fase. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

3.2.5.11. Avaliação do tempo de germinação dos endósporos do RZ2MS9

Para avaliação do tempo de germinação dos endósporos da linhagem RZ2MS9, foram observadas lâminas contendo uma camada de meio LB sólido por cima onde foi espalhado a suspensão de endósporos lavados e não ativados termicamente do RZ2MS9. Essa lâmina foi continuamente monitorada por meio de um microscópio de contraste de fase para observação do processo de germinação dos endósporos. Sendo observados o brilho, tamanho e formato das células por pelo menos 6 h. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.5.12. Curva de viabilidade do RZ2MS9

Para a avaliação da viabilidade dos endósporos do RZ2MS9 ao longo do tempo de armazenagem, o mesmo foi inicialmente crescido nas condições já otimizadas para esporulação (Meio GM 200 a 28 °C, 180 RPM por 72 h) e posteriormente alíquotado em Tubos tipo Falcon de 15 mL que ficaram armazenados no escuro a temperatura ambiente. Iniciando do dia 0, a cada 30 dias, as alíquotas foram avaliadas para medição das quantidades de células totais e endósporos por meio de plaqueamento (item 3.2.5.3). O ensaio foi realizado em quadruplicata e o monitoramento foi realizado por 10 meses.

3.2.6. Análise *in silico* dos genes de esporulação da linhagem RZ2MS9

A análise *in silico* dos genes de esporulação foi realizada baseando-se no trabalho de Galperin et al. (2022). Primeiramente foi montado um banco de dados curado com as proteínas relacionadas a esporulação descritos na literatura. Esse banco de dados foi montado a partir de informações das bases de dados SubtWiki (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Para a base de dados SubtWiki primeiramente foram selecionados todos os genes classificados pela própria base de dados como relacionados a esporulação. Essa classificação é feita com base em resultados de análise de expressão do *B. subtilis* 168 em diferentes condições de crescimento e do seu ciclo de vida fornecendo uma base de dados ampla e curada de genes relacionados ao processo de esporulação (PEDREIRA; ELFMANN; STÜLKE, 2021; VAN GESTEL; ACKERMANN; WAGNER, 2019). Visando não restringir as informações da base de dados à linhagem 168 foi realizado uma busca complementar na base UniProt. Sendo que nesta foi realizado uma busca textual pelo termo esporulação (“sporulation”) restringindo os resultados ao gênero *Bacillus* (taxonomy_id:1386) com evidência pelo menos ao nível de transcrição e cujos dados tenham sido manualmente revisados pelo banco de dados (dados do Swiss Prot) para obtenção de uma lista primária de proteínas relacionadas a esporulação.

Os resultados obtidos por essa pesquisa, nesses dois bancos de dados foram compilados para remoção de sequências duplicadas e posteriormente revisados quanto as referências disponíveis que relacionavam a proteína ao processo de esporulação. Foram selecionados para composição do banco de dados genes que tivessem sua expressão significativamente aumentada durante a esporulação ou cuja perda levasse a alterações no processo, como alteração da velocidade deste, da viabilidade dos endósporos formados ou na germinação dos endósporos. Ao final o banco de dados de proteínas relacionadas a esporulação foi formado por um conjunto de 840 sequências de proteínas, que posteriormente foi classificado de acordo com suas funções de forma análoga a realizada pelo SubtWiki. Sendo categorizados em proteínas de revestimento, pequenas proteínas solúveis em ácido, phosphorelay, proteínas relacionadas a germinação, fatores sigma, proteínas patogênicas de *Bacillus thuringiensis*, outras proteínas relacionadas a esporulação com função conhecida e proteínas de função desconhecida. A lista completa de genes da base de dados está presente Apêndice A e a composição quanto a origem das proteínas selecionadas em relação aos bancos de dados de origem na Figura 8. Concomitantemente a essa busca foram selecionados genomas de *Bacillus* do banco de dados NCBI Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), sendo selecionados genomas com sequenciamento completo pelo menos a nível de cromossomo de *Bacillus* dentro de todo o gênero. Ao final foram selecionados 214 genomas, listados no Apêndice B.

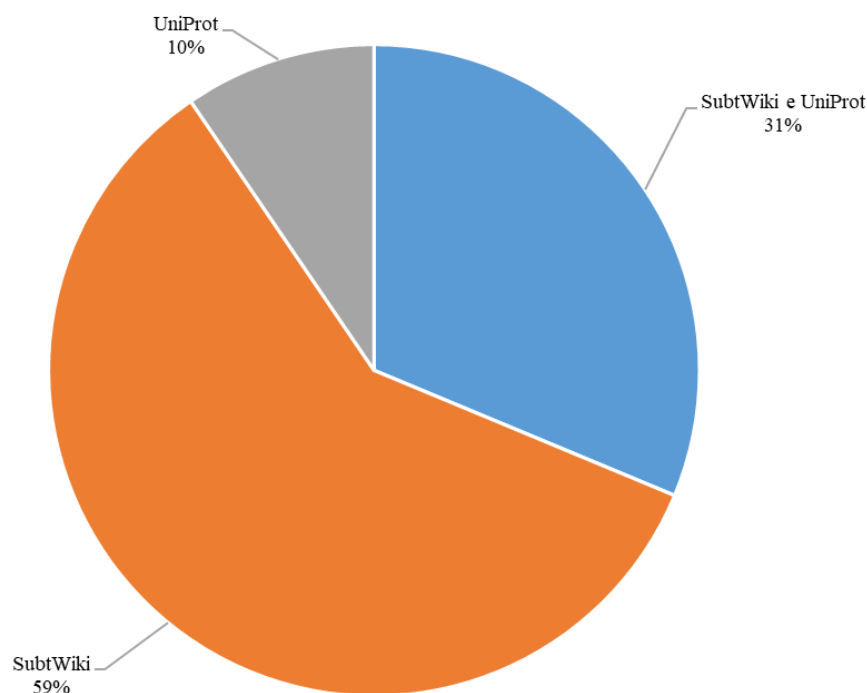


Figura 8. Proporção da origem das sequências utilizados para montagem do banco de dados de proteínas relacionadas a esporulação.

A busca *in silico* por genes relacionadas a esporulação nos genomas selecionados de *Bacillus* spp. foi realizada por meio do BLAST (Versão 2.12.0) utilizando a ferramenta tBLASTn. Os genomas selecionados foram utilizados para montagem de um banco de dados BLAST onde foram realizadas buscas por sequências que tivessem similaridade com as proteínas selecionadas. Os parâmetros de corte utilizados na busca foram um E-value máximo de 10^{-5} , e uma identidade mínima de 45%, tendo-se optado por valores um pouco mais restritivos que os usuais 30% de identidade mínimo para caracterização de homologia entre duas sequencias (ROST, 1999; PEARSON, 2013). Com os resultados dessa busca foi realizada uma matriz de presença e outra de identidade das sequências encontradas que foi associada a uma análise de filogenia dos genomas utilizados para uma avaliação dos resultados sobre um ponto de vista mais evolutivo e taxonômico.

A montagem da análise taxonômica dos genomas utilizados na análise foi realizada por meio do programa PhyloPhlAn 3.0 (ASNICAR et al., 2020), sendo adicionado a essa análise o genoma de *Clostridium botulinum* A str ATCC 3502 para ser utilizada como raiz na montagem da árvore filogenética. Foi utilizada a base de dados PhyloPhlAn nativa do programa, juntamente com o script supermatrix e uma diversidade considerada como baixa. Os resultados do PhyloPhlAn foram submetidos no iTOL (<https://itol.embl.de/>) para montagem da árvore filogenética, bem como para clusterização desta em clados de acordo com a classificação taxonômica original dos genomas. Sendo montados clados de agrupamentos de genomas predominantemente de uma mesma espécie, principalmente se contiverem a linhagem tipo daquela espécie. Concomitantemente os resultados de presença e identidade das proteínas relacionadas a esporulação foram compilados de acordo com as classificações feitas. Tais agrupamentos foram feitos a fim de facilitar a visualização dos resultados através de uma visão mais ampla dos mesmos.

Ao final os genes encontrados no RZ2MS9 na busca *in silico* foram submetidos ao interProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) para predição dos domínios funcionais a fim de se realizarem buscas de domínios de interesse. Principalmente em busca de enzimas utilizando determinados cátions como cofatores ou que usavam alguma molécula de interesse como substrato.

3.2.7. Buscas complementares de genes relacionados à esporulação na anotação do genoma do RZ2MS9

Complementarmente foi realizado uma busca na anotação do genoma do RZ2MS9 depositada no NCBI (GenBank: CP049978.1, BioProject: PRJNA343080) por genes das pequenas proteínas solúveis em ácido (relacionadas a montagem dos endósporos) e genes relacionados as proteínas de germinação dos endósporos.

3.2.8. Análise estatística

A análise estatística dos ensaios foi realizada utilizando o programa R (versão 4.3.0). Foram realizados testes (ANOVA, teste F e Scott Knott) para a análise de dados, sendo utilizado os pacotes lattice (versão 0.21-8) e lmtest (versão 0.9-37) para avaliação das pressuposições da ANOVA e o pacote Scott Knott (versão 1.3-0) para realização dos testes de média. Os resultados foram primeiramente analisados quanto as pressuposições da ANOVA antes da realização da mesma a fim de se determinar como os dados seriam analisados (principalmente no caso de ensaios no esquema fatorial para determinar se os resultados para um mesmo fator seriam analisados juntos, em caso de efeito de interação não significativo, ou separados, para interação significativa entre os dois fatores). Sendo observada a presença de uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Pela ANOVA e pelo teste F) foi realizado o teste de Scott Knott para agrupamento das médias estatisticamente iguais. Para todos os ensaios adotou-se um alfa de 5%. Para a montagem de gráficos nas análises exploratórias foram utilizados os softwares R e Excel (Office Home and Student 2019).

3.3. Resultados

3.3.1. Otimização da esporulação do RZ2MS9

Durante o teste de otimização de germinação observou-se uma grande variação entre os resultados dos meios testados (Figura 9 e 10). Dos 16 meios avaliados, apenas 2 atingiram o corte de 75% de esporulação, sendo estes os meios GM 200 e CCY. Sendo escolhido o meio GM 200 como padrão para esporulação do RZ2MS9 dado que este obteve uma maior quantidade de células que o CCY. Além disso, também se observou que muitos dos meios referidos na literatura como sendo para esporulação de *Bacillus* obtiveram resultados aquém do esperado, com um deles, M11, tendo uma proporção média de endósporos inferior a 5%. Concomitante a isso, observa-se que para linhagem RZ2MS9 a redução da concentração de nutrientes no meio não necessariamente leva a um aumento da esporulação, sendo a adição de sais CCY aos meios apresentando maiores efeitos para o incremento do percentual de endósporos medido.

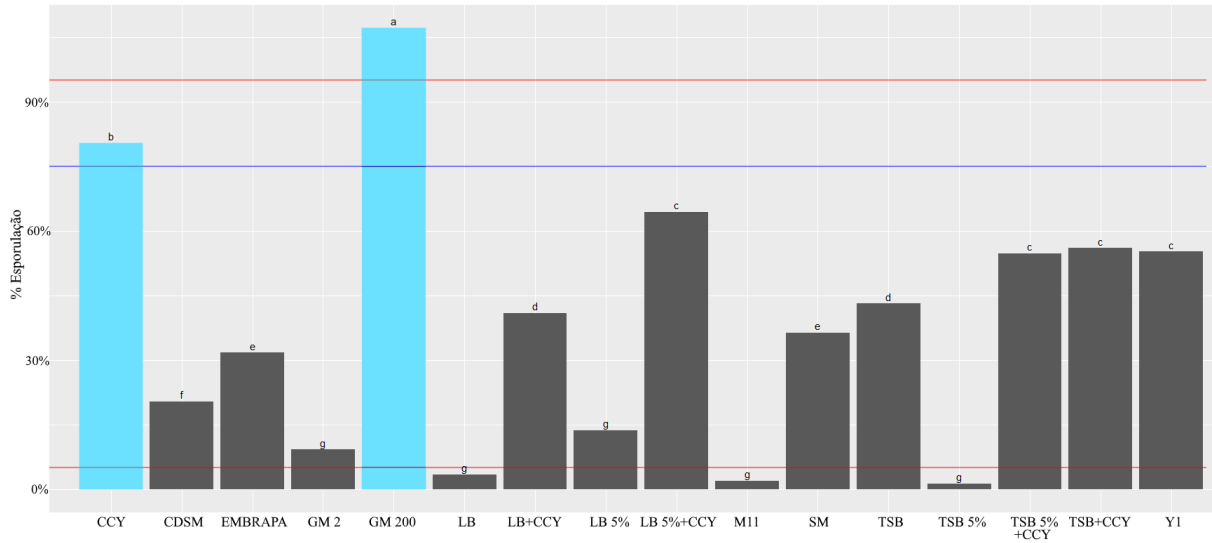


Figura 9. Taxa de esporulação da linhagem *B. thuringiensis* RZ2MS9 em diferentes meios. A linha vermelha na parte inferior do gráfico marca o valor de 5% de esporulação enquanto que a linha vermelha na parte superior do gráfico marca os 95% de esporulação. A linha azul marca o corte adotado de 75%. As barras em azul claro marcam os meios que tiveram média de esporulação acima do corte estabelecido. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott Knott para um alfa estabelecido de 5%.

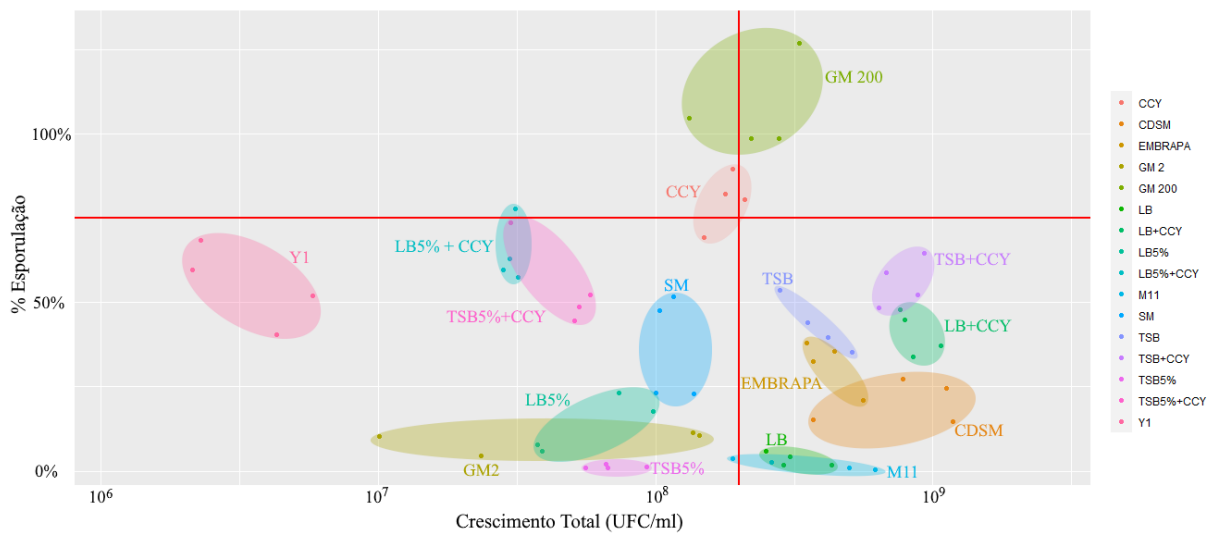


Figura 10. Correlação entre crescimento total e percentual de esporulação dos meios testados. A linha vermelha horizontal marca os 75% de esporulação estabelecido e a linha vermelha vertical marca os $2 \cdot 10^8$ UFC/ml.

Não foi observada diferença significativa na taxa de esporulação da linhagem RZ2MS9 no meio GM 200 utilizando diferentes matérias primas. (Figura 11). Em termos de médias absolutas a versão modificada do meio apresentou uma média de esporulação um pouco abaixo dos 75% inicialmente estabelecidos. Essa redução do percentual de endósporos levanta um pequeno alerta em relação a questão da qualidade da matéria prima, entretanto estatisticamente (muito em função da alta variação observada no ensaio) não é possível afirmar que essas médias diferem entre si para um alfa estabelecido de 5%.

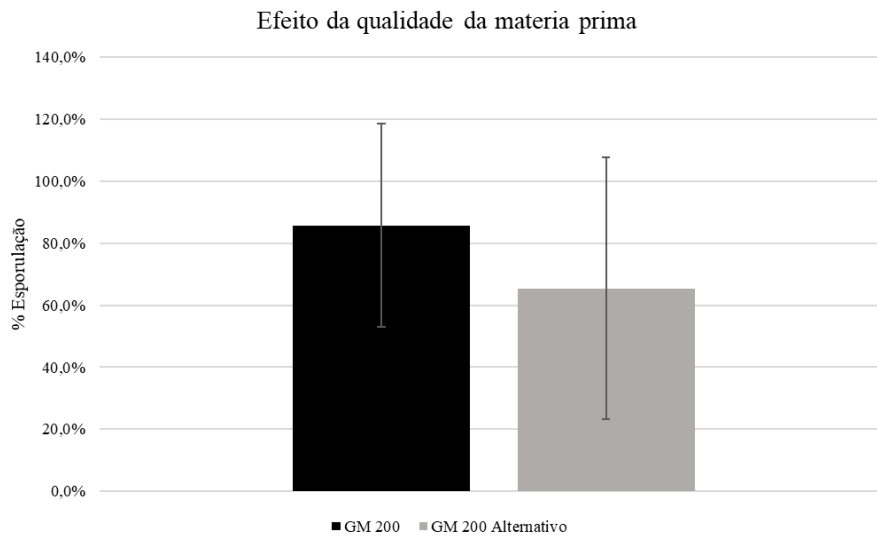


Figura 11. Efeito da matéria prima do meio GM200 na taxa de esporulação do RZ2MS9.

Já em relação à curva de esporulação no meio GM 200, observou-se que a partir de 36 h de crescimento foi possível obter uma amostra completamente esporulada do RZ2MS9 para as condições de crescimento testadas (Figura 12). Não foram observadas variações biológicas pertinentes no percentual de endósporos após esse período de crescimento. Após 48 h de crescimento observa-se uma pequena tendência de redução do número total de células, mas que não chega a ser estatisticamente significativa. Apesar da esporulação ser completa após 36 h de crescimento no meio GM 200 optou-se por padronizar o tempo de crescimento para obtenção de endósporos do RZ2MS9 em 72 h, garantindo mais 36 h de crescimento para se evitar imprevistos com possíveis atrasos no processo de esporulação. Já para a obtenção de células vegetativas adotou-se como padrão o crescimento por 24 h meio GM 200, dado que neste ponto a amostra ainda apresenta um percentual de esporulação inferior a 5 %.

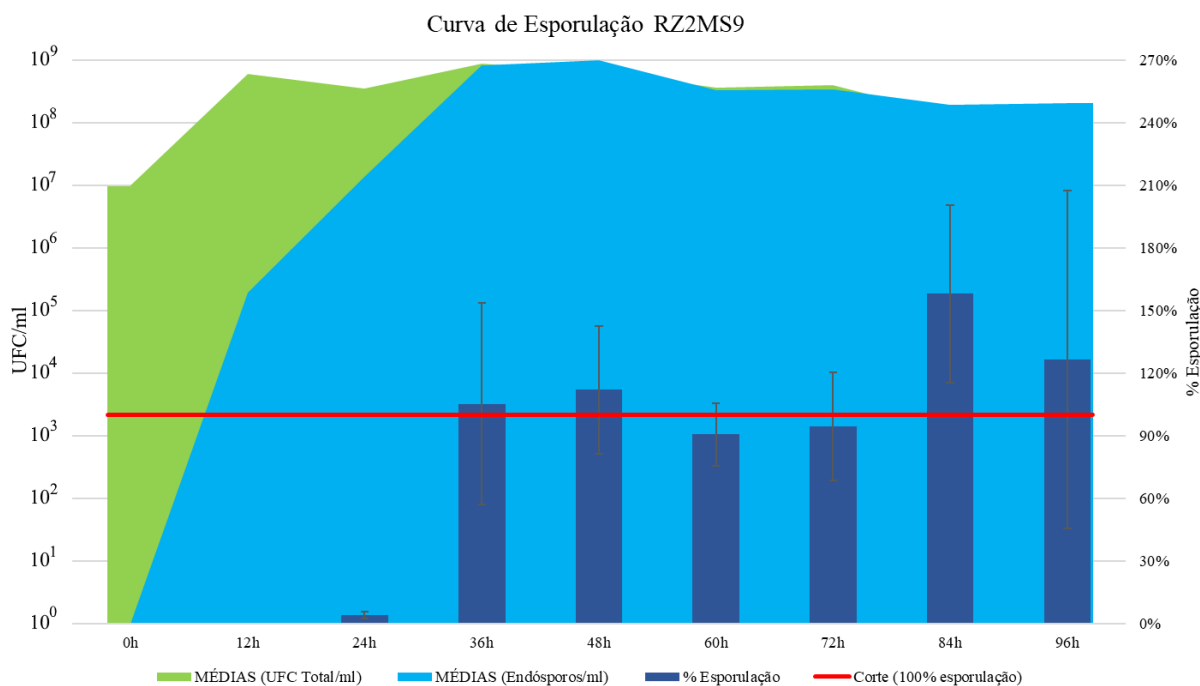


Figura 12. Curva de esporulação do RZ2MS9 em meio GM 200. As áreas verde e azul claro no gráfico representam os teores absolutos (em UFC/ml) de total de células e endósporos, respectivamente, medidos em cada tempo do ensaio. As barras em azul escuro representam o percentual de endósporos medidos em cada tempo, com a linha vermelha marcando o valor de 100% de esporulação.

3.3.2. Efeito do estado do RZ2MS9 nas suas dinâmicas de promoção de crescimento vegetal

3.3.2.1. Ensaio em germitest

Os dois ensaios de promoção de crescimento vegetal realizados apresentaram resultados bastante diferentes, mas complementares. No ensaio em germitest observou-se diferenças significativas em função dos tratamentos para 96,67 % das 30 variáveis observadas, sendo observados efeitos significativos de interação entre dosagem e tipo de inóculo para 36,67% delas. Em função disso o desdobramento dos resultados para avaliação dos resultados foi feito caso a caso, a depender ou não se a interação entre os dois fatores testados foi ou não significativa. Para efeito de padronização da visualização os resultados presentes nos Apêndices D a O, foram colocados desdobrando os fatores do experimento, entretanto para as variáveis onde o efeito observado foi do tipo simples os resultados foram analisados de forma conjunta. Foram separados os desdobramentos para o mero fator de visualização.

Plotando os dados de comprimento das raízes em função das diferentes classes de diâmetro, observou-se uma tendência de incrementos do comprimento das diferentes classes de raízes em função da inoculação do RZ2MS9 com o efeito sendo mais pronunciado em algumas classes em específico (Figura 13). Observou-se uma maior quantidade de picos relacionada ao efeito de células vegetativas. Havendo um maior número de variáveis onde o inóculo vegetativo aparece como superior em relação ao controle e ao inóculo de endósporos (Apêndices J a O). Esses resultados também ficam evidenciados pelos dados compilando os percentuais das variáveis analisadas onde cada efeito apresentou incrementos estatisticamente superiores em relação aos demais (nas tabelas 22 e 23).

Incremento relativo do comprimento das raízes por classe de diâmetro

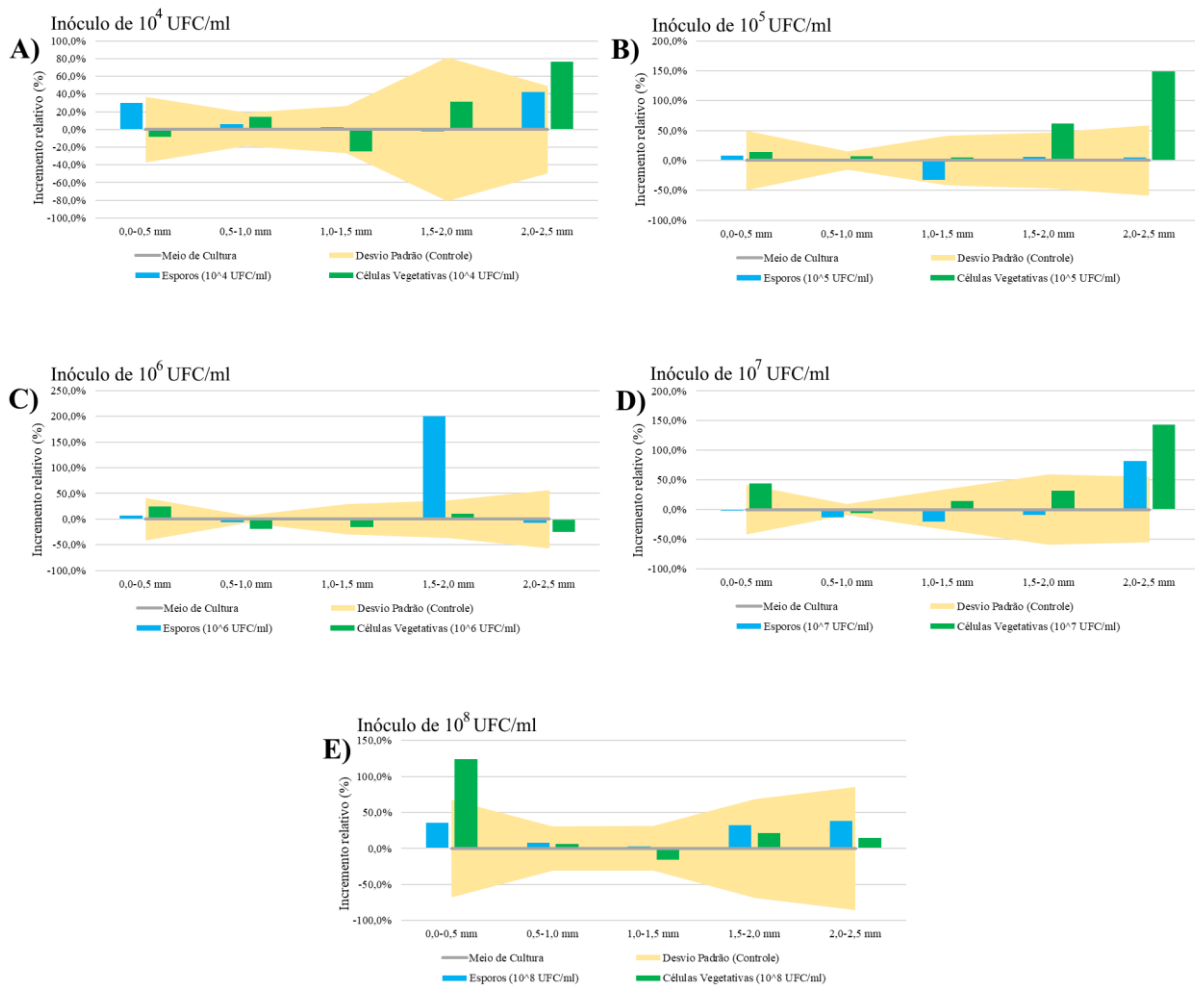


Figura 13. Perfil do incremento relativo do comprimento de raízes do milho em função da classe de diâmetro para o ensaio em papel germitest. A) Resultados para o inóculo de 10^4 UFC/ml. B) Resultados para o inóculo de 10^5 UFC/ml. C) Resultados para o inóculo de 10^6 UFC/ml. D) Resultados para o inóculo de 10^7 UFC/ml. E) Resultados para o inóculo de 10^8 UFC/ml.

Tabela 22. Efeito geral das dosagens do RZ2MS9 na promoção de crescimento do milho em germitest

		Dosagem (UFC/ml)				
		10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Inóculo	Esporos	40,0% (12)	53,3% (16)	40,0% (12)	20,0% (6)	10,0% (3)
	Células Vegetativas	36,7% (11)	56,7% (17)	23,3% (7)	33,3% (10)	6,7% (2)
	Meio de cultura	36,7% (11)	50,0% (15)	26,7% (8)	26,7% (8)	3,3% (1)
MÉDIA		37,8% (11)	53,3% (16)	30,0% (9)	26,7% (8)	6,7% (2)

* Percentual das variáveis do ensaio de promoção de crescimento de milho em germitest onde o efeito da dosagem apresentou incrementos estatisticamente superior em relação a cada tipo de inóculo testado. Números entre parênteses indicam o número absoluto de variáveis estatisticamente significativas.

Tabela 23. Efeito geral dos inóculos do RZ2MS9 na promoção de crescimento do milho em germitest

		Inóculo		
		Esporos	Células Vegetativas	Meio de cultura
Dosagem (UFC/ml)	10 ⁴	6,7% (2)	16,7% (5)	0% (0)
	10 ⁵	3,3% (1)	26,7% (8)	0% (0)
	10 ⁶	16,7% (5)	16,7% (5)	0% (0)
	10 ⁷	6,7% (2)	23,3% (7)	0% (0)
	10 ⁸	6,7% (2)	16,7% (5)	0% (0)
MÉDIA		8,0% (2)	20,0% (6)	0% (0)

* Percentual das variáveis do ensaio de promoção de crescimento de milho em germitest onde o efeito do tipo de inóculo apresentou incrementos estatisticamente superior em relação a cada concentração de inoculante testada. Números entre parênteses indicam o número absoluto de variáveis estatisticamente significativas.

3.3.2.2. Ensaio em casa de vegetação

O ensaio realizado em casa de vegetação demonstrou diferenças significativas em função dos tratamentos para todos os 40 tratamentos observados. Foi observado efeitos significativos de interação entre dosagem e tipo de inóculo para 42,50 % das variáveis observadas. Em função disso o desdobramento dos resultados para avaliação destes foi realizado caso a caso, a depender ou não se a interação entre os dois fatores testados foi ou não significativa. Para efeito de padronização da visualização os resultados estão presentes nos Apêndices P a AA desdobrando dos fatores do experimento, entretanto para as variáveis onde o efeito observado foi do tipo simples os resultados foram analisados de forma conjunta, sendo separados nos desdobramentos para mero fator de visualização.

Plotando os dados de comprimento das raízes em função das diferentes classes de diâmetro (Figura 14). Observou-se uma tendência de incrementos do comprimento das diferentes classes de raízes em função da inoculação do RZ2MS9 sendo observados maiores números em função da inoculação na forma de células vegetativas. Essa observação corrobora o resultado presentes Apêndices V a AA, onde há um maior número de variáveis onde o inóculo vegetativo aparece como superior em relação ao controle e ao inóculo de endósporos. Esses resultados também ficam evidenciados nos dados compilados dos percentuais das variáveis analisadas onde cada efeito apresentou incrementos estatisticamente superiores em relação aos demais (nas tabelas 24 e 25).

Dá-se um destaque aos efeitos observados na aplicação equivalente a 10⁷ UFC/ml, onde as únicas variáveis onde se observou efeito de inoculação não se observou efeito de interação entre dosagem e interação. Ou seja dentro do nível de confiança de 95% estabelecido os resultados encontrados nessa dosagem não se diferiram o suficiente dos demais para justificar uma análise separada. Nesses casos os dados de inoculação foram avaliados conjuntamente

mitigando as reduções observadas nessa dosagem de aplicação. Assim por mais que nesse tratamento as médias com a inoculação tenham sido sempre numericamente inferiores ao controle, estatisticamente essa queda não foi significativa.

Incremento relativo do comprimento das raízes por classe de diâmetro

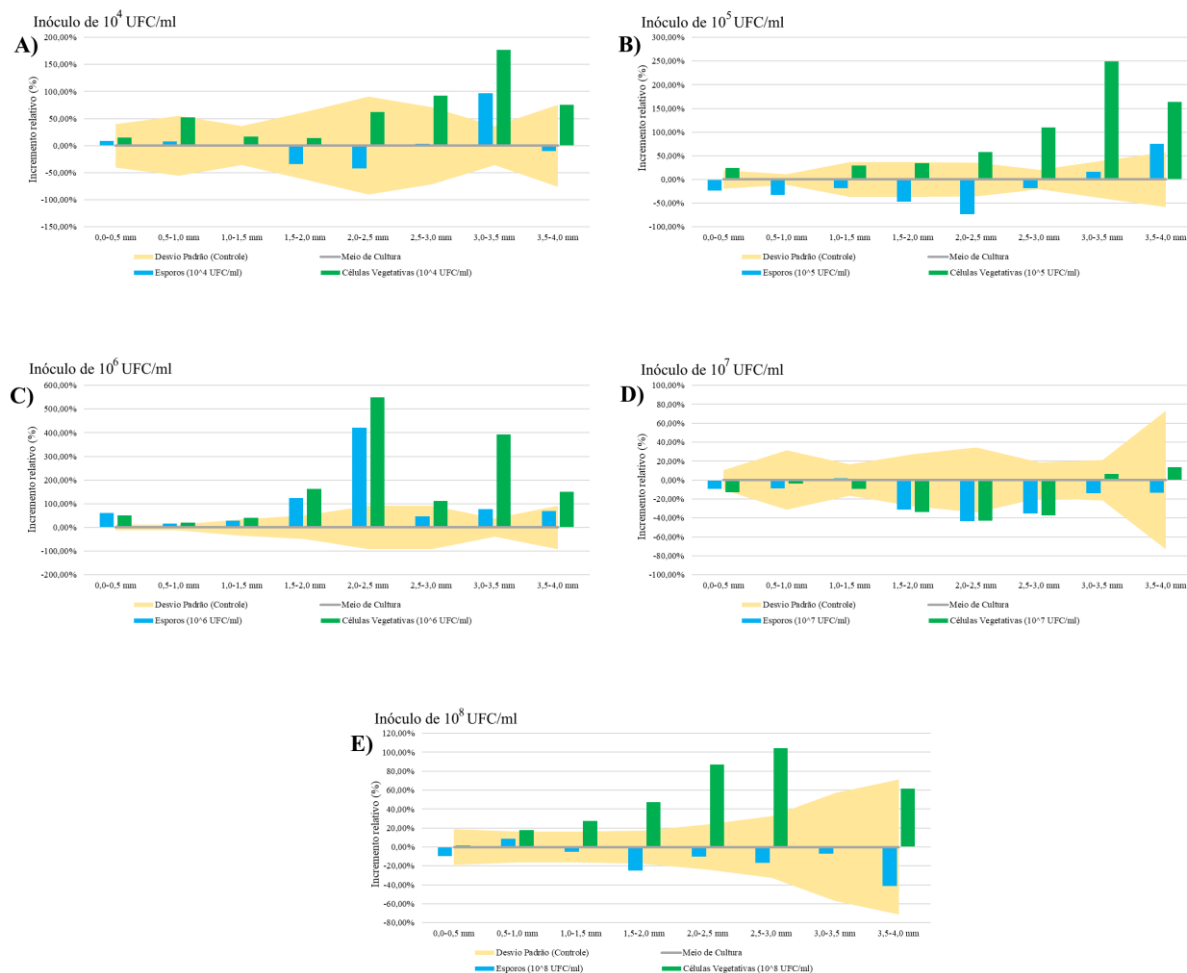


Figura 14. Perfil do incremento relativo do comprimento de raízes do milho em função da classe de diâmetro para o ensaio em casa de vegetação. A) Resultados para o inóculo de 10^4 UFC/ml. B) Resultados para o inóculo de 10^5 UFC/ml. C) Resultados para o inóculo de 10^6 UFC/ml. D) Resultados para o inóculo de 10^7 UFC/ml. E) Resultados para o inóculo de 10^8 UFC/ml

Tabela 24. Efeito das dosagens do RZ2MS9 na promoção de crescimento do milho em casa de vegetação

	Dosagem (UFC/ml)				
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Esposos	27,5 % (11)	0,0 % (0)	27,5 % (11)	27,5 % (11)	27,5 % (11)
Inóculo Células Vegetativas	0,0 % (0)	0,0 % (0)	0,0 % (0)	0,0 % (0)	0,0 % (0)
Meio de cultura	25,0 % (10)	22,5 % (9)	5,0 % (2)	32,5 % (13)	32,5 % (13)
MÉDIA	17,5 % (7)	7,5 % (3)	10,8 % (4)	20,0 % (8)	20,0 % (8)

* Percentual das variáveis do ensaio de promoção de crescimento de milho em casa de vegetação onde o efeito da dosagem apresentou incrementos estatisticamente superior em relação a cada tipo de inóculo testado. Números entre parênteses indicam o número absoluto de variáveis estatisticamente significativas.

Tabela 25. Efeito geral dos inóculos do RZ2MS9 na promoção de crescimento do milho em casa de vegetação

		Inóculo		
		Esporos	Células Vegetativas	Meio de cultura
Dosagem (UFC/ml)	10 ⁴	0,0 % (0)	77,5 % (31)	0,0 % (0)
	10 ⁵	0,0 % (0)	75,0 % (30)	0,0 % (0)
	10 ⁶	40,0 % (16)	95,0 % (38)	0,0 % (0)
	10 ⁷	0,0 % (0)	57,5 % (23)	0,0 % (0)
	10 ⁸	0,0 % (0)	70,0 % (28)	0,0 % (0)
MÉDIA		8,0 % (3)	75,0 % (30)	0,0 % (0)

* Percentual das variáveis do ensaio de promoção de crescimento de milho em casa de vegetação onde o efeito do tipo de inóculo apresentou incrementos estatisticamente superior em relação cada dosagem de inoculante testada. Números entre parênteses indicam o número absoluto de variáveis estatisticamente significativas.

3.3.3. Dinâmicas de germinação dos endósporos do RZ2MS9

3.3.3.1. Teste de germinação em L-Alanina

Na avaliação da resposta dos endósporos das linhagens RZ2MS9 e 168 à L-alanina observou-se resultados bastante distintos entre as duas linhagens (Figura 15). Para a linhagem RZ2MS9 não se observou diferenças significativas de redução de OD_{600nm} em relação ao controle, apesar de ter sido observado uma redução de OD_{600nm} levemente maior nos esporos de RZ2MS9 tratados termicamente ou digeridos. Dessa forma, apesar do teste em L-alanina ser o padrão para medição de germinação de endósporos de *Bacillus* spp. não foi possível fazer essa avaliação para a linhagem RZ2MS9. Por sua vez, para a linhagem 168 todos os tratamentos diferiram entre si e do controle, demonstrando uma crescente na sensibilidade ao germinante em função de um maior processamento dos endósporos coletados. Tal resultado valida a efetividade do protocolo utilizado na observação da germinação de *Bacillus*, ao mesmo tempo que valida a insensibilidade do RZ2MS9 para esse germinante padrão.

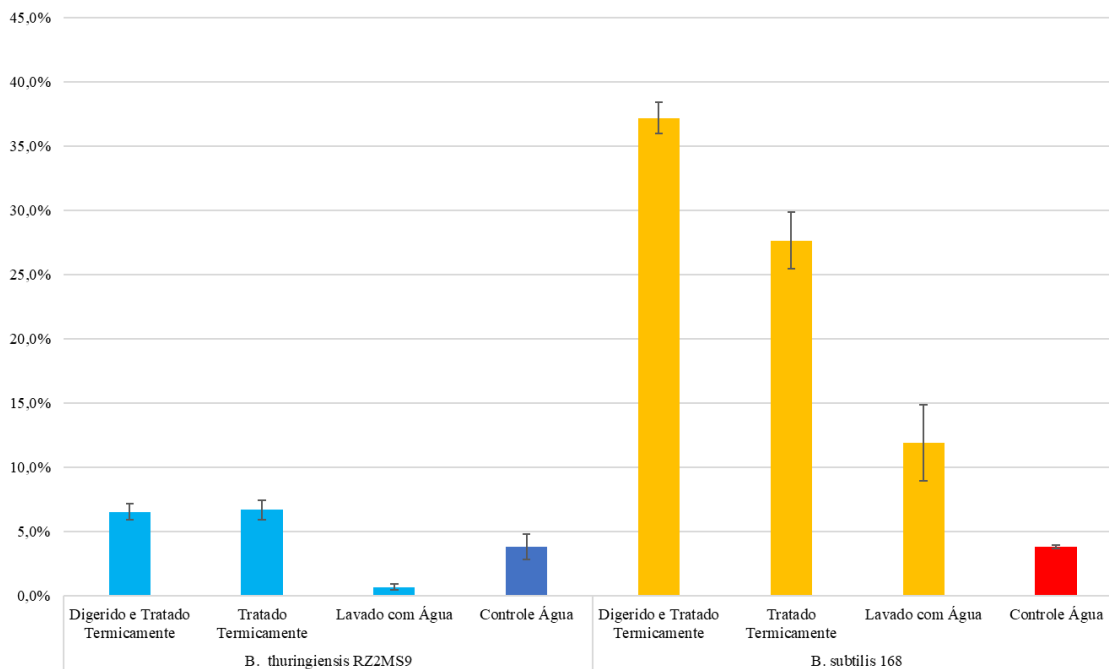


Figura 15. Redução da OD_{600nm} das linhagens RZ2MS9 e 168 de *Bacillus* na presença de L-Alanina (10mM) em função dos diferentes tratamentos das suspensões de endósporos. No gráfico não foi feito o desconto da redução natural de OD_{600nm} aferida no controle (água) para o destaque da mesma e comparação com os demais resultados.

3.3.3.2. Análise da germinação dos endósporos dos *Bacillus* RZ2MS9 e 168 em diferentes substratos

Na triagem inicial foi possível observar um efeito de ácidos, aminoácidos de caráter ácido e L-Alanina na germinação da linhagem 168, (Figura 16). Para a linhagem RZ2MS9 o efeito se restringiu aos compostos de caráter ácido. A redução na quantidade de endósporos resistentes das linhagens RZ2MS9 e 168 parece ter se dado principalmente em função do pH, dado que esta ocorreu também no HCl e não foi observada nos respectivos sais orgânicos dos ácidos testados. As substâncias que apresentaram efeito sobre a quantidade de endósporos resistentes das linhagens RZ2MS9 e 168 foram selecionados para os demais ensaios de avaliação da germinação.

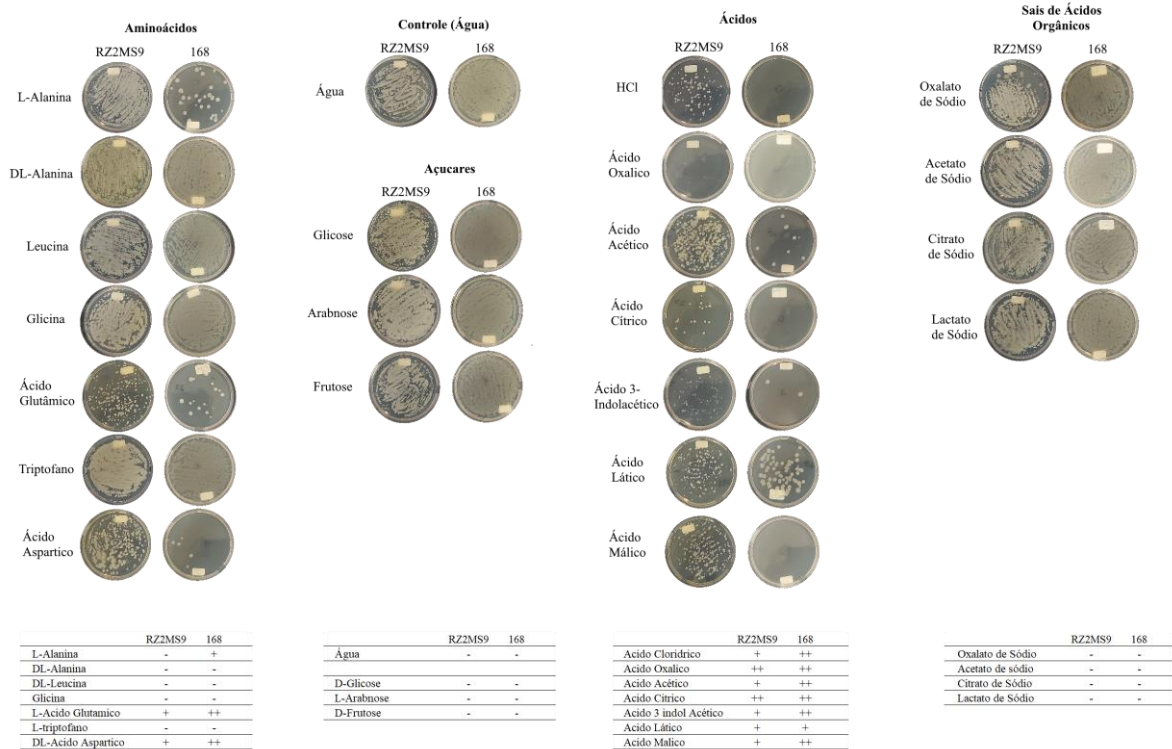


Figura 16. Efeito de compostos orgânicos e HCl na germinação do RZ2MS8 e 168. - Sem efeito, número de colônias acima de 300 (incontável). + Efeito mediano, número de colônias entre 30 e 300 (redução de pelo menos 1 diluição na viabilidade dos endósporos). ++ Efeito alto, número de colônias menor que 30 (redução de pelo menos 2 diluições na viabilidade dos endósporos).

Para o ensaio avaliando o efeito dos possíveis germinantes selecionados na OD medida também se observou uma significativa redução das ODs nos compostos ácidos, figura 17, com o RZ2MS9 novamente não mostrando efeitos em função da exposição a L-Alanina. Nesse ponto ressalta-se que as reduções de OD_{600nm} aferidas em compostos ácidos se deram principalmente pela precipitação dos endósporos, fenômeno que não foi observado com o 168 em L-alanina (onde a OD_{600nm} se reduziu sem que houvesse uma precipitação de células).

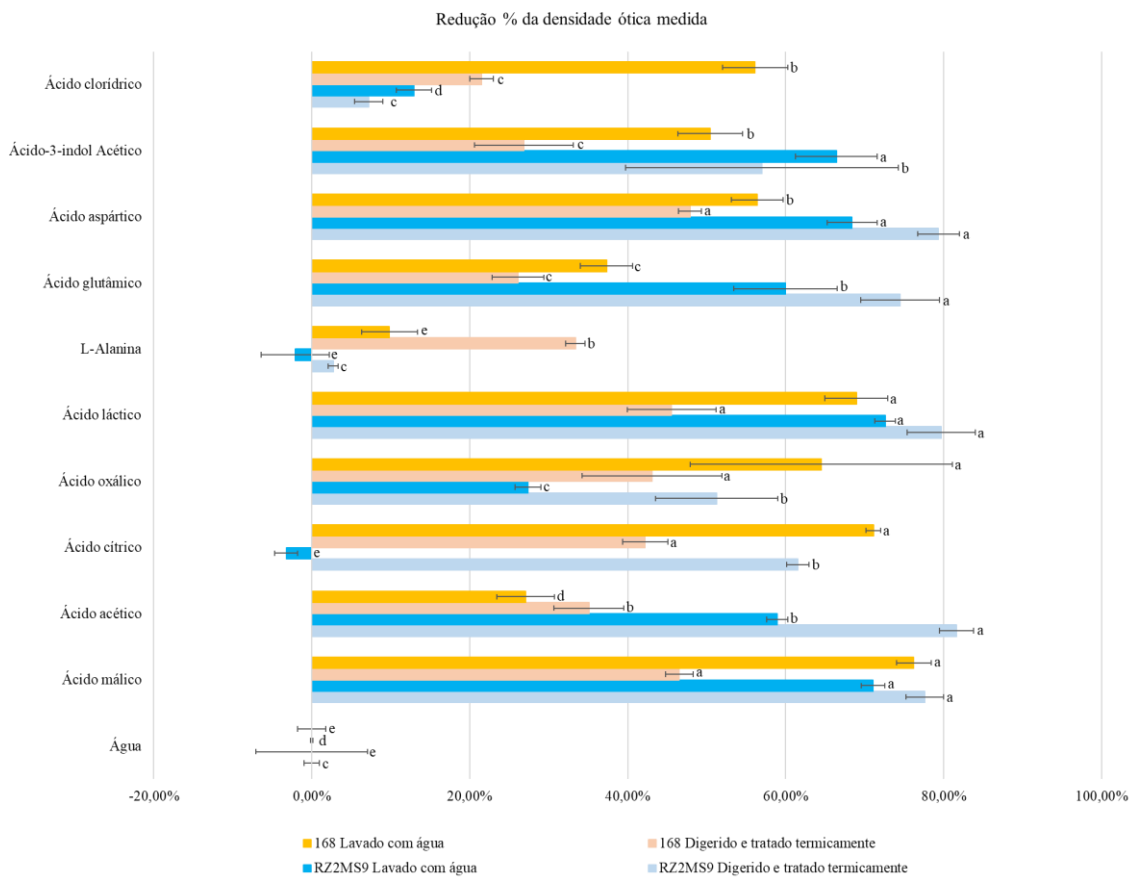


Figura 17. Efeito dos possíveis germinantes selecionados na redução da OD_{600nm} após 1h de incubação. Letras iguais para o mesmo tratamento não diferem entre si para o teste de scott knott a um alfa estabelecido de 5%.

Para o ensaio medindo o efeito dos germinantes selecionados na viabilidade dos endósporos observou-se novamente, ao menos parcialmente, o efeito do pH sobre a viabilidade dos endósporos ao medir os percentuais de queda da quantidade de endósporos e se correlacionar eles com o pH medido das soluções de germinação, figura 18. Sendo significativo o efeito de regressão entre as alterações na proporção de endósporos e o pH, foi adotado o modelo quadrático para os dados do 168 e linear para o RZ2MS9, em função dos melhores ajustes para os respectivos dados considerando os modelos de regressão polinomiais. Para os dados do 168 observa-se um bom ajuste da curva as observações, tendo a regressão quadrática um R² de 94%, entretanto para o RZ2MS9 não é possível ver um padrão claro de regressão, com o modelo linear apresentando um R² de 58%.

Para a regressão correlacionando os valores de pH com a redução percentual no total de células das amostras obteve-se um efeito significativo para a regressão, entretanto nenhum dos modelos polinomiais testados apresentou um bom ajuste para o conjunto e dados, sendo ilustrado na figura 18 a regressão para o modelo linear. Apesar do teste realizado não ter sido delineado para avaliar o efeito do pH, sendo necessários mais testes para avaliação desse possível efeito, os efeitos observados dão indicio de que este pode ser uma variável importante para a resistência dos endósporos, ao mesmo tempo que não necessariamente afetam a viabilidade total das células. Sendo também observado um comportamento diferente entre as duas linhagens avaliadas.

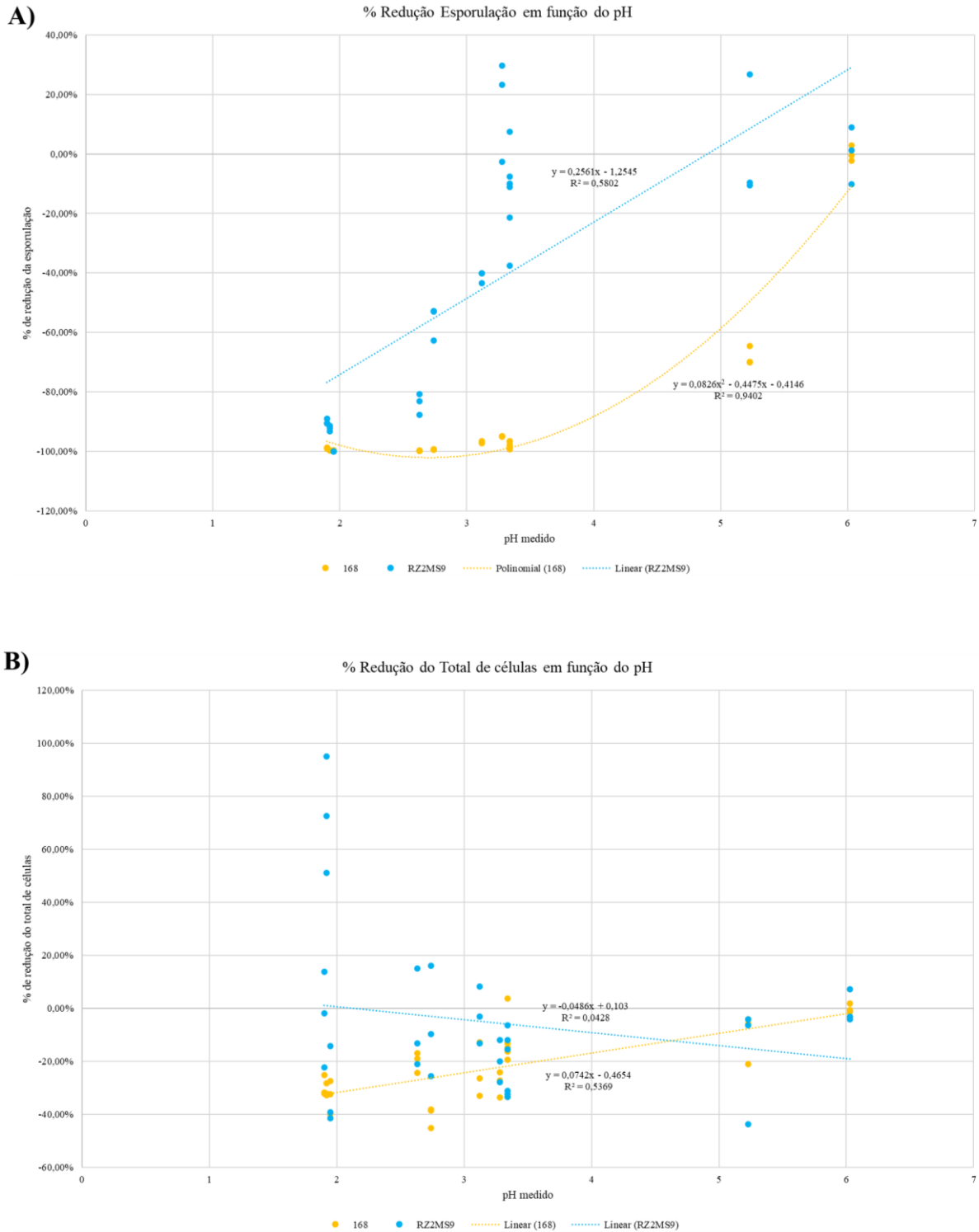


Figura 18. Resultado das regressões do pH dos germinantes testados. A) Relação entre o pH e o percentual de redução dos endósporos termo resistentes medidos. B) Relação entre o pH e total de células viáveis medido.

Comparando os efeitos dos germinantes testados, figura 19, observa-se uma maior sensibilidade do 168 aos compostos testados, havendo uma redução significativa tanto da proporção de endósporos quanto da viabilidade total das células. Para o 168 foram observadas reduções significativas no total de células viáveis em relação ao controle (água) para todos os tratamentos testados a exceção da L-Alanina. Para o RZ2MS9 não se observou uma redução significativa da viabilidade total de células em relação o controle (água), sendo inclusive observado um significativo

incremento no total de células para o tratamento com ácido cítrico. Concomitantemente para o 168 todos os tratamentos testados levaram a uma redução da proporção de endósporos na amostra, enquanto que para o RZ2MS9 essa redução não foi observada para os tratamentos com ácido acético, L-alanina e ácido glutâmico. Tais resultados acabam levantando dúvidas se os efeitos observados de fato se referem a germinação dos endósporos ou a algum efeito de toxicidade dos compostos testados. Além disso observa-se uma consistente maior variância nas observações com o RZ2MS9 o que também dificulta comparações entre essas duas linhagens.

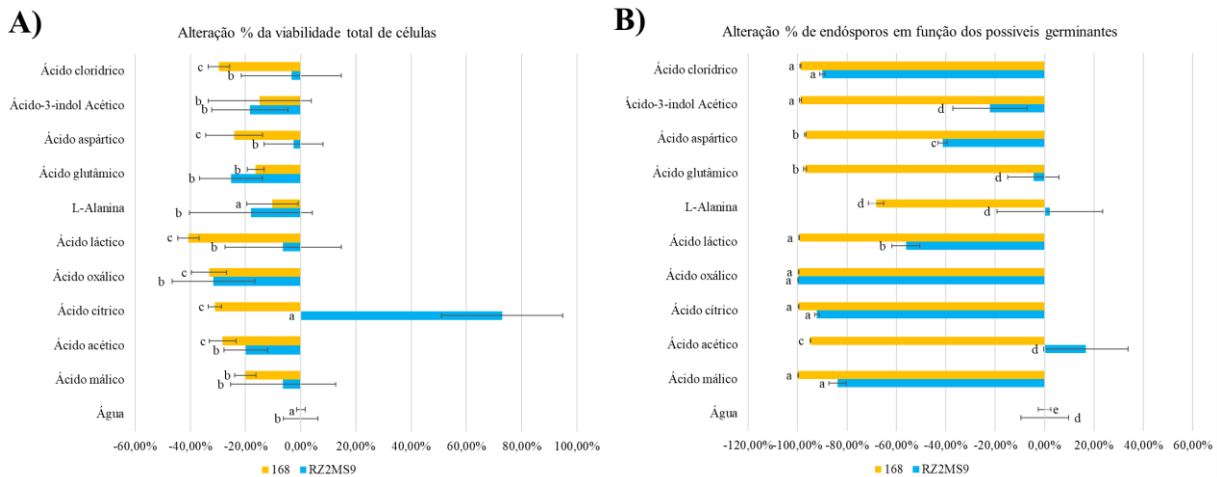


Figura 19. Efeito dos possíveis germinantes selecionados na resistência dos endósporos e na viabilidade total de células dos *Bacillus* testados. A) Efeito das substâncias testadas na contagem total das células (Alteração percentual do total de UFC contadas). B) Efeito das substâncias testadas na contagem dos endósporos (Alteração percentual na quantidade de endósporos contados). Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%.

Complementando os ensaios quantitativos com os possíveis germinantes testados no ensaio de microscopia para o RZ2MS9, observou-se a presença de algumas células vegetativas em quase todas as substâncias testadas, com exceção do controle (água) e do HCl, figura 20. Em todos esses tratamentos a presença de células vegetativas foi bastante diminuta em relação a quantidade de endósporos (menos de 5%), com exceção do controle positivo com LB onde a maioria das células estava no estado vegetativo, entretanto a não observação destas no controle e no tratamento com HCl levanta a possibilidade de algum pequeno efeito das substâncias testadas na germinação dessa linhagem de *Bacillus*. Por sua vez no 168 somente foram observadas células vegetativas no controle positivo (LB) e na L-Alanina, sendo que neste último somente foram observadas algumas poucas células vegetativas (menos de 5% do total de células), figura 21.

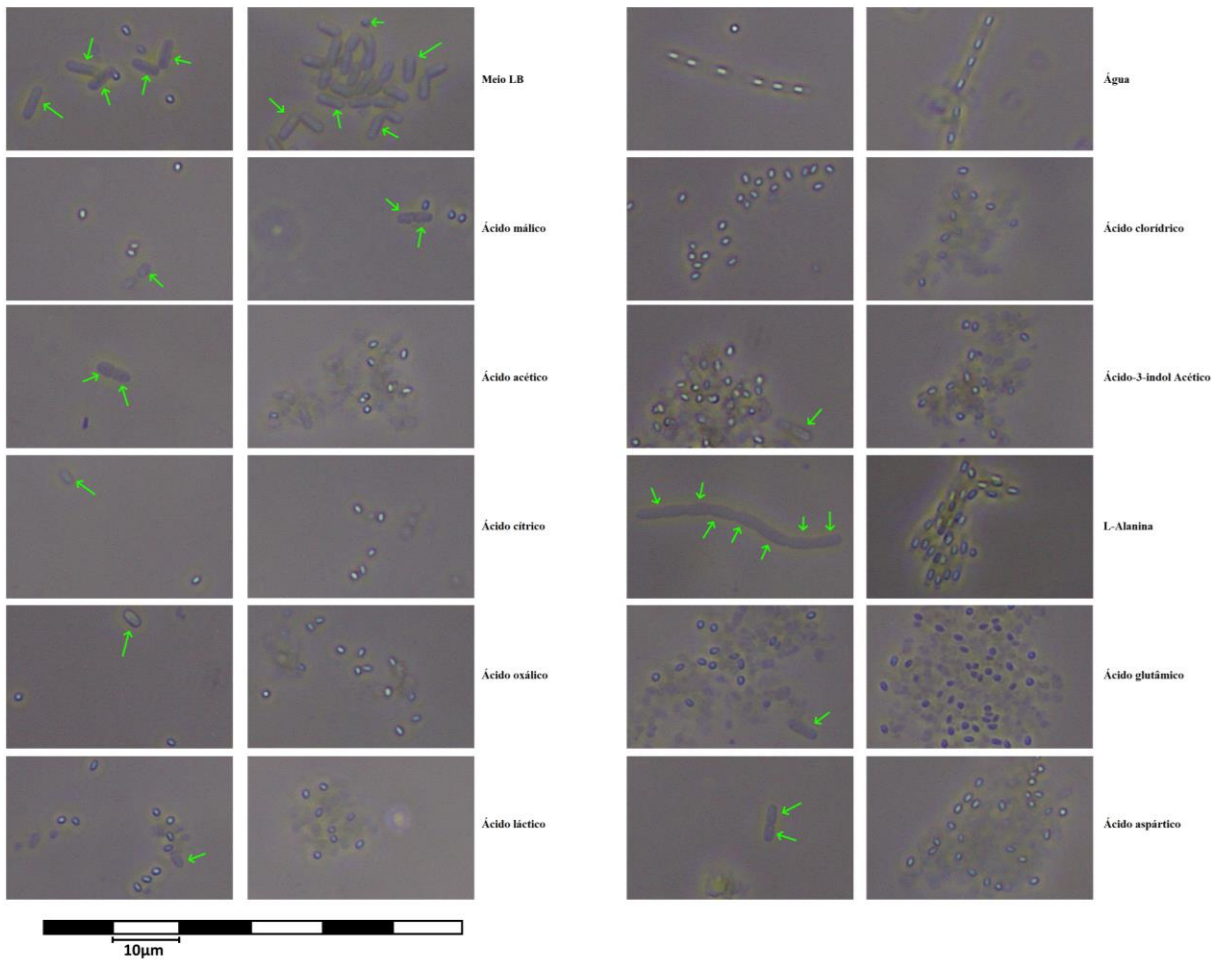


Figura 20. Resultados do ensaio de microscopia com os possíveis germinantes testados para o RZ2MS9. Setas em verde indicam células vegetativas do RZ2MS9 nas imagens.

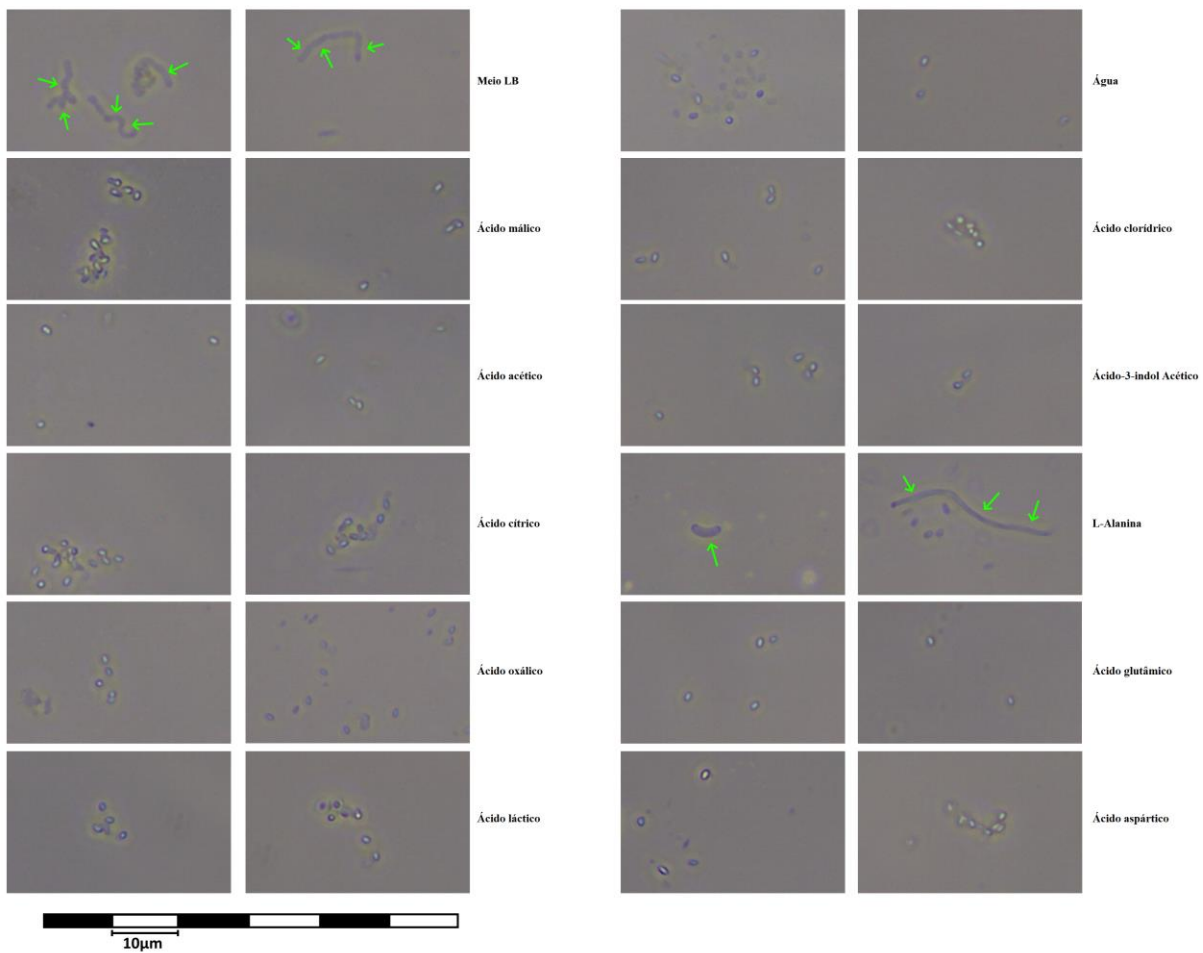


Figura 21. Resultados do ensaio de microscopia com os possíveis germinantes testados para o 168. Setas em verde indicam células vegetativas do 168 nas imagens.

Na tabela 26 foi compilado os resultados dos três ensaios realizados para a avaliação dos endósporos lavados (das linhagens RZ2MS9 e 168 de *Bacillus*) nas diferentes soluções germinantes, evidenciando as diferenças de comportamento entre essas duas linhagens avaliadas.

Tabela 26. Compilação dos resultados de germinação dos endósporos lavados dos *Bacillus* RZ2MS9 e 168 em diferentes substratos

	% de variação						Germinação de células no microscópio	
	OD600nm		Contagem de endósporos		Contagem de células totais		RZ2MS9	168
	RZ2MS9	168	RZ2MS9	168	RZ2MS9	168		
Água	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	-	-
Ácido málico	-71,09%	-76,21%	-83,84%	-99,76%	-6,39%	-20,07%	+	-
Ácido acético	-58,93%	-27,07%	16,73%	-94,87%	-19,92%	-28,32%	+	-
Ácido cítrico	3,24%	-71,11%	-92,20%	-99,68%	72,93%	-31,09%	+	-
Ácido oxálico	-27,34%	-64,52%	-99,96%	-99,61%	-31,58%	-33,20%	+	-
Ácido láctico	-72,59%	-68,94%	-56,14%	-99,33%	-6,39%	-40,66%	+	-
L-Alanina	2,11%	-9,82%	2,15%	-68,13%	-18,05%	-10,30%	+	+
Ácido glutâmico	-59,96%	-37,31%	-4,52%	-96,97%	-25,19%	-16,34%	+	-
Ácido aspártico	-68,41%	-56,37%	-41,26%	-96,85%	-2,63%	-24,09%	+	-
Ácido-3-indol Acético	-66,41%	-50,46%	-22,18%	-98,78%	-18,42%	-14,85%	+	-
Ácido clorídrico	-12,93%	-56,11%	-90,01%	-98,83%	-3,38%	-29,64%	-	-

+ Positivo para germinação com a observação de células vegetativas por microscopia de contraste de fase; - Negativo para germinação, não sendo observado nenhuma célula vegetativa por microscopia de contraste de fase.

3.3.3.3. Efeito dos exsudatos radiculares de milho na germinação dos endósporos das linhagens RZ2MS9 e 168

Observando o efeito dos exsudatos radiculares de milho e do extrato de solo na germinação dos endósporos do RZ2MS9 e 168, destaca-se um forte efeito de morte das células do RZ2MS9 digerido e tratado termicamente concomitante a um significativo incremento do percentual de endósporos do RZ2MS9 aferido pelo plaqueamento (Figura 22). Também se observou um aumento de sensibilidade dos endósporos do RZ2MS9 à presença dos exsudatos e extrato de solo. Sendo observado uma grande morte celular quando os endósporos do RZ2MS9 digeridos e tratados termicamente foram adicionados aos exsudatos e ao extrato de solo. Não foram observadas diferenças na contagem total de células e proporção de endósporos em função da digestão e tratamento térmico para ambos os *Bacillus* avaliados nos controles.

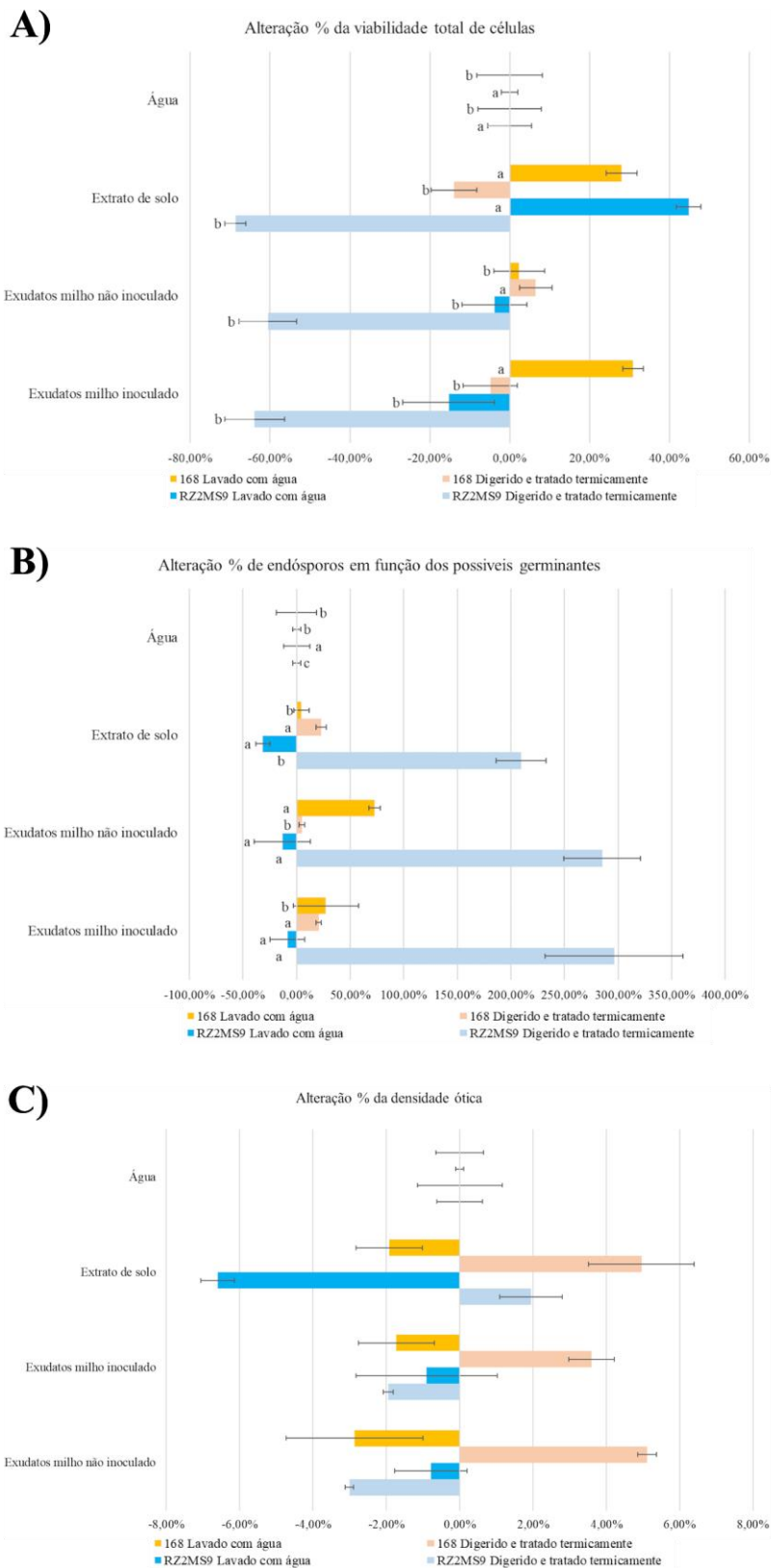


Figura 22. Efeito dos exsudatos de milho e do extrato de solo nos endósporos de *Bacillus* RZ2MS9 e 168. A) Efeito dos exsudatos de milho e do extrato de solo na viabilidade total das células (contagem total de UFC/ml). B) Efeito dos exsudatos de milho e do extrato de solo na resistência dos endósporos (Contagem de endósporos termorresistentes/ml). C) Efeito dos exsudatos de milho e do extrato de solo na variação dos OD_{600nm} dos endósporos após 1h de incubação. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%.

Também são observados efeitos significativos para a contagem total de células do 168. Sendo observado um aumento significativo do número de células para os tratamentos com endósporos lavados no extrato de solo e nos exsudatos de milho inoculado. Para os endósporos digeridos da linhagem 168 foi observada uma significativa redução na quantidade de células totais para os tratamentos com extrato de solo e exsudatos de milho inoculado. Em relação à proporção de endósporos da linhagem 168 observa-se um incremento desse percentual nos tratamentos com os endósporos lavados nos exsudatos de milho não inoculado, com os endósporos digeridos na solução de extrato de solo e com os endósporos digeridos nos exsudatos de milho inoculado. Já para os endósporos da linhagem RZ2MS9 lavado somente se observou um efeito de aumento da quantidade total de células na solução de extrato de solo. Em contrapartidas nas avaliações de redução de OD_{600nm} não foram observadas reduções significativas em função dos tratamentos.

Complementar a esse resultado, pelas análises de microscopia foi observada a presença de células vegetativas, e consequente germinação dos endósporos, para ambas linhagens, RZ2MS9 e 168, sob exsudatos de milho inoculado e no extrato de solo, junto com o controle positivo com LB. Entretanto, a proporção de células vegetativas nos tratamentos de extrato de solo e exsudatos de milho inoculado foi bastante baixa (menos de 5%) com as células também se apresentando bastante alongadas se comparadas ao controle com meio LB (figuras 23 e 24).

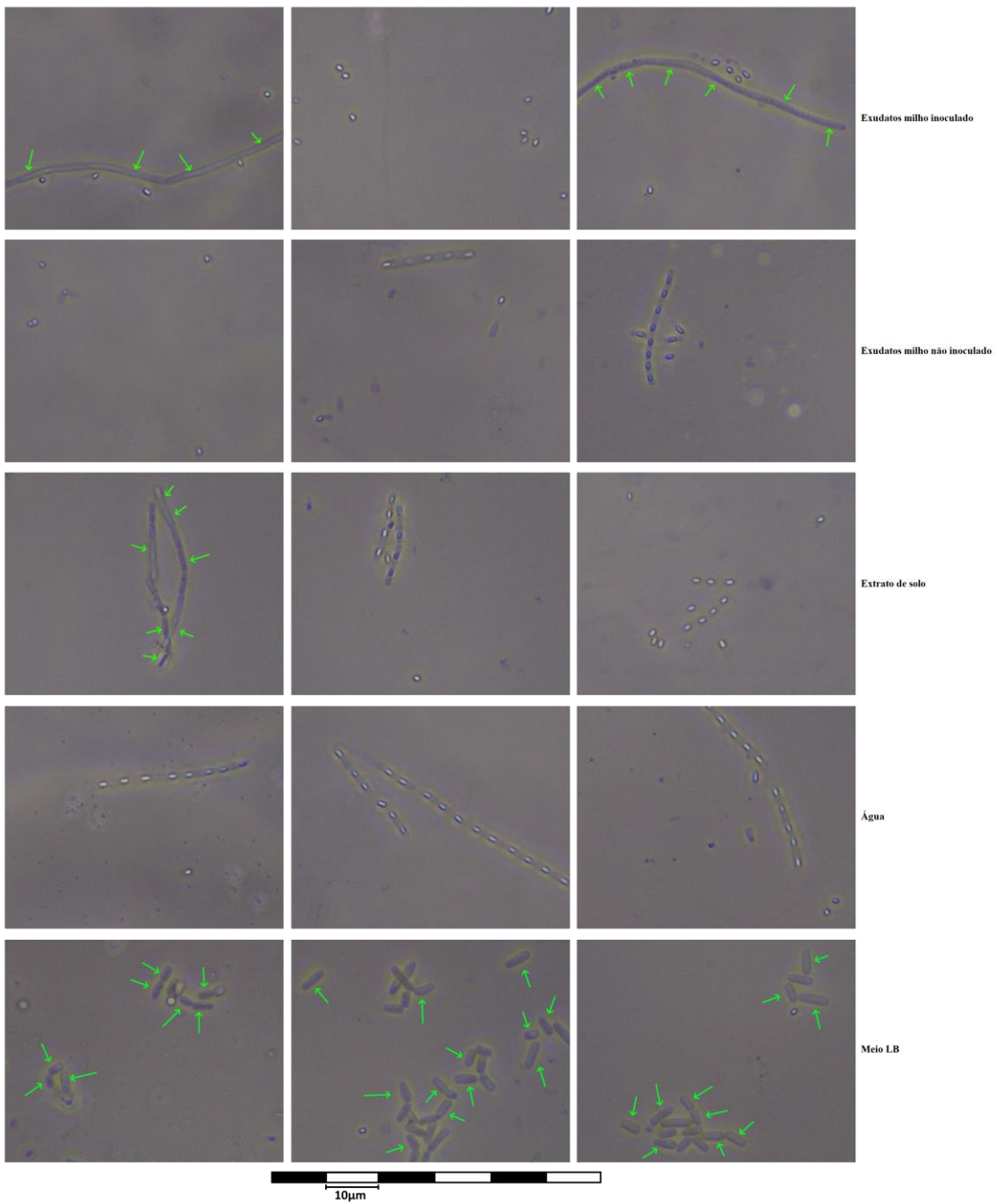


Figura 23. Morfologia de células de *B. thuringiensis* RZ2MS9 observadas em microscopia de contraste de fase sob exsudatos de milho e do extrato de solo. Setas em verde indicam células vegetativas do RZ2MS9 nas imagens.

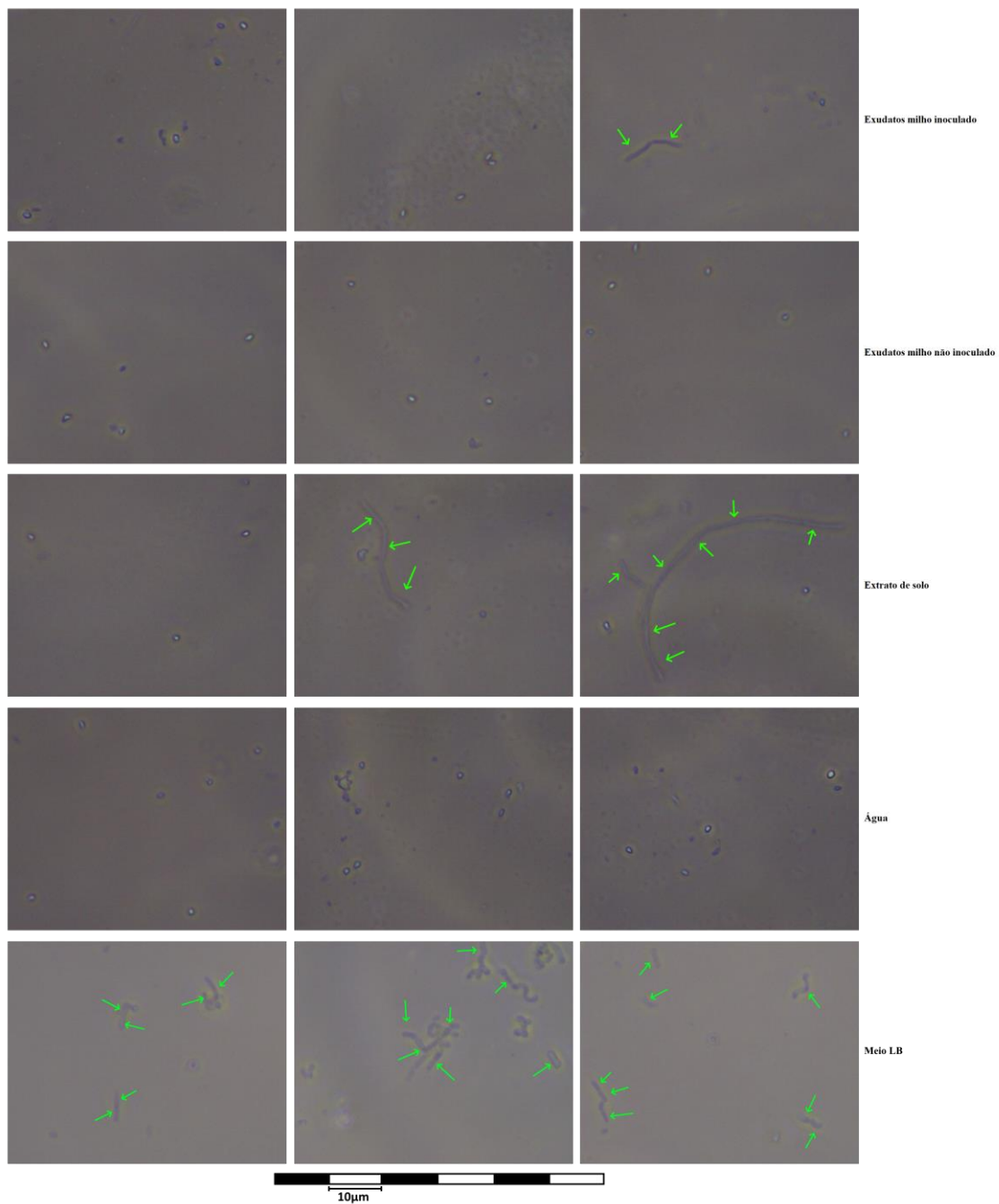


Figura 24. Morfologia de células de *B. subtilis* 168 observadas em microscopia de contraste de fase sob exsudatos de milho e do extrato de solo. Setas em verde indicam células vegetativas do RZ2MS9 nas imagens.

3.3.3.4. Análise de metaboloma dos exsudatos radiculares de milho

A análise do metaboloma dos exsudatos de milho utilizados nos ensaios de germinação revelou uma redução na diversidade de compostos exsudatos com a inoculação do RZ2MS9, juntamente com um aumento na exsudação de compostos dos grupos dos carboidratos e ácidos graxos (Figura 25). Concomitantemente observou-se a ausência de aminoácidos nos exsudatos de milho inoculado (grupo teoricamente chave para a germinação de endósporos), bem como a presença de alguns grupos exclusivos desses exsudatos como os hidroxi-ácidos de cadeia curta e seus derivados,

tirosóis e seus derivados e ácidos hidroxiciâmnicos e seus derivados. A lista completa dos compostos encontrados no metabolismo encontra-se Apêndice C.



Figura 25. Resultados do metaboloma dos exsudatos de milho avaliados. A) Proporção dos grupos de compostos encontrados no exsudato de milho não inoculado com o RZ2MS9. B) Abundância dos grupos de compostos encontrados no exsudato de milho não inoculado com o RZ2MS9. C) Proporção dos grupos de compostos encontrados no exsudato de milho inoculado com o RZ2MS9. D) Abundância dos grupos de compostos encontrados no exsudato de milho inoculado com o RZ2MS9. E) Tabela compilando a presença (+) e ausência (-) de cada um dos grupos de compostos encontrados na análise de metaboloma entre os dois tipos de exsudatos avaliados.

Essa diferença também é evidenciada na análise de rotas metabólicas feita no metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Nos exsudatos de milho não inoculado observa-se que as rotas metabólicas com maior impacto e maior significância previstas para os compostos desse exsudato estão, em sua maior parte, ligadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas, havendo também algum destaque para vias relacionadas a carboidratos e

síntese de alcaloides. Já para os exsudatos de milho inoculado as vias com maior significância estatística estão ao metabolismo de lipídios e carboidratos e a via com maior impacto está ligada a síntese de compostos do metabolismo secundário (Figuras 26 e 27).

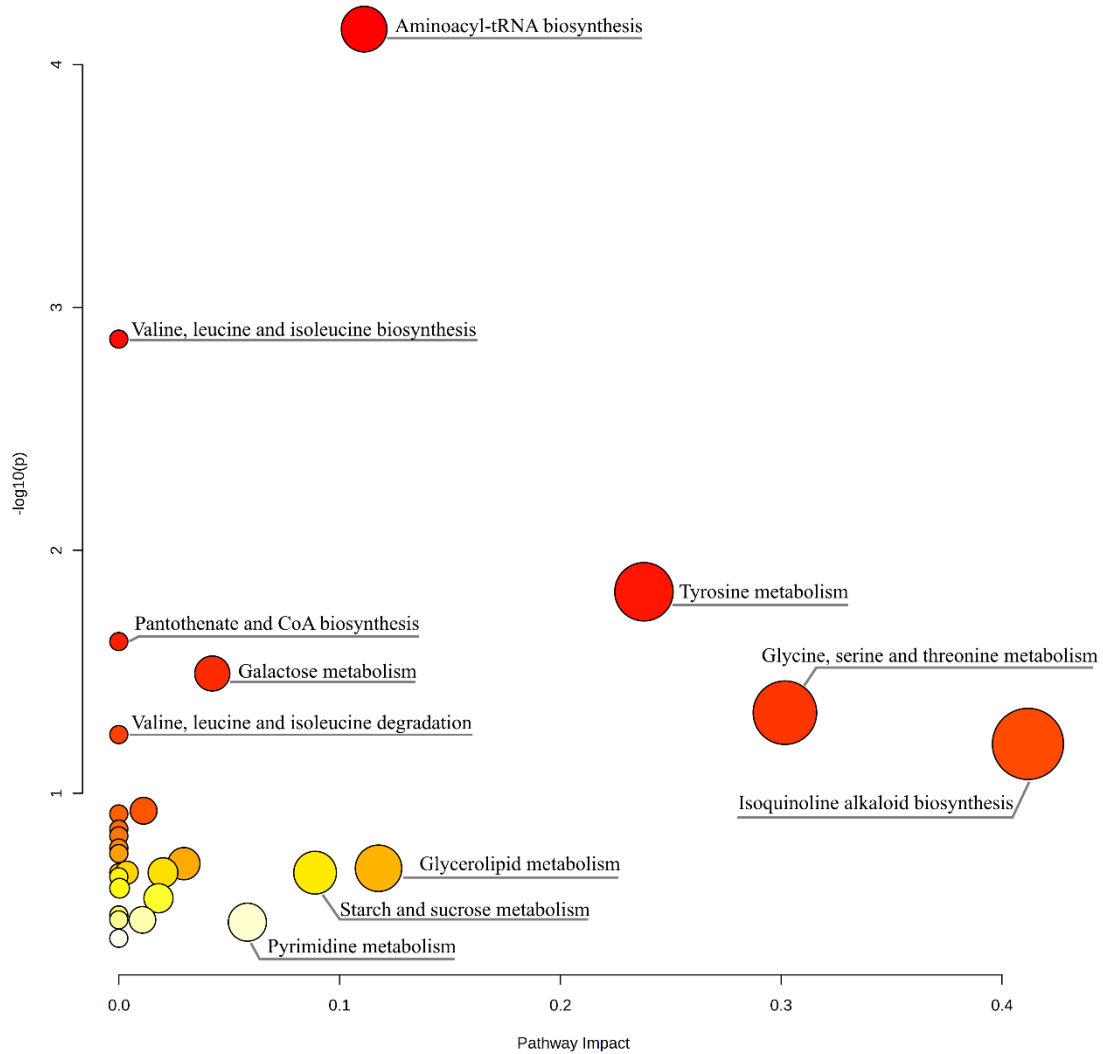


Figura 26. Análise de enriquecimento das rotas metabólicas previstas para o exsudato de milho não inoculado com o RZ2MS9.

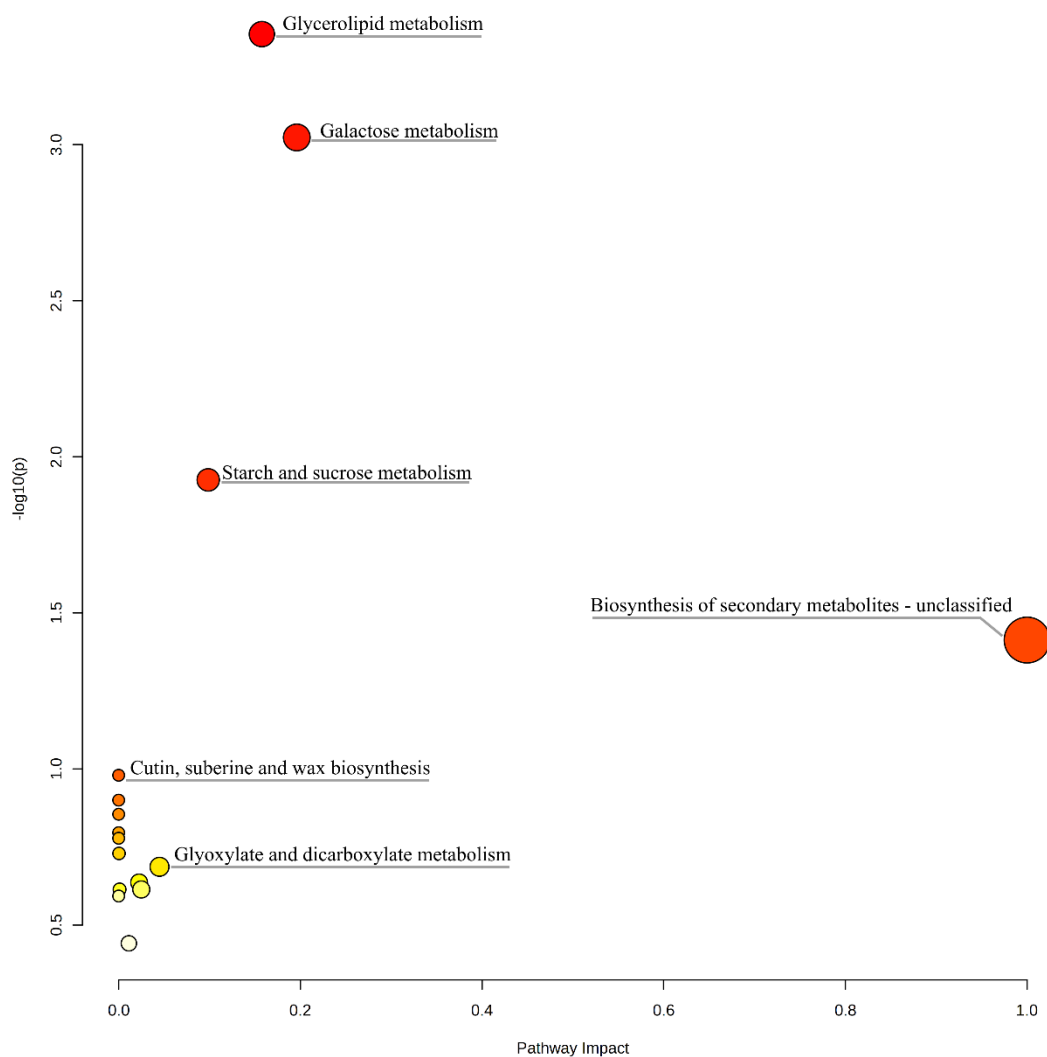


Figura 27. Análise de enriquecimento das rotas metabólicas previstas para o exsudato de milho inoculado com o RZ2MS9.

3.3.3.5. Avaliação do tempo de germinação dos endósporos do RZ2MS9

Na avaliação do tempo de germinação dos endósporos do RZ2MS9 em meio LB observou-se que, para as condições avaliadas, as primeiras alterações dos endósporos começaram a ficar visíveis após 2 h de incubação, com o inchaço das células (Figura 28). Após isso observa-se um contínuo alongamento das células, sendo possível observar as primeiras divisões celulares entre 5 h a 6 h após o contato dos endósporos com o meio LB.

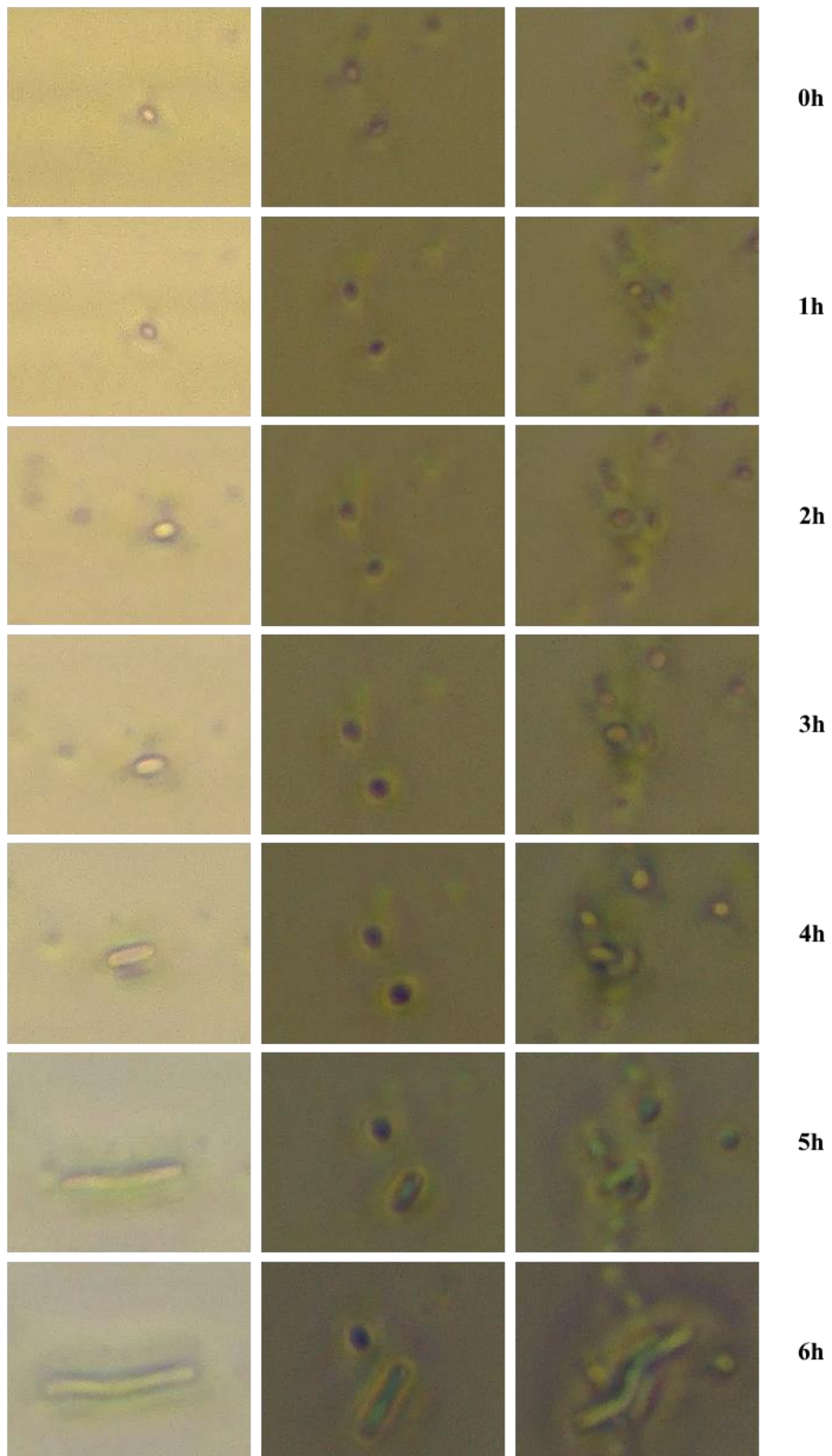


Figura 28. Processo de germinação dos endósporos do RZ2MS9 em meio LB sólido sendo observada através de microscópio de contraste de fase.

3.3.3.6. Curva de viabilidade do RZ2MS9

O ensaio de curva de viabilidade do RZ2MS9 em função do tempo de armazenamento observou uma drástica queda da proporção de endósporos aferidos na amostra por plaqueamento (próximo a 80%) já no 1º mês de armazenamento (Figura 29). Em contrapartida o total de células viáveis não apresentou a mesma velocidade de queda (aproximadamente 45% de queda no 1º mês), atingindo uma estabilidade no número total de células viáveis a partir 5º mês de armazenamento em um patamar um pouco abaixo das 10^8 UFC/ml (representando uma queda de 70% em relação as contagens iniciais). As contagens do número de endósporos por plaqueamento não revelaram nenhum padrão claro, tendo grandes, e significativas, oscilações ao longo dos meses. Já a proporção de endósporos aferida por plaqueamento parece se estabilizar a partir do 8º mês, mantendo um patamar entre 7% a 19% de endósporos nas amostras.



Figura 29. Curva de viabilidade dos endósporos ao longo dos meses de armazenamento. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%.

Em contrapartida a observação das amostras no 10º mês de armazenamento no microscópio de contraste de fase não revelou a presença de células vegetativas na amostra (Figura 30).

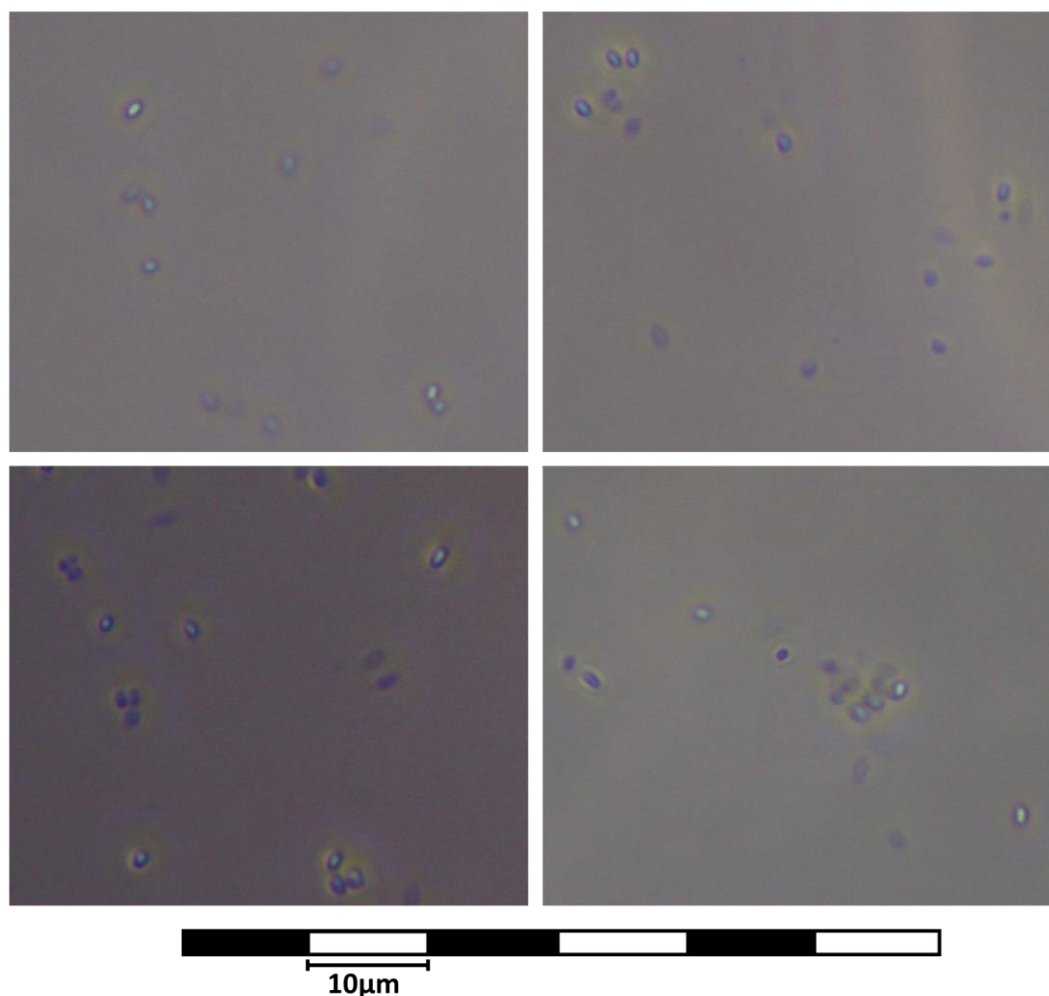


Figura 30. Microscopia de contraste de fase das amostras de endósporos do RZ2MS9 após 10 meses de armazenamento.

3.3.4. Análise *in silico* dos genes de esporulação da linhagem RZ2MS9 de *Bacillus*

Assim como o esperado, observou-se uma maior conservação dos genes (tanto na sua ocorrência, quanto na similaridade das sequências) nos grupos taxonomicamente mais próximos de *B. subtilis*. Sendo que as linhagens próximas a *B. thuringiensis* tiveram uma ocorrência média dos genes ao redor dos 30% e uma similaridade dos genes encontrados (identidade) de aproximadamente 60% em relação aos genes de referência usados para a busca (Figuras 31 e 32).

Separando os genes encontrados por categoria, alguns destaques podem ser observados, primeiramente em relação às proteínas solúveis (que atuam na proteção do DNA do endósporo), observa-se que este grupo acaba sendo muito pouco conservado dentro de *Bacillus*, sendo que as proteínas de referência utilizados para a busca não encontraram correspondentes em todo o grupo *cereus latu sensu*. Os fatores sigma relacionados à esporulação se mostraram ser o grupo mais conservado dentro do gênero *Bacillus* (com pelo menos 70% deles estando presentes nas linhagens avaliadas) (figura 31)

Esse padrão também é observado em relação a similaridade das sequências em relação aos genes de referência utilizados (Figura 32). Sendo observada uns maiores valores de identidades médias no grupo dos fatores sigma,

enquanto que os demais grupos apresentam um decréscimo muito similar na identidade dos genes, conforme os isolados se distanciam taxonomicamente de *B. subtilis*.

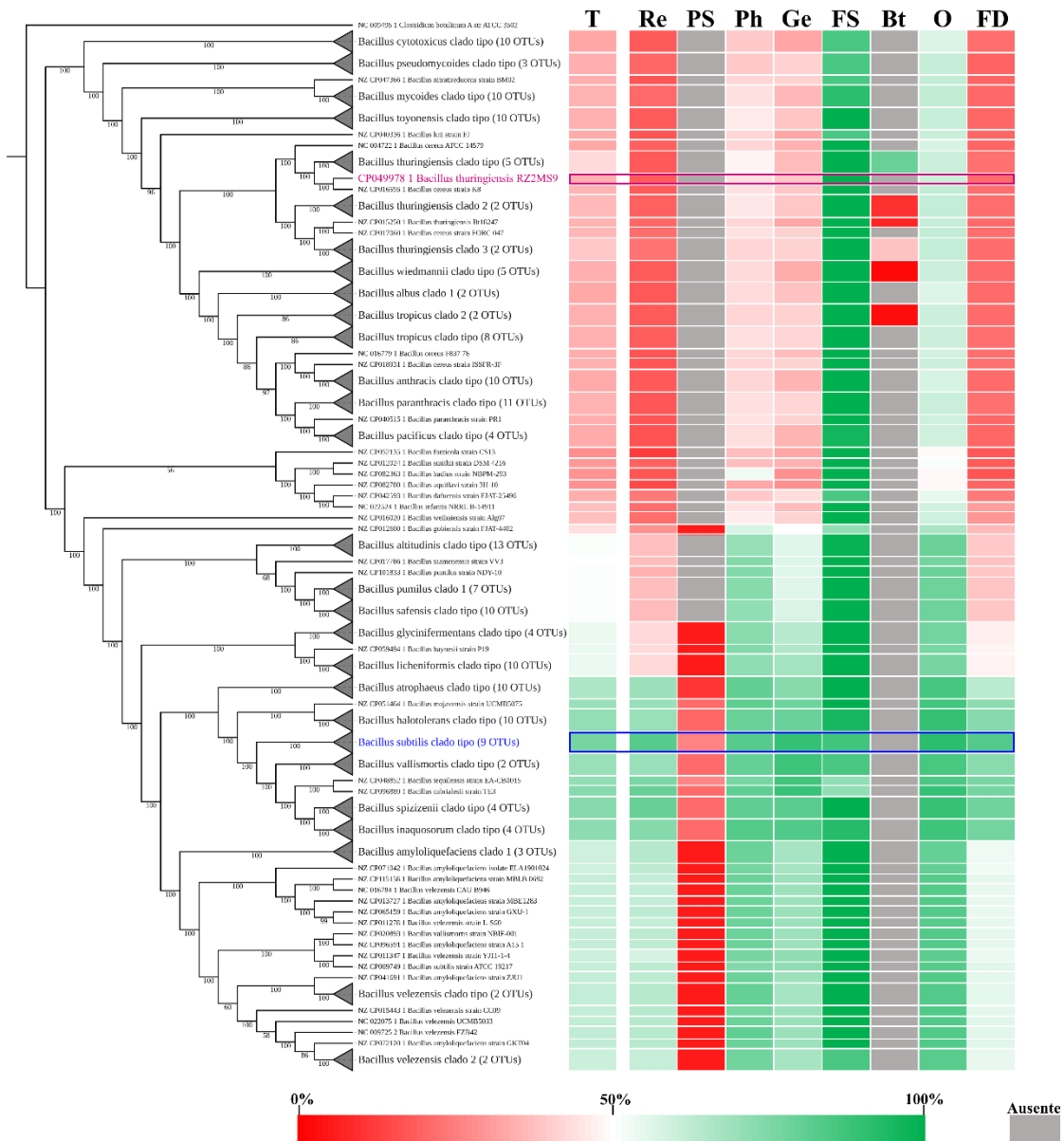


Figura 31. Proteínas relacionadas à esporulação no gênero *Bacillus*. Percentuais referentes as quantidades médias de proteínas totais e para cada categoria. Em azul foi destacado a espécie *B. subtilis* e em roxo a linhagem RZ2MS9. T – Total de proteínas relacionadas a esporulação, Re – Genes relacionados ao revestimento dos endósporos, PS – Genes das pequenas proteínas solúveis da esporulação, Ph – Genes relacionados ao mecanismo de fosforelay da esporulação, Ge – Genes relacionados a germinação dos endósporos, FS – Fatores sigma relacionados ao processo de esporulação, Bt – Proteínas entomopatogênicas de *Bacillus thuringiensis* produzidas durante a esporulação, O – Outros proteínas relacionadas a esporulação e com função conhecida, FD – Outros proteínas relacionadas a esporulação e com função desconhecida.

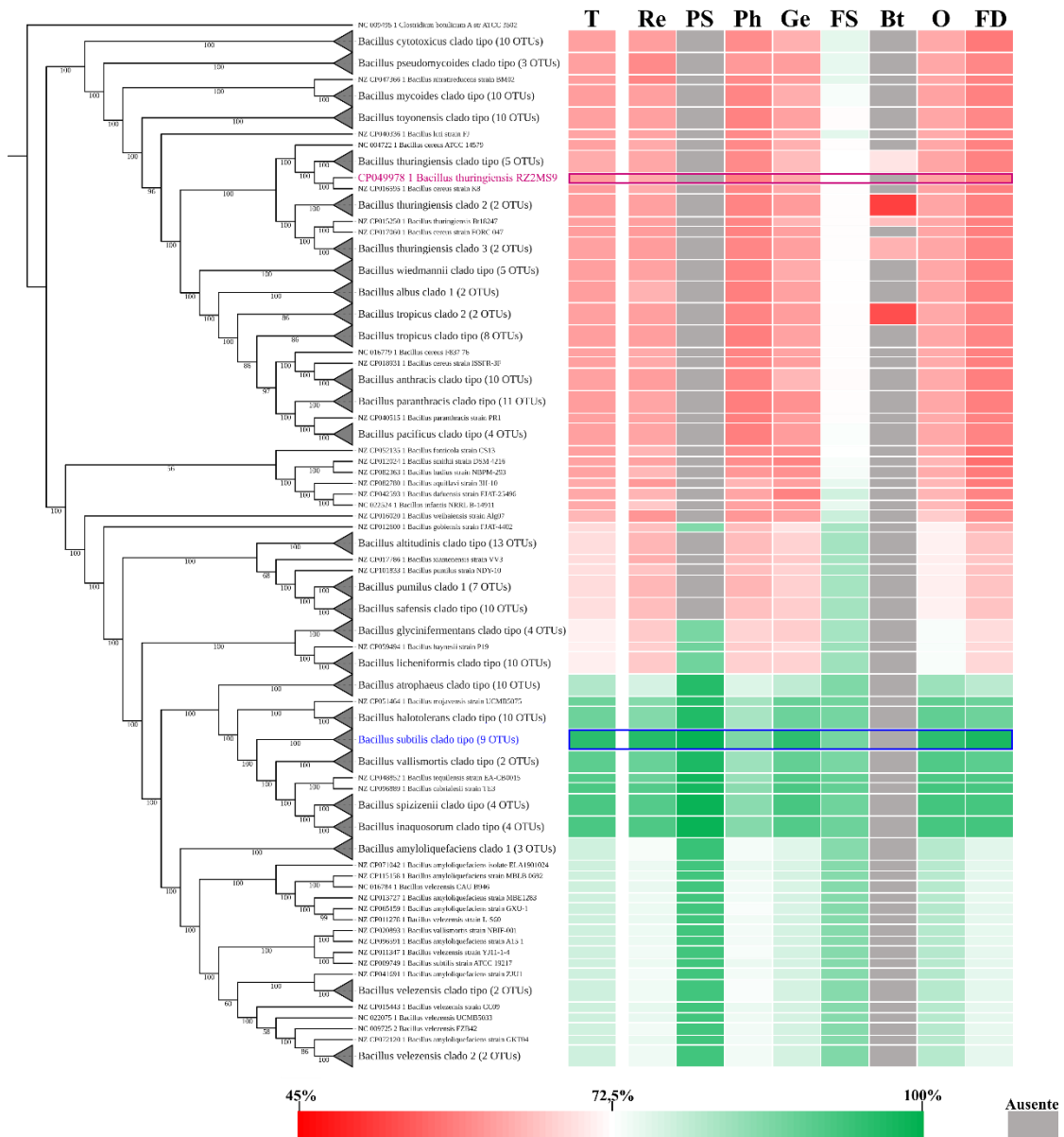


Figura 32. Identidade média dos genes de esporulação encontrados em relação as referências utilizadas para busca. Percentuais referentes as identidades médias dos genes totais e para cada categoria. Em azul foi destacado a espécie *B. subtilis* e em roxo a linhagem RZ2MS9. T – Total de proteínas relacionadas a esporulação, Re – Genes relacionados ao revestimento dos endósporos, PS – Genes das pequenas proteínas solúveis da esporulação, Ph – Genes relacionados ao mecanismo de fosforelay da esporulação, Ge – Genes relacionados a germinação dos endósporos, FS – Fatores sigma relacionados ao processo de esporulação, Bt – Proteínas entomopatogênicas de *Bacillus thuringiensis* produzidas durante a esporulação, O – Outras proteínas relacionadas a esporulação e com função conhecida, FD – Outras proteínas relacionadas a esporulação e com função desconhecida.

Adicionalmente também se observou que de maneira geral os genes de esporulação costumam se organizar em cópia única no cromossomo dos *Bacillus* (Tabela 27). Com a exceção mais notável sendo as proteínas patogênicas de *B. thuringiensis*, presentes predominantemente nos plasmídeos da bactéria. Tal organização acaba chamando atenção dado que para muitos desses uma mutação pode comprometer significativamente a capacidade da bactéria de formar endósporos.

Tabela 27. Ocorrência das proteínas de esporulação pela busca *in silico*.

Categoria	Média de cópias	Ocorrência			Em plasmídeos
		1	2	>2	
Total	1,15	91,7%	6,2%	2,1%	20,81%
Proteínas de revestimento	1,10	90,5%	9,5%	0,0%	13,51%
Pequenas proteínas solúveis em ácido	1,00	100,0%	0,0%	0,0%	0,00%
Phosphorelay	1,57	75,7%	10,8%	13,5%	24,32%
Germinação	1,08	95,5%	4,5%	0,0%	25,00%
Fatores Sigma	1,42	57,1%	42,9%	0,0%	42,86%
Proteínas patogênicas de <i>B. thuringiensis</i>	1,34	75,8%	24,2%	0,0%	87,88%
Outras proteínas relacionadas a esporulação (Função conhecida)	1,15	92,3%	4,0%	3,6%	15,69%
Outras proteínas relacionadas a esporulação (Função desconhecida)	1,05	98,3%	1,3%	0,4%	8,90%

Em relação à busca de domínios de interesse nos genes relacionados a esporulação encontrados no RZ2MS9 foram compilados os genes encontrados contendo domínios para os cátions presentes na solução de sais CCY (Tabela 28). Também foram investigados os domínios relacionados à alanina, onde se encontrou uma grande quantidade de proteínas de membrana com função de amidase e carboxipeptidase (Tabela 29).

Tabela 28. Genes encontrados na busca *in silico* no RZ2MS9 contendo domínios para os cátions presentes nos sais CCY

Cátion relacionado	Nome	Gene	Nº de cópias
Ca	<i>yloB</i>	Transporte de cálcio dependente de ATP	2
Ca e Zn	<i>cadA</i>	Transporte de zinco e cádmio dependente de ATP	1
Zn	<i>ftsH</i>	Peptidase dependente de zinco	1
	<i>yhfN</i>	Peptidase dependente de zinco	1
	<i>pepF</i>	Peptidase dependente de zinco	1
	<i>yokU</i>	Antitoxina, proteína com domínio dedo de zinco	1
	<i>recO</i>	Reparo de DNA	1
	<i>adhB</i>	Proteína semelhante a álcool desidrogenase	1
	<i>spoIVFB</i>	Peptidase dependente de zinco	1
	<i>yugP</i>	Peptidase dependente de zinco	1
	<i>dkxA</i>	Repressor da RNA polimerase	1
Fe	<i>ricT</i>	subunidade do complexo regulador de ferro-enxofre contendo RicA - RicF - RicT	1
	<i>yhfW</i>	Proteína de Fe-S com função redox	1
	<i>yhfR</i>	Proteína com função redox	1
	<i>citB</i>	Aconitase	1
	<i>cypA</i>	Proteína com função redox semelhante ao citocromo P450	1
Fe e Mn	<i>sodF</i>	Superóxido Dismutase	1
	<i>sodA</i>	Superóxido Dismutase	3
Mn	<i>ytaF</i>	Bomba de efluxo de Mn	1
Mg	<i>yugS</i>	Transporte de Mg	4

Tabela 29. Genes relacionados à esporulação no RZ2MS9 que continham domínios para alanina

Gene		Nº de
Nome	Função predita	cópias
<i>cvlD</i>	Proteína de membrana L-alanina amidase	1
<i>dacB</i>	Proteína de membrana D-alanina carboxipeptidase	1
<i>lysA</i>	Descarboxilase com domínio para alanina	1
<i>pbpX</i>	Proteína de membrana D-alanina carboxipeptidase	1
<i>dacF</i>	Proteína de membrana D-alanina carboxipeptidase	1
<i>spoVFA</i>	Síntese de DPA e alanina desidrogenase	1
<i>cvlC</i>	L-alanina amidase	1
<i>yrbD</i>	Proteína de membrana para transporte de aminoácidos e de sódio	3
<i>cvlH</i>	L-alanina amidase	2
<i>ald</i>	Alanina desidrogenase	2
<i>spoIID</i>	Proteína de membrana L-alanina amidase	1

3.5 Buscas complementares na anotação do genoma do RZ2MS9

Apesar da busca *in silico* usando o banco de dados de genes relacionados a esporulação montado não ter conseguido encontrar no genoma da linhagem RZ2MS9 genes de pequenas proteínas solúveis em ácidos e de proteínas de germinação, ambos estão presentes na anotação do genoma desta linhagem. Foram encontrados pelo menos 13 genes relacionados as pequenas proteínas solúveis em ácidos (SASP; Tabela 30) e em relação aos genes relacionados a proteínas de germinação foram encontrados pelo menos 22 genes anotados como tal no RZ2MS9 (Tabela 31).

Tabela 30. SASPs anotadas no genoma do RZ2MS9.

GenBank	A.A.	Nome
WP_000070633.1	52	MULTISPECIES: small, acid-soluble spore protein, alpha/beta type
WP_000517891.1	52	MULTISPECIES: small, acid-soluble spore protein K
WP_000039046.1	93	MULTISPECIES: gamma-type small acid-soluble spore protein
WP_000013338.1	67	MULTISPECIES: small acid-soluble spore protein, SasP family
WP_001140707.1	61	MULTISPECIES: alpha/beta-type small acid-soluble spore protein
WP_001025731.1	59	MULTISPECIES: H-type small acid-soluble spore protein
WP_000113545.1	68	alpha/beta-type small acid-soluble spore protein
WP_070756658.1	70	small acid-soluble spore protein, SasP family
WP_000897397.1	76	MULTISPECIES: alpha/beta-type small acid-soluble spore protein
WP_070756880.1	65	small acid-soluble spore protein Tlp
WP_000517649.1	40	MULTISPECIES: small acid-soluble spore protein P
WP_000009509.1	69	MULTISPECIES: small acid-soluble spore protein SspI
WP_000091640.1	65	MULTISPECIES: alpha/beta-type small acid-soluble spore protein

* SASPs descritas na anotação do genoma do RZ2MS9 depositada no NCBI. A.A. – Número de resíduos de aminoácidos da proteína.

Tabela 31. Genes relacionados a germinação anotados no genoma do RZ2MS9.

GenBank	A.A.	Nome
WP_061655590.1	500	MULTISPECIES: spore germination protein GerKA
WP_139147433.1	492	MULTISPECIES: spore germination protein GerLA
WP_070758182.1	374	spore germination protein GerLB
WP_000681627.1	388	MULTISPECIES: spore germination protein GerLC
WP_000467489.1	505	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_001141566.1	71	MULTISPECIES: spore germination protein GerPF
WP_000902319.1	128	MULTISPECIES: spore germination protein GerPE
WP_001052807.1	64	MULTISPECIES: spore germination protein GerPD
WP_001070760.1	204	MULTISPECIES: spore germination protein GerPC
WP_001012508.1	68	MULTISPECIES: spore germination protein GerPB
WP_001111187.1	73	MULTISPECIES: spore germination protein GerPA
WP_001141569.1	71	MULTISPECIES: spore germination protein GerPF
WP_001139345.1	71	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_000802290.1	499	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_000628929.1	363	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_070756669.1	524	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_070756877.1	512	spore germination protein
WP_001252211.1	378	MULTISPECIES: spore germination protein GerSC
WP_000512465.1	74	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_083320110.1	767	spore germination protein
WP_000049056.1	366	MULTISPECIES: spore germination protein
WP_000411387.1	361	MULTISPECIES: spore germination protein GerHC
WP_001112054.1	71	MULTISPECIES: spore germination protein

* Proteínas de germinação descritas na anotação do genoma do RZ2MS9 depositada no NCBI. A.A. – Número de resíduos de aminoácidos da proteína.

3.4. Discussão

A observação conjunta dos resultados obtidos ao se analisar as dinâmicas de esporulação e germinação da linhagem RZ2MS9, juntamente com a busca de paralelos aos comportamentos observados na literatura, permitiu a observação de várias divergências em relação ao que é normalmente descrito. Principalmente ao que é normalmente alegado a respeito das vantagens do uso de endósporos na agricultura. Também se constatou uma grande concentração de informações em torno de uma única espécie do gênero, o *B. subtilis*. Esta espécie é considerada modelo de estudo das bactérias Gram positivas, em função de sua facilidade de cultivo, manipulação e versatilidade de usos (principalmente na produção e secreção de compostos de interesse), bem como o modelo para estudo do processo de esporulação em bactérias (BREMER et al., 2023; SU et al., 2020; STÜLKE et al., 2023). Neste contexto, destaca-se a linhagem 168, um derivado da cepa Marburg original deficiente em produção de triptofano, que foi a primeira linhagem do grupo Bacillota (antigo Firmicutes) a ser completamente sequenciada (BREMER et al., 2023; SU et al., 2020; STÜLKE et al., 2023). Assim esta linhagem foi utilizada como referência nos nossos estudos permitindo a comparação direta dos comportamentos observados com o RZ2MS9 com uma linhagem modelo para estudos com *Bacillus*.

A partir dos ensaios de otimização da esporulação, somente o meio CCY apresentou um alto percentual de endósporos termorresistentes, apesar de terem sido testados muitos meios referidos pela literatura. Ao mesmo tempo, observou-se que entre esses meios, os que tiveram os piores desempenhos estavam em trabalhos avaliando apenas linhagens de *B. subtilis* (M11 com 2,01 %, CDMS com 20,44 % e SM com 36,41 % de esporulação), sendo que os dois meios referidos em trabalhos avaliando linhagens de *B. cereus* (Y1 com 55,20 % de esporulação e CCY com 80,35 %) apresentaram os melhores desempenhos para a linhagem RZ2MS9. Em contrapartida o meio CCY também é

referenciado como eficiente para a esporulação de *B. subtilis* (ATRIH; FOSTER, 2001), apontando tanto a existência de uma base comum de estímulos para a formação e endósporos, ou pelo menos de endósporos termo resistentes, quanto a presença de especificidades de condições para certas linhagens sendo necessário estudos caso a caso. No presente estudo, o melhor resultado para a esporulação foi obtido no meio GM 200, um dos dois meios formulados com base em conversas com empresas de produção de inoculantes e que leva em sua formulação os sais CCY.

Quanto à avaliação da esporulação da linhagem RZ2MS9 em meio GM 200 com diferentes qualidades de matéria prima, esta revelou que apesar de haver alguma especificidade de meio de cultura para uma ótima taxa de esporulação do RZ2MS9, a linhagem também apresenta um bom grau de tolerância a variações na qualidade de matéria prima. Tal resultado reduz as incertezas em relação a produção de endósporos do RZ2MS9 em condições não laboratoriais ou onde nem sempre estão disponíveis matérias primas de grande qualidade e pureza. Com a qualidade da matéria prima não necessariamente tendo grande importância no processo de obtenção dos endósporos dessa linhagem para as condições testadas.

As variações de comportamento entre linhagens de *Bacillus* em diferentes meios de esporulação não são necessariamente uma novidade, Atrih e Foster (2001), Stöckel et al. (2009), Granger et al. (2011), Sinnelä et al. (2019) e Sinnelä et al. (2021) relatam comportamentos bastante diversos de linhagens de *Bacillus* em função da mudança da composição do meio de cultura. Sendo muito comum a avaliação do efeito do cálcio (Ca) e do manganês (Mn) na esporulação, com esses dois elementos sempre tendo sua concentração reforçada nos meios desenvolvidos para a esporulação de *Bacillus*. Entretanto, assim como observado nesses experimentos, existem pontos ótimos de concentração desses minerais para cada linhagem. Com concentrações excessivas podendo provocar o efeito contrário, como muito provavelmente aconteceu com o meio M11 para a linhagem RZ2MS9, sendo o meio com maior concentração de Mn e uma das menores proporções de endósporos aferidos pelo plaqueamento. O cálcio e o manganês, junto o magnésio, o ferro e o zinco são elementos presentes nos sais CCY.

Em relação ao meio CCY e a sua solução de sais, destaca-se os resultados obtidos onde a adição dos sais CCY nos meios TSB e LB (tanto suas versões completas quanto diluídas a 5%) levou a expressivos aumentos na proporção de endósporos. Inclusive revertendo completamente a redução na proporção de endósporos observada com a diluição do meio TSB. Essa redução na proporção de endósporos em função da redução da concentração de nutrientes vai de encontro a literatura, com a limitação de nutrientes sendo considerado o principal fator decisório para o início da esporulação em *Bacillus* (NARULA et al., 2012; HIGGINS; DWORKIN, 2012; CHO; CHUNG, 2020). Ao mesmo tempo a reversão desse processo com a adição dos sais CCY aponta para uma possível explicação, onde a redução da concentração de nutrientes no meio acabou limitando inclusive a disponibilidade de nutrientes essenciais para uma completa formação dos endósporos e que estariam presentes nos sais CCY.

Corroborando essa hipótese, Atrih e Foster (2001) demonstraram um significativo aumento da resistência térmica dos endósporos de *B. subtilis* com a adição da solução de sais CCY em caldo nutriente, levantado também a hipótese de uma limitação do método de quantificação de endósporos em função de sua resistência térmica, empregado para a avaliação dos diferentes meios de cultura. Tal limitação é apontada também como a provável a causa da aparente baixa proporção de endósporos no ensaio da curva de viabilidade da linhagem RZ2MS9, onde apesar de serem observadas um baixo percentual de células resistentes não foram observadas células vegetativas na microscopia de contraste de fase.

O mecanismo de resistência dos endósporos de *Bacillus* spp. ao calor está bastante relacionado a desidratação do citoplasma dos mesmos em função do acumulo de ácido dipicolínico (DPA) e de pequenas proteínas solúveis em ácido (CHO; CHUNG, 2020; GRANGER et al., 2011). O DPA comumente forma quelatos com cátions bivalentes,

predominantemente o Ca^{2+} , mas também forma quelatos com o Mn^{2+} (GRANGER et al., 2011; STÖCKEL et al., 2009), sendo considerado que o quelato Ca-DPA o mais eficiente para desidratação do citoplasmas do endósporo (SINNELÄ et al., 2021). Com a linhagem RZ2MS9 apresentando os genes tanto para a síntese de DPA quanto das SASPs.

Dos cátions presentes nos sais CCY, o manganês é o que apresenta as maiores quantidades de estudos, embora este não possa ser considerado o principal cátion responsável pela capacidade de resistência térmica dos endósporos (ATRIH; FOSTER, 2001; SINNELÄ et al., 2019; GRANGER et al., 2011). O manganês é bastante referenciado como cátion auxiliar ao cálcio na formação dos quelatos com o DTPA (GRANGER et al., 2011; STÖCKEL et al., 2009), como um importante cofator da fosfoglicerato mutase (uma importante enzima responsável pela obtenção inicial de energia na germinação; NUKUI et al., 2007) e como um importante fator antioxidante e de proteção dos sítios enzimáticos, podendo teoricamente substituir outros cátions bivalentes nos sítios ativos das proteínas protegendo esses de serem degradados por espécies reativas de oxigênio (GRANGER et al., 2011). O cálcio, por sua vez, é principalmente apontado como o principal cátion responsável pela formação de quelato como DTPA e componente das estruturas do endósporo, sendo encontrado fazendo parte da estrutura da parede de peptidoglicanos do endósporo (CHO; CHUNG, 2020; SINNELÄ et al., 2021). Não foram encontrados trabalhos atribuindo funções bem definidas para os demais componentes dos sais CCY, sendo encontrado um trabalho relatando a liberação de zinco como um indicativo do início da germinação de endósporos de *B. megaterium* (JOHNSTONE et al., 1982). Complementar a esses resultados da literatura os resultados da análise *in silico* buscando domínios funcionais relacionados aos cátions presentes nos sais CCY também encontraram consonâncias com a literatura. Mais notadamente com o manganês sendo associado as enzimas superóxido dismutases (GRANGER et al., 2011). Somado a isso também se destacou a grande quantidade de peptidases dependentes de zinco, com uma delas inclusive (SpoIVFB) desempenhando um papel crucial na regulação da esporulação ao atuar no processamento, e consequente ativação, do fator sigma SigK (SUN et al., 2021).

Toda essa dependência de diversos cátion metálicos para a completa formação do endósporo lançam algumas dúvidas no consenso sobre a conveniência dos *Bacillus* como inoculantes agrícolas. É altamente esperado que *Bacillus* isolados associados a plantas (como o caso da linhagem RZ2MS9, isolada da rizosfera do guaranazeiro) sejam plenamente capazes de formar endósporos completamente funcionais em condições de campo. Entretanto as especificidades nutricionais dos meios de cultura que estes exigem para uma esporulação eficiente, a observação de uma rápida perda da resistência térmica dos endósporos após apenas 1 mês de armazenamento e a possibilidade de formação de endósporos não completamente resistentes em função do substrato de crescimento da bactéria acabam levantando dúvidas se em condições de campo esse processo seria eficiente o suficiente para garantir o maior tempo de permanência do inoculante. Principalmente frente a uma deterioração das condições para sobrevivência da bactéria, uma das supostas vantagens do uso de bactérias esporulantes na agricultura. Em contrapartida o ensaio avaliando o efeito da qualidade da matéria prima do meio GM 200 na esporulação do RZ2MS9 também aponta uma considerável tolerância deste em relação aos seus substratos de crescimento para a esporulação.

Ao mesmo tempo também é pertinente questionar se os métodos de aferição de resistência dos endósporos em laboratório, principalmente por meio da resistência a altas temperaturas, de fato aferem propriedades relevantes para a sobrevivência dos endósporos em campo. A resistência de endósporos a temperaturas superiores a 80°C é de bastante relevância prática em relação a questão de contaminação e deterioração de produtos de interesse humano, entretanto tais condições extremas dificilmente ocorrem em campo. Apesar dessa resistência a condições extremas estar intrinsecamente ligadas aos mecanismos gerais de resistência dos endósporos o principal ponto de questionamento

é de que se a intensidade na qual essas características são avaliadas refletem a intensidade das condições a qual o endósporo é submetido a campo. A partir do ensaio de curva de viabilidade a queda da proporção de células termicamente resistentes não acompanhou a queda da viabilidade total de células, com uma grande quantidade de endósporos permanecendo vivos após 10 meses de armazenamento, mesmo não apresentando mais a resistência a altas temperaturas. Ao mesmo tempo em que condições ambientais são esperadas muitos mais fatores para a morte celular que a simples deterioração das células, tais como toxinas, enzimas liberadas por outros microrganismos e predação, questiona-se se a perda da termorresistência levaria obrigatoriamente a morte dessas células.

Um outro ponto de questionamento em relação aos consensos do uso de *Bacillus* na agricultura é sua aplicação na forma de endósporos. Ao contrário do geralmente afirmado em relação as vantagens da aplicação de *Bacillus* na forma de endósporos (ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019; AZIZOGLU, 2019; VIDAL-QUIST et al., 2013; RADDADI et al., 2008; RADDADI et al., 2007) os resultados obtidos nos dois ensaios de promoção de crescimento vegetal realizados apontam um comportamento oposto para a linhagem RZ2MS9. Onde observa-se nitidamente maiores efeitos na aplicação de células vegetativas. Sendo observado apenas um pequeno efeito na aplicação de endósporos no ensaio em germitest. Tal resultado aponta que, pelo menos para a linhagem RZ2MS9, a aplicação de endósporos para a promoção de crescimento de milho apresenta apenas um pequeno efeito logo no início da germinação, praticamente não fazendo efeito para as plantas quando estas ficam mais velhas.

Observando os resultados dos ensaios de germinação dos endósporos é possível traçar algumas hipóteses para explicar o ocorrido nos ensaios de promoção de crescimento. Considerando as baixas taxas de germinação nas soluções de extrato de solo e exsudato de milho inoculado com a linhagem RZ2MS9, e a não germinação nos exsudatos de milho não inoculado. A primeira hipótese é que o ambiente na qual os endósporos foram aplicados não apresentava condições para a germinação eficiente dos mesmos. Em contrapartida a essa hipótese os resultados de promoção de crescimento com células vegetativas em casa de vegetação demonstraram que os resultados de promoção obtidos independem da concentração desse tipo de inóculo, demonstrando que mesmo concentrações muito baixas de células promoveram de forma eficiente o crescimento da planta. Considerando as maiores dosagens de endósporos utilizadas uma germinação de 0,01% já resultaria em uma carga de células equivalente as menores concentrações utilizadas de células vegetativas.

Observando esse segundo ponto e a não germinação de endósporos nos exsudatos de milho não previamente inoculados com a linhagem RZ2MS9 sugere-se uma segunda hipótese: os componentes dos exsudatos radiculares do milho atuaram inibindo a germinação dos endósporos e por consequência o efeito da linhagem no milho. Tal hipótese também é corroborada pela observação do resultado do metaboloma dos exsudatos radiculares, onde observa-se que no exsudado do milho inoculado há uma diversidade muito menor de moléculas, indicando um consumo destas em função da inoculação com a linhagem RZ2MS9. Ao se considerar os estímulos geralmente reportados pela literatura para a germinação de endósporos de *Bacillus*, geralmente soluções de aminoácidos e açúcares (CHEN et al., 2014; CARR et al., 2010), também se nota que teoricamente os exsudatos de milho não inoculado são os que apresentariam melhores condições para a germinação dos endósporos, pela maior diversidade de moléculas nutrientes, como aminoácidos, que não estão presentes no outro exsudato (Sendo observado o oposto nas avaliações de microscopia). Somado a isso também chama a atenção que tanto a linhagem 168 quanto o RZ2MS9 apresentaram alguma similaridade de comportamento nesse ensaio de germinação, ao contrário dos ensaios buscando avaliar possíveis moléculas germinantes.

Nestes o discreto efeito de germinação em L-alanina pelo RZ2MS9 destaca-se, pois mesmo que a sensibilidade de *Bacillus* spp. para germinação na presença desse aminoácido possa variar muito dentro do gênero (LU

et al., 2021) está ainda é considerada o padrão para os ensaios de germinação. Apesar de terem sido encontrados muitos genes com domínios para alanina na busca *in silico* na linhagem RZ2MS9, nenhum deles estava relacionada a germinação dos endósporos de acordo com a literatura.

A sensibilidade dos endósporos a compostos germinantes se dá primeiramente pela ação de receptores germinativos (Ger) proteínas geralmente compostas por 3 subunidades (A, B e C) (CHEN et al., 2014; IGARASHI; SETLOW, 2006; BORCH-PEDERSEN et al., 2016; CARR et al., 2010; BARLASS et al., 2002), cujas subunidades A e B provavelmente atuam reconhecendo o germinante e disparando o sinal para o início do processo de germinação do endósporo (CHRISTIE; SETLOW, 2020), podendo existir algumas exceções como GerP, que atua facilitando interação dos germinantes com os seus respectivos receptores e apresenta 6 subunidades (A, B, C, D, E e F) sendo sua presença essencial para uma percepção eficiente dos germinantes por parte dos endósporos (BUTZIN et al., 2012; CARR; JANES; HANNA, 2010).

Os receptores Ger atualmente descritos costumam ficar organizados em operons, sendo eles GerA, GerB, GerH, GerI, GerK, GerL, GerP, GerQ e GerS, onde nem todos estão distribuídos em todos os *Bacillus*, mas sendo comum a ocorrência de mais de um tipo de receptor Ger para cada isolado (CHEN et al., 2014; CHRISTIE; SETLOW, 2020; CARR; JANES; HANNA, 2010; CARR et al., 2010; BARLASS et al., 2002). Entre eles GerA é reconhecido como o principal responsável pela germinação em L-alanina (CHEN et al., 2014; BORCH-PEDERSEN et al., 2016). Nenhum desses receptores foi encontrado na linhagem RZ2MS9 por meio da análise *in silico* para busca de proteínas relacionadas a esporulação, entretanto constam na anotação do genoma do RZ2MS9 pelo menos 22 proteínas anotadas como relacionadas a germinação. Sendo nesse caso encontrado a subunidade A de GerK, as subunidades C de GerS e GerH e os conjuntos completos de GerL e GerP, além de diversas outras proteínas de função ainda não conhecida. Sendo que no caso de GerP uma análise dos domínios funcionais das proteínas através do interProScan revelou que na linhagem RZ2MS9 *gerPB* apresenta um tamanho menor que seu homólogo da linhagem 168 além de também não apresentar um domínio de desordem presente nesse homólogo (Figura 33). Ao mesmo tempo, descarta-se a hipótese de que essa mutação seja a causa da recalcitrância do RZ2MS9 aos germinantes mais típicos dado que o procedimento de ativação realizado com digestão com lisozima e SDS é similar ao realizado por Carr, Janes e Hanna (2010) em *B. anthracis* sendo este suficiente para compensar a falta de um GerP completamente funcional. Para os demais Ger encontrados na linhagem RZ2MS9 não foram encontradas diferenças de domínios em comparação aos seus homólogos presentes no 168.

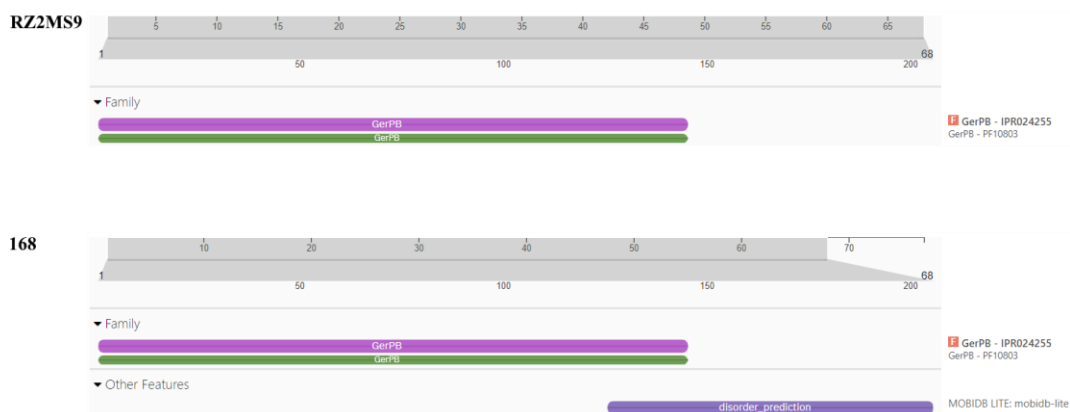


Figura 33. Análise de predição de domínios do gene *gerPB* das linhagens RZ2MS9 e 168 de *Bacillus*.

O receptor GerK é descrito como relacionado a germinação na presença de D-açúcares, principalmente D-glicose, comumente precisando de K⁺ junto na solução para desencadear a sua atividade (CHEN et al., 2014; BORCH-PEDERSEN et al., 2016; IGARASHI; SETLOW, 2006). Sendo comum a atuação conjunta de GerB e GerK para a germinação em soluções contendo múltiplos nutrientes, comumente mistura de L-asparagina, D-glicose, D-frutose e íons de potássio (AGFK), onde GerB atua sinergicamente na detecção de L-aminoácidos (BORCH-PEDERSEN et al., 2016; CHEN et al., 2014). A interação entre receptores Ger é relativamente comum, sendo bastante reportado a ação sinérgica entre eles, com a deleção de um comumente afetando a atividade dos demais (BORCH-PEDERSEN et al., 2016; CARR et al., 2010; BARLASS et al., 2002).

Por sua vez GerH, GerL e GerS são reportados atuando conjuntamente para germinação em L-aminoácidos em *B. anthracis*, com GerH sendo dependente da presença de nucleosídeos de purina para exercer suas funções (CARR et al., 2010). Neste mesmo estudos os atores também reportam que tanto GerL quanto GerS bastam sozinhos para a germinação eficiente em meio rico, mas a falta do conjunto GerH, GerL e GerS completo nessa linhagem de *B. anthracis* afetou a germinação em soluções contendo um único nutriente germinante. Complementar a esse estudo, (BARLASS et al., 2002) descreveram os receptores GerI, GerQ e GerL em *B. cereus* onde GerL é descrito como o equivalente a GerA no isolado estudado, sendo responsável por desencadear a germinação na presença de L-Alanina, com GerI e GerQ atuando principalmente na resposta a nucleosídeos. GerL também foi apontado como o principal receptor para a germinação na presença de L-alanina em *B. anthracis* (CARR et al., 2010).

Mediante essas informações, algumas características do RZ2MS9 acabam destacando-se, primeiramente a presença de vários Ger aparentemente não funcionais. Dado que os receptores Ger precisam das suas 3 subunidades para funcionar adequadamente (CHEN et al., 2014; IGARASHI; SETLOW, 2006; BORCH-PEDERSEN et al., 2016), admite-se que GerK, GerS e GerH não seriam funcionais nesse isolado. Fazendo com que GerL seja o único receptor completo presente nessa linhagem, dado que GerP atua mais na facilitação da atividade dos receptores, do que como um receptor propriamente dito. Nesse ponto também chama a atenção a insensibilidade da linhagem RZ2MS9 a L-alanina dado que a presença de GerL é dada como suficiente para a germinação em L-alanina (CARR et al., 2010; BARLASS et al., 2002). Ao mesmo tempo a não identificação dos receptores GerP e GerK, (bem como a não identificação das SASPs presentes no isolado) presentes no banco de dados para a busca *in silico*, na linhagem RZ2MS9 levanta a questão das variações genéticas desses genes dentro de *Bacillus*, e como estas podem estar por traz dessa diferença de comportamento quanto a germinação observada na linhagem RZ2MS9. Bem como essas diferenças observadas tendo uma relação com a proximidade taxonômica dos isolados afetam as dinâmicas dos processos de germinação e esporulação do gênero em si.

Observando os resultados da análise *in silico* é possível notar que em grande parte dos genomas de *Bacillus* utilizados para a busca não foram encontrados os receptores GerA, GerB e GerK presentes em *B. subtilis* (Tabela 32) e considerados os principais receptores para a germinação em *Bacillus* (CHEN et al., 2014; BARLASS et al., 2002; CHRISTIE; SETLOW, 2020). Reforçando as grandes variações encontradas na busca *in silico* como um todo dentro de *Bacillus*, principalmente em espécies taxonomicamente mais distantes de *B. subtilis*. Tal resultados apontam para uma grande diversidade nos genes relacionados a esporulação no gênero, muito provavelmente em função da grande diversidade de nichos ecológicos que esse ocupa, cada qual exigindo diferentes estratégias para regulação dos mecanismos de sobrevivência da bactéria, como a esporulação.

Tabela 32. Ocorrência dos receptores Ger em *Bacillus*

Gene	Ocorrência média por genoma	Percentual de ocorrência
<i>gerAA</i>	1,18	55,86%
<i>gerAB</i>	1,00	51,17%
<i>gerAC</i>	1,00	38,49%
<i>gerBA</i>	1,92	46,47%
<i>gerBB</i>	1,00	44,13%
<i>gerBC</i>	1,00	43,19%
<i>gerKA</i>	1,20	39,43%
<i>gerKC</i>	1,00	36,61%
<i>gerKB</i>	1,00	37,55%
<i>gerPE</i>	1,00	35,68%
<i>gerPC</i>	1,00	51,64%
<i>gerPB</i>	1,00	15,02%
<i>gerPA</i>	1,00	43,66%

*Resultados da busca *in silico* por genes relacionados aos receptores Ger.

Considerando essa perspectiva é interessante observar a diferença de resultados entre as linhagens RZ2MS9 e 168 nos ensaios de germinação. Observa-se uma considerável maior resistência do RZ2MS9 aos ácidos, sendo inclusive observado células vegetativas deste em todos os tratamentos com ácidos orgânicos, apesar de estarem em proporções muito baixas (menos de 5%). Evento contrário ao ocorrido com a linhagem 168 que se comportou mais próximo ao reportado na literatura com os ácidos apresentando um efeito tóxico aos endósporos.

Parte dos ácidos testados já foram avaliados como sendo quimioatrativos para um isolado de *B. velezensis* (JIN et al., 2019) e o ácido málico é reportado como sendo uma das principais fontes iniciais de energia para a germinação do endósporo (CHRISTIE; SETLOW, 2020). Entretanto a baixa proporção de células vegetativas observadas na microscopia associada as reduções na viabilidade total de células, muitas vezes similares as observadas na linhagem 168 (apesar de não serem significativas em função dos maiores desvios observados nos ensaios com a linhagem RZ2MS9), juntamente com o fato das diferenças de OD_{600nm} aferidas nos compostos ácidos terem se dado em função de uma pronunciada precipitação dos endósporos, que não foi observada no controle com L-alanina, levantam questionamentos se o fenômeno observado no RZ2MS9 de fato se refere a uma germinação dos endósporos em função de uma atuação dos ácidos orgânicos como germinantes.

Bernardeau et al. (2017) apontaram a acidez estomacal como um fator relevante para ativação de endósporos de *Bacillus* probióticos, tornando-os mais sensíveis aos nutrientes presentes no intestino para a germinação. Já Abdoarrahem et al. (2009) aponta a ativação alcalina de endósporos de *B. thuringiensis* em solução de carbonato de sódio a pH 10, simulando as condições que esta espécie encontra no trato digestório de insetos durante o ciclo de infecção dos mesmos. Adicionalmente Barlass et al. (2002) aponta uma maior atividade do receptor GerL em *B. cereus* em pH 8,9. Tais resultados apontam que o pH pode ser um fator relevante na dinâmica de germinação dos endósporos, ao mesmo tempo é relatado a ação do ácido acético inibindo de forma reversível a germinação de isolados de *B. subtilis*, *B. cereus* e *Clostridium botulinum*. Analogamente, Ciarciaglini et al. (2000) reportaram que a germinação de *B. subtilis* é completamente inibida em pH 4, com esse efeito sendo potencializado pelo ácido láctico (havendo uma quase completa inibição a germinação a pH 5 na presença desse ácido). Já Palop et al. (1997) aponta que o ácido cítrico pode apresentar um efeito superior ao ácido láctico na germinação de *B. coagulans*.

Um dos efeitos da alta acidez nos endósporos é a alteração da membrana interna deste, aumentando sua permeabilidade e permitindo a liberação do DPA, o que reduz a resistência destes (SETLOW et al., 2002). Juntamente, a incubação dos endósporos em pH 4 seguido de aquecimento a 60°C é relatado como um método para remoção dos cátions, como Ca e Mn, do interior destes (GRANGER et al., 2011), tendo ocorrido um processo semelhante quando as suspensões de endósporos e germinantes foram submetidas a tratamento térmico para quantificação das células

termorresistentes. Com todo esse cenário, é possível traçar hipóteses a respeito do comportamento da linhagem RZ2MS9 em ácidos, onde provavelmente os ácidos avaliados alteraram a permeabilidade da membrana interna do endósporo, fazendo com que ela perdesse parte da sua resistência aos tratamentos térmicos utilizados para quantificar a proporção de endósporos. Somado a isso é reportado que as modificações nessa membrana interna podem aumentar a taxa de germinação espontânea em *B. subtilis* (CHRISTIE; SETLOW, 2020), provavelmente relacionado ao fato que o processo normal de germinação envolve a mudança de permeabilidade por meio de processo ainda não completamente elucidados, fazendo com que a bactéria libere o DPA, se reidrate e volte ao seu metabolismo normal (CHRISTIE; SETLOW, 2020). Carr, Janes e Hanna (2010) reportaram que a ocorrência de danos ao revestimento dos endósporos pode aumentar a sensibilidade destes a germinação. Sendo a linhagem RZ2MS9 uma bactéria isolada da rizosfera do guaranazeiro já é esperado que esta tenha alguma tolerância a ambiente ácidos, dado que é comum que os solos amazônicos tenham pH inferior a 5 (SEGOVIA; ORELLANA; KANZAKI, 2020; SILVA JUNIOR; BOECHAT; CARVALHO, 2012), provavelmente sendo o motivo da diferença de comportamento na germinação observado entre essa linhagem e a 168.

Também corroborando essa hipótese pode ser apontado o efeito do ácido cítrico nos endósporos da linhagem RZ2MS9, onde não houve redução da OD_{600nm} dos endósporos não tratados e também notou-se um considerável aumento da quantidade de células viáveis para esse tratamento. Sendo hipotetizado que a modificação do revestimento dos endósporos causada pelo ácido, que pela literatura é reportado como um dos mais eficientes na inativação de endósporos (PALOP et al., 1997), tenha permitido uma germinação de endósporos superdormentes, endósporos que resistem a germinação mesmo sendo constantemente expostos a germinantes e condições adequadas para tal em função de uma provável má formação dos receptores germinativos (CHEN et al., 2014). A presença de endósporos superdormentes é reportado tanto em *B. subtilis* quanto em *B. cereus*, sendo apontada com a causa da desuniformidade de germinação dos endósporos de *B. cereus* (CHEN et al., 2014). Sendo descartado a hipótese de que esse aumento de células contáveis tenha se dado por algum tipo de crescimento celular, dado que em *B. subtilis* as primeiras divisões celulares ocorrem após 70 min após o início da germinação em condições ideais de crescimento (KEIJSER et al., 2007), podendo demorar até 120 min (SINAI et al., 2015), e no monitoramento da germinação da linhagem RZ2MS9 em meio LB as primeiras divisões celulares demoraram pelo menos 5 h para começarem a ocorrer. Destaca-se que um comportamento similar a esse foi observado com os endósporos não tratados da linhagem 168 no extrato de solo e nos exsudatos de milho inoculados e com os endósporos não tratados da linhagem RZ2MS9 no extrato de solo. Isso somado ao fato de que após 5 h de incubação foi observado a precipitação dos endósporos no extrato de solo e nos exsudatos do milho inoculado (tanto da linhagem RZ2MS9 quanto da linhagem 168) de forma similar ao observado nos ácidos (dados não apresentados) acaba corroborando a hipótese de que os ácidos podem atuar na ativação dos endósporos para uma posterior germinação.

Pensando em termos ecológicos a hipótese da acidez como um elemento de ativação dos endósporos para uma possível condição ótima para germinação faz bastante sentido dado que vários ambientes naturais onde se considera haver uma abundância de nutrientes para o crescimento microbiano ou costumam ser ácidos, como a rizosfera das plantas (RUDOLPH-MOHR et al., 2017; KUZYAKOV; RAZAVI, 2019), ou são precedidos por locais ácidos, como o intestino de muitas espécies animais (BERNARDEAU et al., 2017). Corroborando com isso a observação de células vegetativas da linhagem RZ2MS9 em todos os tratamentos de germinação com ácidos orgânicos, mesmo que em pequena proporção, juntamente com a não observação destas no controle com HCl parece apontar para alguma relação entre essa bactéria e esses compostos que não é compartilhada com a linhagem 168. Isso indica uma possível especificidade de linhagem que aqui é hipotetizado estar relacionado com o nicho a qual os

microrganismos estão adaptados, com a linhagem 168 sendo um *Bacillus* que já apresenta uma considerável domesticação em função do longo tempo de cultivo em condições laboratoriais (ZEIGLER et al., 2008).

A ativação é um procedimento comum a muitos dos protocolos para ensaios de germinação em endósporos (Tabela 33), sendo geralmente realizada por exposição dos endósporos a temperaturas altas por um curto período de tempo (60°C a 70°C por 30 min), garantindo uma maior uniformidade da germinação. É possível observar nos ensaios realizados um notável aumento da sensibilidade da linhagem 168 a L-alanina em função do aumento da severidade dessa ativação, bem como uma notável maior sensibilidade do RZ2MS9 aos exsudatos radiculares, ao extrato de solo e aos ácidos testados como possíveis germinantes no ensaio de OD_{600nm}.

Tabela 33. Procedimentos para lavagem e ativação dos endósporos de *Bacillus spp*, para ensaios de germinação.

Referência	Espécie de <i>Bacillus</i>	Concentração do germinante testada	Lavagem dos Endósporos	Ativação Térmica
(SINAI et al., 2015)	<i>B. subtilis</i>	10mM	3 lavagens em água ao dia por 7 dias	80°C por 30 min.
(LUU et al., 2015)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	10mM	Sucessivas lavagens com água	75°C por vários tempos (0 a 6h)
(KEIJSER et al., 2007)	<i>B. subtilis</i>	-	Sucessivas lavagens com água	70°C por 30 min.
(CHEN et al., 2014)	<i>B. subtilis</i>	10mM	Lavagens com água e centrifugação final em solução de diatrizoato de sódio 50% para purificação	75°C por 30 min.
(VEPACHEDU; SETLOW, 2004)	<i>B. subtilis</i>	10mM	Sucessivas lavagens com água	70°C por 30 min.
(KWON et al., 2022)	<i>B. cereus</i>	50mM	Sucessivas lavagens com água	75°C por 15 min.
(LØVDAL et al., 2012)	<i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>	100mM	Sucessivas lavagens com água	65°C por 20 min.
(RAGKOUSI et al., 2003)	<i>B. subtilis</i>	60mM	Sucessivas lavagens com água	70°C por 30 min.
(VRIES, 2006)	<i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i>	50mM	lavagens com água e purificação por centrifugação pelo gradiente de densidade de Nycodenz	70°C por 30 min.
(KRAWCZYK et al., 2017)	<i>B. subtilis</i>	10mM	Sucessivas lavagens com água	0 ou 30 min. A diferentes temperaturas (70-100°C)
(ABDOARRAHEM et al., 2009)	<i>B. thuringiensis</i>	10mM	Sucessivas lavagens com solução de Ringer	70°C por 20 min.
(CRANE; FRODYMA; BERGSTROM, 2014)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	25mM	Sucessivas lavagens com água	Sem tratamento de ativação
(WAX; FREESE; CASHEL, 1967)	<i>B. subtilis</i>	4mM	Digestão com lisozima 0,1mg/l, SDS 1% seguido de sucessivas lavagens com água	70°C por 1h.

Não são bem conhecidas as causas pelos quais esse tratamento térmico aumenta a sensibilidade dos endósporos a germinação. Entretanto Krawczyk et al. (2017) reportaram que quanto maior for a recalcitrância dos endósporos a germinação maior é o tempo necessário de exposição ao calor para uma ativação eficiente dos endósporos. Carr, Janes e Hanna (2010) reportaram que a digestão parcial do revestimento dos endósporos com lisozima e SDS aumenta a eficiência com que os compostos germinantes são reconhecidos podendo fazer até com que uma linhagem de *B. anthracis* deficiente para GerP tenham uma germinação igual as do respectivo selvagem. Sendo necessários mais estudos para avaliar como a ativação térmica atua nos endósporos e se o efeito da acidez é de alguma forma similar a essa ativação.

Em contrapartida essa necessidade de ativação também representa uma limitação importante nas metodologias de avaliação da germinação e na aplicabilidade dos endósporos a campo. Dado que se a germinação eficiente dos endósporos é dependente de todo um pré-tratamento prévio, que inclusive pode reduzir a resistência destes, então o uso direto de endósporos como inoculante, como feito hoje, seria um modo bastante ineficiente de

utilizar essas bactérias. Sendo até em função disso que nos ensaios realizados neste trabalho optou-se preferencialmente pelo uso de endósporos não ativados, sendo a ativação realizada em alguns ensaios onde se tinha maior interesse de se avaliar esse possível efeito de maior sensibilidade dos endósporos, sendo o ensaio de germinação dos exsudatos um desses.

Além disso, é interessante observar como nos dois ensaios onde foram avaliados tanto endósporos não ativados quanto ativados (ensaio de OD_{600nm} dos possíveis germinantes e ensaio de germinação nos exsudatos) é nítido o aumento da sensibilidade da linhagem RZ2MS9 com a ativação, tornando a bactéria mais sensível a maioria dos ácidos avaliados, aos exsudatos testados e ao extrato de solo, mas não foi capaz de fazer a bactéria apresentar alguma resposta significativa em L-alanina. No ensaio de germinação nos exsudatos essa ativação teve efeito bastante deletério, proporcionando uma significativa morte celular nos exsudatos testados e no extrato de solo juntamente com um significativo aumento na proporção de endósporos termo resistentes, indicando uma grande mortalidade dos endósporos que por algum motivo haviam perdido sua resistência ao calor. Ao mesmo tempo esse ensaio também mostra que mesmo não estando totalmente resistentes esses endósporos ainda apresentavam alguma tolerância aos compostos dos extratos, que foi perdida com o procedimento de ativação realizado.

Por fim destaca-se a importância da utilização de metodologias diversas para o estudo da esporulação a germinação. Um ponto que foi comum a muitos dos experimentos deste trabalho foi uma aparente divergência entre os resultados de experimentos observando o mesmo fenômeno por diferentes métodos. Entretanto o que a priori parece contraditório também pode se apresentar como uma poderosa ferramenta para uma análise mais completa do fenômeno observado, permitindo que um método cubra as limitações do outro e com isso possibilitando uma observação mais completa do fenômeno. Principalmente em relação aos ensaios de medição de OD_{600nm} e viabilidade de células cujos resultados foram bastante complementados pelas observações de microscopia. Ao mesmo tempo adotando uma perspectiva voltada para o estudo dos endósporos para uso na agricultura ressalta-se a importância da adaptação das metodologias existentes para esses tipos de estudo, com procedimentos como a ativação térmica dos endósporos podendo não fazer sentido na perspectiva de uma emulação da aplicação dessas células em plantas.

Referências

- ABABOUC, L.H.; BOUQUARTACHA, F.; BUSTA, F.F.. Inhibition of l-alanine triggered *Bacillus cereus* T spore germination and outgrowth by fatty acids and glyceryl monododecanoate. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 385-396, out. 1994. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1994.1044>.
- ABDOARRAHEM, M. M. *et al.* Genetic Basis for Alkaline Activation of Germination in *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 19, p. 6410-6413, out. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00962-09>.
- ALOO, B.N.; MAKUMBA, B.A.; MBEGA, E.R.. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 219, p. 26-39, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>.
- ALOVISI, Alves Alexandre *et al.* Atributos de fertilidade dos solos sob vegetação nativa do bioma cerrado. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 38-52, 15 jul. 2021. Companhia Brasileira de Producao Cientifica. <http://dx.doi.org/10.6008/cbpc2179-6858.2021.007.0004>.
- ASNICAR, Francesco *et al.* Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, 19 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16366-7>.

- ATRIH, A.; FOSTER, S.J.. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 364-372, 2 ago. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01394.x>.
- AZIZOGLU, Ugur. *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of bt. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 76, n. 11, p. 1379-1385, 17 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>.
- BARLASS, Paul J. *et al.* Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of gerl and gerq operons c cthe genbank accession numbers for the gerl and gerq operons reported in this paper are af387344 and ay037930, respectively.. **Microbiology**, [S.L.], v. 148, n. 7, p. 2089-2095, 1 jul. 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-7-2089>.
- BATISTA, Bruna Durante *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 206, p. 33-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- BEAUREGARD, Pascale B. *et al.* *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 17, 8 abr. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1218984110>.
- BERNARDEAU, M. *et al.* Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 54, n. 8, p. 2570-2584, 23 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2688-3>.
- BERNINGER, Teresa *et al.* Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 277-301, 4 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12880>.
- BLOCHER, J C; BUSTA, F F. Inhibition of germinant binding by bacterial spores in acidic environments. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 274-279, ago. 1985. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.50.2.274-279.1985>.
- BORCH-PEDERSEN, Kristina *et al.* The Cooperative and Interdependent Roles of GerA, GerK, and Ynd in Germination of *Bacillus licheniformis* Spores. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 14, p. 4279-4287, 15 jul. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00594-16>.
- BREMER, Erhard *et al.* A model industrial workhorse: *Bacillus subtilis* strain 168 and its genome after a quarter of a century. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 1203-1231, abr. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.14257>.
- BUHR, T.L.; MCPHERSON, D.C.; GUTTING, B.W.. Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 105, n. 5, p. 1604-1613, nov. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03899.x>.
- BUTZIN, Xuan Yi *et al.* Analysis of the Effects of a gerP Mutation on the Germination of Spores of *Bacillus subtilis*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 194, n. 21, p. 5749-5758, nov. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01276-12>.
- CARR, Katherine A. *et al.* The role of *Bacillus anthracis* germinant receptors in germination and virulence. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 365-375, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06972.x>.

- CARR, Katherine A.; JANES, Brian K.; HANNA, Philip C.. Role of the gerP Operon in Germination and Outgrowth of *Bacillus anthracis* Spores. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. e9128, 9 fev. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009128>.
- CFIC. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Lista de inoculantes e microorganismos promotores de crescimento de plantas**. [S.I.]: Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos (CFIC), 2023. 15 p. Consulta Pessoal à CFIC através do canal oficial de contato pelo e-mail cfic.dfia@agricultura.gov.br.
- CHARRON-LAMOUREUX, Vincent; BEAUREGARD, Pascale B.. *Arabidopsis thaliana* Seedlings Influence *Bacillus subtilis* Spore Formation. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [S.L.], v. 32, n. 9, p. 1188-1195, set. 2019. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-10-18-0278-r>.
- CHEN, Yan *et al.* Levels of Germination Proteins in *Bacillus subtilis* Dormant, Superdormant, and Germinating Spores. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. e95781, 21 abr. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095781>.
- CHO, Won-Il; CHUNG, Myong-Soo. *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. **Food Science And Biotechnology**, [S.L.], v. 29, n. 11, p. 1447-1461, 6 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>.
- CHRISTIE, Graham; SETLOW, Peter. *Bacillus* spore germination: knowns, unknowns and what we need to learn. **Cellular Signalling**, [S.L.], v. 74, p. 109729, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109729>.
- CIARCIAGLINI, Gianni *et al.* Germination-Induced Bioluminescence, a Route To Determine the Inhibitory Effect of a Combination Preservation Treatment on Bacterial Spores. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 9, p. 3735-3742, set. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.9.3735-3742.2000>.
- COELHO, Antônio Marcos. **Nutrição e Adução do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2006. 10 p. (CIRCULAR TÉCNICA). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/490410/1/Circ78.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- CRANE, J.M.; FRODYMA, M.e.; BERGSTROM, G.C.. Nutrient-induced spore germination of a *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol agent on wheat spikes. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 116, n. 6, p. 1572-1583, 17 mar. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12480>.
- DENG, Chao *et al.* Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 2194-2209, 23 jul. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6072194>.
- DONNELLAN, J. Edward; NAGS, Ella H.; LEVINSON, Hillel S.. CHEMICALLY DEFINED, SYNTHETIC MEDIA FOR SPORULATION AND FOR GERMINATION AND GROWTH OF *BACILLUS SUBTILIS*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 332-336, fev. 1964. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.87.2.332-336.1964>.
- FAN, Ben *et al.* Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, 21 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-116>.
- FAN, Ben *et al.* Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, 21 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-116>.

- FIGUEREDO, Everthon Fernandes *et al.* The key role of indole-3-acetic acid biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 in promoting maize growth revealed by the ipdC gene knockout mediated by the CRISPR-Cas9 system. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 266, p. 127218, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127218>.
- GALPERIN, Michael Y. *et al.* Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the Firmicutes. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 204, n. 6, 21 jun. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00079-22>.
- GLADSTONE, G. P.; FILDES, Paul. A Simple Culture Medium for General Use Without Meat Extract or Peptone. **The British Journal Of Experimental Pathology**, Londres, v. 21, n. 4, p. 161-173, ago. 1940. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2065450/>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- GRANGER, Amanda C. *et al.* Effects of Mn and Fe Levels on *Bacillus subtilis* Spore Resistance and Effects of Mn²⁺, Other Divalent Cations, Orthophosphate, and Dipicolinic Acid on Protein Resistance to Ionizing Radiation. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 32-40, jan. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01965-10>.
- GRAY, Declan A. *et al.* Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, 21 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08719-8>.
- HAGEMAN, J H *et al.* Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 160, n. 1, p. 438-441, out. 1984. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.160.1.438-441.1984>.
- HIGGINS, Douglas; DWORKIN, Jonathan. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 131-148, jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>.
- HORNSTRA, Luc M. *et al.* Influence of Sporulation Medium Composition on Transcription of ger Operons and the Germination Response of Spores of *Bacillus cereus* ATCC 14579. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 3746-3749, maio 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.72.5.3746-3749.2006>.
- IGARASHI, Takao; SETLOW, Peter. Transcription of the *Bacillus subtilis* gerK Operon, Which Encodes a Spore Germinant Receptor, and Comparison with That of Operons Encoding Other Germinant Receptors. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 188, n. 11, p. 4131-4136, jun. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00265-06>.
- JIN, Yeqing *et al.* Role of Maize Root Exudates in Promotion of Colonization of *Bacillus velezensis* Strain S3-1 in Rhizosphere Soil and Root Tissue. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 76, n. 7, p. 855-862, 9 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01699-4>.
- JOHNSTONE, K *et al.* Zinc release and the sequence of biochemical events during triggering of *Bacillus megaterium* KM spore germination. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 208, n. 2, p. 407-411, 15 nov. 1982. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2080407>.
- JONES, D. L.; NGUYEN, C.; FINLAY, R. D.. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. **Plant And Soil**, [S.L.], v. 321, n. 1-2, p. 5-33, 25 fev. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>.

- KEIJSER, Bart J. F. *et al.* Analysis of Temporal Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Germination and Outgrowth. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 189, n. 9, p. 3624-3634, maio 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01736-06>.
- KRAFFCZYK, Ingrid; TROLLDENIER, G.; BERINGER, H.. Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. **Soil Biology And Biochemistry**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 315-322, jan. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90025-7](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(84)90025-7).
- KRAWCZYK, Antonina O. *et al.* Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA 2mob Operon in Foodborne Strains of *Bacillus subtilis*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 83, n. 7, abr. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03122-16>.
- KUZYAKOV, Yakov; RAZAVI, Bahar S.. Rhizosphere size and shape: temporal dynamics and spatial stationarity. **Soil Biology And Biochemistry**, [S.L.], v. 135, p. 343-360, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.011>.
- KWON, Seung-Wook *et al.* Germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579 spore at various conditions and inactivation of the germinated cells with microwave heating and UVC treatment in milk samples. **Lwt**, [S.L.], v. 154, p. 112702, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112702>.
- LANA, Ubiraci Gomes de Paula *et al.* **Avaliação da qualidade de inoculantes à base de *Bacillus* para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema on farm**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2022. 28 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1143636/1/Boletim-238-Avaliacao-da-qualidade-de-inoculantes-a-base-de-Bacillus-para-promocao-de-crescimento-de-plantas.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- LØVDAL, Irene s *et al.* Role of the gerA operon in L-alanine germination of *Bacillus licheniformis* spores. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, 15 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-34>.
- LU, Shuang *et al.* Nutrient L-Alanine-Induced Germination of *Bacillus* Improves Proliferation of Spores and Exerts Probiotic Effects in vitro and in vivo. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 2 dez. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.796158>.
- LUU, Stephanie *et al.* The Effects of Heat Activation on *Bacillus* Spore Germination, with Nutrients or under High Pressure, with or without Various Germination Proteins. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 81, n. 8, p. 2927-2938, 15 abr. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00193-15>.
- MOLINA-SANTIAGO, Carlos *et al.* The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, 23 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09944-x>.
- MONNERAT, Rose *et al.* **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. 47 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1122563/1/documentos-36916.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- MUTLU, Alper *et al.* A spore quality–quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. **The Isme Journal**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 2703-2714, 28 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-020-0721-4>.

- NARULA, Jatin *et al.* Ultrasensitivity of the *Bacillus subtilis* sporulation decision. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 109, n. 50, 19 nov. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1213974109>.
- NUKUI, Masatoshi *et al.* Structure and Molecular Mechanism of *Bacillus anthracis* Cofactor-Independent Phosphoglycerate Mutase: a crucial enzyme for spores and growing cells of *Bacillus* species. **Biophysical Journal**, [S.L.], v. 92, n. 3, p. 977-988, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.093872>.
- PALOP, Alfredo *et al.* Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 25-30, ago. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00083-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00083-4).
- PEARSON, William R.. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. **Current Protocols In Bioinformatics**, [S.L.], v. 42, n. 1, jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>.
- PEDREIRA, Tiago; ELFMANN, Christoph; STÜLKE, Jörg. The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 50, n. D1, p. D875-D882, 19 out. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab943>.
- POSADA-URIBE, Luisa F.; ROMERO-TABAREZ, Magally; VILLEGAS-ESCOBAR, Valeska. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 1879-1888, 2 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1>.
- RADDADI, Noura *et al.* *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 481-494, dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03175344>.
- RADDADI, Noura *et al.* Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 47-52, mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03179444>.
- RAGKOUSI, Katerina *et al.* Identification of a New Gene Essential for Germination of *Bacillus subtilis* Spores with Ca²⁺ -Dipicolinate. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 185, n. 7, p. 2315-2329, abr. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.185.7.2315-2329.2003>.
- ROST, Burkhard. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Engineering, Design And Selection**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 85-94, fev. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/protein/12.2.85>.
- RUDOLPH-MOHR, Nicole *et al.* Mapping water, oxygen, and pH dynamics in the rhizosphere of young maize roots. **Journal Of Plant Nutrition And Soil Science**, [S.L.], v. 180, n. 3, p. 336-346, 19 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jpln.201600120>.
- SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W.. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. [S.I.]: Cold Spring Harbor Laboratory Pr., 2006. 2344 p.

- SEGOVIA, Jorge Federico Orellana; ORELLANA, Jorge Breno Palheta; KANZAKI, Luis Isamu Barros. Características físico-químicas dos principais solos na Amazônia. In: SEGOVIA, Jorge Federico Orellana (ed.). **Floricultura tropical: técnicas e inovações para negócios sustentáveis na amazônia**. Brasília: EMBRAPA, 2020. p. 43-66. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/220738/1/CPAF-AP-2020-Floricultura-Tropical.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- SETLOW, B. *et al.* Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 92, n. 2, p. 362-375, fev. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01540.x>.
- SILVA JUNIOR, Carlos Antonio da; BOECHAT, Cácio Luiz; CARVALHO, Laércio Alves de. ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO SOB CONVERSÃO DE FLORESTA AMAZÔNICA PARA DIFERENTES SISTEMAS NA REGIÃO NORTE DO PARÁ, BRASIL. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 566-572, jul. 2012. Disponível em: <http://mtc-m16d.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m19/2012/12.11.15.17/doc/9746.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- SINAI, Lior *et al.* The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 695-707, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.019>.
- SINNELÄ, Martti Tapani *et al.* Effect of Calcium and Manganese Supplementation on Heat Resistance of Spores of *Bacillus* Species Associated With Food Poisoning, Spoilage, and Fermentation. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 11 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.744953>.
- SINNELÄ, Martti *et al.* Effects of Calcium and Manganese on Sporulation of *Bacillus* Species Involved in Food Poisoning and Spoilage. **Foods**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 119, 7 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods8040119>.
- SOUSA, Djalma Martinhão Gomes de *et al.* **Manejo da Adubação Fosfatada para Culturas Anuais no Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, 2016. 10 p. (CIRCULAR TÉCNICA). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/154889/1/CT-33.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- STÖCKEL, S. *et al.* Effect of supplementary manganese on the sporulation of *Bacillus* endospores analysed by Raman spectroscopy. **Journal Of Raman Spectroscopy**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 1469-1477, 29 abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.2292>.
- STÜLKE, Jörg *et al.* *Bacillus subtilis*, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 205, n. 5, 25 maio 2023. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00102-23>.
- SU, Yuan *et al.* *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, 3 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>.
- SUN, Gaohui *et al.* Regulation of pro- σ K activation: a key checkpoint in *Bacillus subtilis* sporulation. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 2366-2373, 10 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.15415>.
- SUN, Rongxue; VERMEULEN, An; DEVLIEGHERE, Frank. Modeling the combined effect of temperature, pH, acetic and lactic acid concentrations on the growth/no growth interface of acid-tolerant *Bacillus* spores. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 360, p. 109419, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109419>.
- TEHRI, Nimisha *et al.* Biomarkers of bacterial spore germination. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 9, p. 513-523, 2 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-018-1361-z>.

- VAN GESTEL, Jordi; ACKERMANN, Martin; WAGNER, Andreas. Microbial life cycles link global modularity in regulation to mosaic evolution. **Nature Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 1184-1196, 22 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-019-0939-6>.
- VEPACHEDU, Venkata Ramana; SETLOW, Peter. Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature sensitive spo mutations in the spoVA operon. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 239, n. 1, p. 71-77, out. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.022>.
- VIDAL-QUIST, J. Cristian *et al.* *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 474-489, 25 jul. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12175>.
- VRIES, Ynte Piet de. ***Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination**. 2006. 133 f. Tese (Doutorado), Wageningen University, Wageningen, 2006. Disponível em: <https://edepot.wur.nl/121760>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- WAX, Richard; FREESE, Ernst; CASHEL, Michael. Separation of Two Functional Roles of l-Alanine in the Initiation of *Bacillus subtilis* Spore Germination. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 522-529, set. 1967. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.94.3.522-529.1967>.
- YI, Xuan; SETLOW, Peter. Studies of the Commitment Step in the Germination of Spores of *Bacillus* Species. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 192, n. 13, p. 3424-3433, jul. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00326-10>.
- ZEIGLER, Daniel R. *et al.* The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 190, n. 21, p. 6983-6995, nov. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00722-08>.
- ZHANG, Kang; DUAN, Xuguo; WU, Jing. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, 16 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27943>.
- ZHOU, Cuixia *et al.* Optimization of alkaline protease production by rational deletion of sporulation related genes in *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 18, n. 1, 25 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1174-1>.

Apêndices

APÊNDICE A.

Lista dos genes utilizados para as buscas *in silico*

Gene	Banco de dados de origem
<i>yaaC</i>	SubtWiki: BSU_00080
<i>yaaH</i>	SubtWiki: BSU_00160
<i>bofA</i>	SubtWiki: BSU_00230 UniProt: BOFA_BACSU
<i>csfB</i>	SubtWiki: BSU_00240 UniProt: GIN_BACSU
<i>ricT</i>	SubtWiki: BSU_00320
<i>abrB</i>	SubtWiki: BSU_00370 UniProt: ABRB_BACSU
<i>yabG</i>	SubtWiki: BSU_00430 UniProt: YABG_BACSU
<i>sspF</i>	SubtWiki: BSU_00450
<i>spoVG</i>	SubtWiki: BSU_00490 UniProt: SP5G_BACSU
<i>Ctc</i>	SubtWiki: BSU_00520 UniProt: CTC_BACSU
<i>Fin</i>	SubtWiki: BSU_00540 UniProt: FIN_BACSU
<i>spoVT</i>	SubtWiki: BSU_00560 UniProt: SPOVT_BACSU
<i>yabP</i>	SubtWiki: BSU_00600 UniProt: YABP_BACSU
<i>yabQ</i>	SubtWiki: BSU_00610 UniProt: YABQ_BACSU
<i>divIC</i>	SubtWiki: BSU_00620 UniProt: DIVIC_BACSU
<i>spoIIE</i>	SubtWiki: BSU_00640 UniProt: SP2E_BACSU
<i>yabS</i>	SubtWiki: BSU_00650
<i>yabT</i>	SubtWiki: BSU_00660
<i>ftsH</i>	SubtWiki: BSU_00690 UniProt: FTSH_BACSU
<i>mcsA</i>	SubtWiki: BSU_00840
<i>mcsB</i>	SubtWiki: BSU_00850
<i>clpC</i>	SubtWiki: BSU_00860
<i>disA</i>	SubtWiki: BSU_00880 UniProt: DISA_BACSU
<i>sigH</i>	SubtWiki: BSU_00980 UniProt: RPSH_BACSU
<i>ybaK</i>	SubtWiki: BSU_01520
<i>cwlD</i>	SubtWiki: BSU_01530
<i>gerD</i>	SubtWiki: BSU_01550 UniProt: GERD_BACSU
<i>kbaA</i>	SubtWiki: BSU_01560
<i>pdaB</i>	SubtWiki: BSU_01570
<i>namZ</i>	SubtWiki: BSU_01650
<i>skfB</i>	SubtWiki: BSU_01920 UniProt: SKFB_BACSU
<i>skfC</i>	SubtWiki: BSU_01935 UniProt: SKFC_BACSU
<i>csgA</i>	SubtWiki: BSU_02070 UniProt: CSGA_BACSU
<i>ybxH</i>	SubtWiki: BSU_02080
<i>ybeF</i>	SubtWiki: BSU_02150
<i>ybjf</i>	SubtWiki: BSU_02250
<i>cwlJ</i>	SubtWiki: BSU_02600 UniProt: CWLJ_BACSU
<i>rapJ</i>	SubtWiki: BSU_02820 UniProt: RAPJ_BACSU
<i>yegF</i>	SubtWiki: BSU_03090
<i>yegG</i>	SubtWiki: BSU_03100
<i>yegH</i>	SubtWiki: BSU_03110
<i>yegI</i>	SubtWiki: BSU_03120
<i>yegL</i>	SubtWiki: BSU_03190

<i>yckC</i>	SubtWiki: BSU_03390	
<i>yckD</i>	SubtWiki: BSU_03400	
<i>srfAA</i>	SubtWiki: BSU_03480	UniProt: SRFAA_BACSU
<i>srfAC</i>	SubtWiki: BSU_03510	UniProt: SRFAC_BACSU
<i>srfAD</i>	SubtWiki: BSU_03520	UniProt: SRFAD_BACSU
<i>yckG</i>	SubtWiki: BSU_03680	
<i>gerKD</i>	SubtWiki: BSU_03690	
<i>gerKA</i>	SubtWiki: BSU_03700	
<i>gerKC</i>	SubtWiki: BSU_03710	
<i>gerKB</i>	SubtWiki: BSU_03720	
<i>rapC</i>	SubtWiki: BSU_03770	UniProt: RAPC_BACSU
<i>glcU</i>	SubtWiki: BSU_03920	UniProt: GLCU_BACSU
<i>Gdb</i>	SubtWiki: BSU_03930	UniProt: DHG_BACSU
<i>pxpB</i>	SubtWiki: BSU_04080	UniProt: PXPB_BACSU
<i>pxpC</i>	SubtWiki: BSU_04090	UniProt: PXPC_BACSU
<i>kipR</i>	SubtWiki: BSU_04100	
<i>lipC</i>	SubtWiki: BSU_04110	UniProt: LIPC_BACSU
<i>ydcA</i>	SubtWiki: BSU_04610	
<i>ssdC</i>	SubtWiki: BSU_04630	
<i>rsbU</i>	SubtWiki: BSU_04700	UniProt: RSBU_BACSU
<i>sigB</i>	SubtWiki: BSU_04730	UniProt: RPSB_BACSU
<i>lrpA</i>	SubtWiki: BSU_05050	
<i>lrpB</i>	SubtWiki: BSU_05060	
<i>ydzH</i>	SubtWiki: BSU_05520	
<i>ydzR</i>	SubtWiki: BSU_05529	
<i>ydfR</i>	SubtWiki: BSU_05530	
<i>ydfS</i>	SubtWiki: BSU_05540	
<i>cotP</i>	SubtWiki: BSU_05550	UniProt: COTP_BACSU
<i>ydgA</i>	SubtWiki: BSU_05560	
<i>ydgB</i>	SubtWiki: BSU_05570	
<i>ydbD</i>	SubtWiki: BSU_05710	UniProt: YDHD_BACSU
<i>ydbF</i>	SubtWiki: BSU_05730	
<i>pboB</i>	SubtWiki: BSU_05740	
<i>ydpP</i>	SubtWiki: BSU_06280	
<i>yeaA</i>	SubtWiki: BSU_06290	
<i>cota</i>	SubtWiki: BSU_06300	UniProt: COTA_BACSU
<i>yezF</i>	SubtWiki: BSU_06559	
<i>sapB</i>	SubtWiki: BSU_06650	UniProt: SAPB_BACSU
<i>rapH</i>	SubtWiki: BSU_06830	UniProt: RAPH_BACSU
<i>cotJ_A</i>	SubtWiki: BSU_06890	
<i>cotJ_B</i>	SubtWiki: BSU_06900	
<i>cotJ_C</i>	SubtWiki: BSU_06910	
<i>yesJ</i>	SubtWiki: BSU_06920	
<i>yesK</i>	SubtWiki: BSU_06930	
<i>lpID</i>	SubtWiki: BSU_07130	
<i>yetF</i>	SubtWiki: BSU_07140	

<i>yefO</i>	SubtWiki: BSU_07250	
<i>yfnH</i>	SubtWiki: BSU_07270	
<i>yfnG</i>	SubtWiki: BSU_07280	
<i>yfnF</i>	SubtWiki: BSU_07290	
<i>yfnE</i>	SubtWiki: BSU_07300	
<i>yfnD</i>	SubtWiki: BSU_07310	
<i>yfnN</i>	SubtWiki: BSU_07620	
<i>yfkT</i>	SubtWiki: BSU_07760	
<i>yfkS</i>	SubtWiki: BSU_07770	
<i>yfkR</i>	SubtWiki: BSU_07780	
<i>yfkQ</i>	SubtWiki: BSU_07790	
<i>yfkD</i>	SubtWiki: BSU_07930	
<i>pdaA</i>	SubtWiki: BSU_07980	UniProt: PDAA_BACSU
<i>sspH</i>	SubtWiki: BSU_08110	UniProt: SSPH_BACSU
<i>yfbS</i>	SubtWiki: BSU_08640	UniProt: YFHS_BACSU
<i>fabL</i>	SubtWiki: BSU_08650	
<i>spo0M</i>	SubtWiki: BSU_08760	UniProt: SP0M_BACSU
<i>ygzA</i>	SubtWiki: BSU_08770	
<i>ygzC</i>	SubtWiki: BSU_08779	
<i>ygaK</i>	SubtWiki: BSU_08800	
<i>yhbB</i>	SubtWiki: BSU_08920	
<i>prkA</i>	SubtWiki: BSU_08970	
<i>yhbH</i>	SubtWiki: BSU_08980	
<i>yhcM</i>	SubtWiki: BSU_09140	
<i>yhcN</i>	SubtWiki: BSU_09150	UniProt: YHCN_BACSU
<i>yhcO</i>	SubtWiki: BSU_09165	
<i>yhcQ</i>	SubtWiki: BSU_09180	
<i>yhcT</i>	SubtWiki: BSU_09210	
<i>yhcV</i>	SubtWiki: BSU_09230	
<i>yhdB</i>	SubtWiki: BSU_09350	
<i>yhdC</i>	SubtWiki: BSU_09360	
<i>spoVR</i>	SubtWiki: BSU_09400	
<i>bmrC</i>	SubtWiki: BSU_09710	
<i>bmrD</i>	SubtWiki: BSU_09720	
<i>sspB</i>	SubtWiki: BSU_09750	
<i>yheD</i>	SubtWiki: BSU_09770	UniProt: YHED_BACSU
<i>yheC</i>	SubtWiki: BSU_09780	
<i>yhaX</i>	SubtWiki: BSU_09830	
<i>scoC</i>	SubtWiki: BSU_09990	
<i>yhzF</i>	SubtWiki: BSU_10009	
<i>ecsA</i>	SubtWiki: BSU_10040	UniProt: ECSA_BACSU
<i>yhfA</i>	SubtWiki: BSU_10080	
<i>pbpF</i>	SubtWiki: BSU_10110	UniProt: PBPF_BACSU
<i>yhfM</i>	SubtWiki: BSU_10280	
<i>yhfN</i>	SubtWiki: BSU_10290	
<i>yhfW</i>	SubtWiki: BSU_10390	

<i>yhxC</i>	SubtWiki: BSU_10400	
<i>ybjQ</i>	SubtWiki: BSU_10600	
<i>ybjR</i>	SubtWiki: BSU_10610	
<i>gerPE</i>	SubtWiki: BSU_10680	UniProt: GERPE_BACSU
<i>gerPC</i>	SubtWiki: BSU_10700	UniProt: GERPC_BACSU
<i>gerPB</i>	SubtWiki: BSU_10710	UniProt: GERPB_BACSU
<i>gerPA</i>	SubtWiki: BSU_10720	UniProt: GERPA_BACSU
<i>ysisJ</i>	SubtWiki: BSU_10740	
<i>ysisN</i>	SubtWiki: BSU_10780	
<i>asno</i>	SubtWiki: BSU_10790	UniProt: ASNO_BACSU
<i>ysisP</i>	SubtWiki: BSU_10810	
<i>ysisY</i>	SubtWiki: BSU_10900	
<i>ysisZ</i>	SubtWiki: BSU_10910	
<i>yitA</i>	SubtWiki: BSU_10920	
<i>yitB</i>	SubtWiki: BSU_10930	
<i>yitC</i>	SubtWiki: BSU_10940	
<i>yitD</i>	SubtWiki: BSU_10950	
<i>yitE</i>	SubtWiki: BSU_10960	
<i>yitF</i>	SubtWiki: BSU_10970	
<i>yitG</i>	SubtWiki: BSU_10980	
<i>yitQ</i>	SubtWiki: BSU_11080	
<i>yizC</i>	SubtWiki: BSU_11139	
<i>yizC</i>	SubtWiki: BSU_11260	
<i>yjaU</i>	SubtWiki: BSU_11280	
<i>yjaV</i>	SubtWiki: BSU_11290	
<i>yizB</i>	SubtWiki: BSU_11320	
<i>yjaZ</i>	SubtWiki: BSU_11350	
<i>oppA/1</i>	SubtWiki: BSU_11381	
<i>oppA/2</i>	SubtWiki: BSU_11382	
<i>yjbA</i>	SubtWiki: BSU_11410	
<i>oppA</i>	SubtWiki: BSU_11430	UniProt: OPPA_BACSU
<i>oppB</i>	SubtWiki: BSU_11440	UniProt: OPPB_BACSU
<i>oppC</i>	SubtWiki: BSU_11450	UniProt: OPPC_BACSU
<i>oppD</i>	SubtWiki: BSU_11460	UniProt: OPPD_BACSU
<i>oppF</i>	SubtWiki: BSU_11470	UniProt: OPPF_BACSU
<i>SpX</i>	SubtWiki: BSU_11500	UniProt: SPX_BACSU
<i>yjbE</i>	SubtWiki: BSU_11510	
<i>mecA</i>	SubtWiki: BSU_11520	UniProt: MECA1_BACSU
<i>pepF</i>	SubtWiki: BSU_11540	
<i>tenA</i>	SubtWiki: BSU_11650	UniProt: TENA_BACSU
<i>tenI</i>	SubtWiki: BSU_11660	UniProt: TENI_BACSU
<i>cotO</i>	SubtWiki: BSU_11730	
<i>cotZ</i>	SubtWiki: BSU_11740	UniProt: COTZ_BACSU
<i>cotY</i>	SubtWiki: BSU_11750	UniProt: COTY_BACSU
<i>cotX</i>	SubtWiki: BSU_11760	UniProt: COTX_BACSU
<i>cotW</i>	SubtWiki: BSU_11770	UniProt: COTW_BACSU

<i>cotV</i>	SubtWiki: BSU_11780	UniProt: COTV_BACSU
<i>yjcA</i>	SubtWiki: BSU_11790	UniProt: YJCA_BACSU
<i>spoVIF</i>	SubtWiki: BSU_11810	
<i>yjdH</i>	SubtWiki: BSU_12050	
<i>yjfA</i>	SubtWiki: BSU_12110	
<i>yjmC</i>	SubtWiki: BSU_12320	
<i>yjmD</i>	SubtWiki: BSU_12330	
<i>uxuA</i>	SubtWiki: BSU_12340	
<i>yjmF</i>	SubtWiki: BSU_12350	
<i>exuT</i>	SubtWiki: BSU_12360	
<i>exuR</i>	SubtWiki: BSU_12370	
<i>uxaB</i>	SubtWiki: BSU_12380	
<i>uxaA</i>	SubtWiki: BSU_12390	
<i>yjnA</i>	SubtWiki: BSU_12400	
<i>rapa</i>	SubtWiki: BSU_12430	UniProt: RAPA_BACSU
<i>yjqC</i>	SubtWiki: BSU_12490	
<i>spoIISA</i>	SubtWiki: BSU_12830	UniProt: SP2SA_BACSU
<i>ykeZ</i>	SubtWiki: BSU_13050	
<i>ykjA</i>	SubtWiki: BSU_13060	
<i>ykoN</i>	SubtWiki: BSU_13350	
<i>ykoP</i>	SubtWiki: BSU_13360	
<i>ykoQ</i>	SubtWiki: BSU_13370	
<i>ykoS</i>	SubtWiki: BSU_13380	
<i>ykoT</i>	SubtWiki: BSU_13390	
<i>ligD</i>	SubtWiki: BSU_13400	UniProt: LIGD_BACSU
<i>ykoV</i>	SubtWiki: BSU_13410	
<i>meeY</i>	SubtWiki: BSU_13440	
<i>sspD</i>	SubtWiki: BSU_13470	UniProt: SSPD_BACSU
<i>kinE</i>	SubtWiki: BSU_13530	UniProt: KINE_BACSU
<i>spoOE</i>	SubtWiki: BSU_13640	UniProt: SP0E_BACSU
<i>kinD</i>	SubtWiki: BSU_13660	UniProt: KIND_BACSU
<i>ykpI</i>	SubtWiki: BSU_13710	
<i>ykpP</i>	SubtWiki: BSU_13780	UniProt: YKVP_BACSU
<i>ykpQ</i>	SubtWiki: BSU_13790	
<i>ykeZ</i>	SubtWiki: BSU_13799	
<i>ykpU</i>	SubtWiki: BSU_13830	UniProt: YKVU_BACSU
<i>stoA</i>	SubtWiki: BSU_13840	UniProt: STOA_BACSU
<i>splA</i>	SubtWiki: BSU_13920	
<i>splB</i>	SubtWiki: BSU_13930	UniProt: SPL_BACSU
<i>yknB</i>	SubtWiki: BSU_13940	
<i>kinA</i>	SubtWiki: BSU_13990	UniProt: KINA_BACSU
<i>ldt</i>	SubtWiki: BSU_14040	
<i>ykuS</i>	SubtWiki: BSU_14200	
<i>rok</i>	SubtWiki: BSU_14240	UniProt: ROK_BACSU
<i>yknT</i>	SubtWiki: BSU_14250	
<i>yknW</i>	SubtWiki: BSU_14340	UniProt: YKNW_BACSU

<i>yknX</i>	SubtWiki: BSU_14350	UniProt: YKNX_BACSU
<i>yknY</i>	SubtWiki: BSU_14360	UniProt: YKNY_BACSU
<i>yknZ</i>	SubtWiki: BSU_14370	UniProt: YKNZ_BACSU
<i>kinC</i>	SubtWiki: BSU_14490	UniProt: KINC_BACSU
<i>rniA</i>	SubtWiki: BSU_14530	UniProt: RNJ1_BACSU
<i>ylaJ</i>	SubtWiki: BSU_14800	
<i>ylaK</i>	SubtWiki: BSU_14810	
<i>ylaM</i>	SubtWiki: BSU_14830	
<i>pycA</i>	SubtWiki: BSU_14860	
<i>ctaA</i>	SubtWiki: BSU_14870	UniProt: CTAA_BACSU
<i>ylbB</i>	SubtWiki: BSU_14950	
<i>ylbC</i>	SubtWiki: BSU_14960	
<i>ylbD</i>	SubtWiki: BSU_14970	
<i>ylbE</i>	SubtWiki: BSU_14980	
<i>ricF</i>	SubtWiki: BSU_14990	
<i>spoVV</i>	SubtWiki: BSU_15030	
<i>gerR</i>	SubtWiki: BSU_15090	
<i>ftsL</i>	SubtWiki: BSU_15150	UniProt: FTSL_BACSU
<i>pbpB</i>	SubtWiki: BSU_15160	UniProt: PBP2B_BACSU
<i>spoVD</i>	SubtWiki: BSU_15170	UniProt: SP5D_BACSU
<i>spoVE</i>	SubtWiki: BSU_15210	
<i>murG</i>	SubtWiki: BSU_15220	
<i>murB</i>	SubtWiki: BSU_15230	
<i>divIB</i>	SubtWiki: BSU_15240	UniProt: DIVIB_BACSU
<i>ylxW</i>	SubtWiki: BSU_15250	UniProt: YLXW_BACSU
<i>ylxX</i>	SubtWiki: BSU_15260	
<i>sbp</i>	SubtWiki: BSU_15270	
<i>ftsA</i>	SubtWiki: BSU_15280	UniProt: FTSA_BACSU
<i>ftsZ</i>	SubtWiki: BSU_15290	UniProt: FTSZ_BACSU
<i>spoIIGA</i>	SubtWiki: BSU_15310	UniProt: SP2G_BACSU
<i>sigE</i>	SubtWiki: BSU_15320	UniProt: RPSE_BACSU
<i>sigG</i>	SubtWiki: BSU_15330	UniProt: RPSG_BACSU
<i>ylmC</i>	SubtWiki: BSU_15360	UniProt: YLMC_BACSU
<i>divIVA</i>	SubtWiki: BSU_15420	UniProt: DIV4A_BACSU
<i>ylyA</i>	SubtWiki: BSU_15440	
<i>yloB</i>	SubtWiki: BSU_15650	UniProt: ATCL_BACSU
<i>prkC</i>	SubtWiki: BSU_15770	UniProt: PRKC_BACSU
<i>ftsY</i>	SubtWiki: BSU_15950	UniProt: FTSY_BACSU
<i>sinC</i>	SubtWiki: BSU_15960	
<i>codY</i>	SubtWiki: BSU_16170	UniProt: CODY_BACSU
<i>fir</i>	SubtWiki: BSU_16520	UniProt: RRF_BACSU
<i>smsB</i>	SubtWiki: BSU_16700	
<i>ymxH</i>	SubtWiki: BSU_16720	
<i>spoVFA</i>	SubtWiki: BSU_16730	
<i>spoVFB</i>	SubtWiki: BSU_16740	
<i>asd</i>	SubtWiki: BSU_16750	UniProt: DHAS_BACSU

<i>dapG</i>	SubtWiki: BSU_16760	
<i>dapA</i>	SubtWiki: BSU_16770	
<i>tepA</i>	SubtWiki: BSU_16790	UniProt: TEPA_BACSU
<i>ylzJ</i>	SubtWiki: BSU_16799	
<i>spoIII_E</i>	SubtWiki: BSU_16800	UniProt: SP3E_BACSU
<i>ymlD</i>	SubtWiki: BSU_16825	
<i>ymlJ</i>	SubtWiki: BSU_16880	
<i>rodZ</i>	SubtWiki: BSU_16910	
<i>pbpX</i>	SubtWiki: BSU_16950	UniProt: PBPX_BACSU
<i>rny</i>	SubtWiki: BSU_16960	UniProt: RNY_BACSU
<i>spoVS</i>	SubtWiki: BSU_16980	UniProt: SP5S_BACSU
<i>ricA</i>	SubtWiki: BSU_17020	
<i>cotE</i>	SubtWiki: BSU_17030	UniProt: COTE_BACSU
<i>ymaF</i>	SubtWiki: BSU_17320	
<i>ymaB</i>	SubtWiki: BSU_17400	UniProt: YMAB_BACSU
<i>cwlC</i>	SubtWiki: BSU_17410	UniProt: CWLC_BACSU
<i>spoVK</i>	SubtWiki: BSU_17420	UniProt: SP5K_BACSU
<i>yncD</i>	SubtWiki: BSU_17640	
<i>yncE</i>	SubtWiki: BSU_17650	
<i>yndA</i>	SubtWiki: BSU_17720	
<i>ynzB</i>	SubtWiki: BSU_17740	
<i>yndD</i>	SubtWiki: BSU_17750	
<i>yndE</i>	SubtWiki: BSU_17760	
<i>yndF</i>	SubtWiki: BSU_17770	
<i>pgbL</i>	SubtWiki: BSU_17820	
<i>yndM</i>	SubtWiki: BSU_17830	
<i>sirA</i>	SubtWiki: BSU_17900	UniProt: SIRA_BACSU
<i>cotM</i>	SubtWiki: BSU_17970	UniProt: COTM_BACSU
<i>citB</i>	SubtWiki: BSU_18000	UniProt: ACNA_BACSU
<i>tlp</i>	SubtWiki: BSU_18030	UniProt: TLP_BACSU
<i>ynfE</i>	SubtWiki: BSU_18140	
<i>nrmB</i>	SubtWiki: BSU_18200	
<i>yngE</i>	SubtWiki: BSU_18210	
<i>yngF</i>	SubtWiki: BSU_18220	
<i>yngG</i>	SubtWiki: BSU_18230	
<i>yngHB</i>	SubtWiki: BSU_18239	
<i>yngH</i>	SubtWiki: BSU_18240	
<i>yngI</i>	SubtWiki: BSU_18250	
<i>yngJ</i>	SubtWiki: BSU_18260	
<i>ynzE</i>	SubtWiki: BSU_18270	
<i>yngK</i>	SubtWiki: BSU_18280	
<i>yngL</i>	SubtWiki: BSU_18290	
<i>yozQ</i>	SubtWiki: BSU_18600	
<i>yoaI</i>	SubtWiki: BSU_18620	
<i>yoaM</i>	SubtWiki: BSU_18660	
<i>oxdD</i>	SubtWiki: BSU_18670	

<i>yoaQ</i>	SubtWiki: BSU_18700	
<i>yoqT</i>	SubtWiki: BSU_18709	
<i>yoqF</i>	SubtWiki: BSU_18710	
<i>yoaR</i>	SubtWiki: BSU_18720	
<i>yoaU</i>	SubtWiki: BSU_18760	
<i>yoaW</i>	SubtWiki: BSU_18780	
<i>yobN</i>	SubtWiki: BSU_19020	
<i>yobW</i>	SubtWiki: BSU_19110	
<i>yoaL</i>	SubtWiki: BSU_19250	
<i>yoyB</i>	SubtWiki: BSU_19259	
<i>yoqN</i>	SubtWiki: BSU_19270	
<i>yoaN</i>	SubtWiki: BSU_19280	
<i>sqbC</i>	SubtWiki: BSU_19320	
<i>sodF</i>	SubtWiki: BSU_19330	
<i>cdaS</i>	SubtWiki: BSU_19430	UniProt: CDAS_BACT1
<i>gerT</i>	SubtWiki: BSU_19490	UniProt: GERT_BACSU
<i>yodH</i>	SubtWiki: BSU_19600	
<i>yodL</i>	SubtWiki: BSU_19640	
<i>yodN</i>	SubtWiki: BSU_19670	
<i>yoqE</i>	SubtWiki: BSU_19680	
<i>yokU</i>	SubtWiki: BSU_19689	
<i>kamA</i>	SubtWiki: BSU_19690	UniProt: KAMA_BACSU
<i>yodP</i>	SubtWiki: BSU_19700	UniProt: YODP_BACSU
<i>yodQ</i>	SubtWiki: BSU_19710	
<i>yodR</i>	SubtWiki: BSU_19720	
<i>yodS</i>	SubtWiki: BSU_19730	
<i>yodT</i>	SubtWiki: BSU_19740	
<i>cgeE</i>	SubtWiki: BSU_19750	
<i>cgeD</i>	SubtWiki: BSU_19760	
<i>cgeC</i>	SubtWiki: BSU_19770	
<i>cgeA</i>	SubtWiki: BSU_19780	
<i>cgeB</i>	SubtWiki: BSU_19790	
<i>yodU</i>	SubtWiki: BSU_19810	
<i>sspC</i>	SubtWiki: BSU_19950	UniProt: SSPC_BACSU
<i>ypqA</i>	SubtWiki: BSU_21950	
<i>ypeQ</i>	SubtWiki: BSU_21960	
<i>ypeP</i>	SubtWiki: BSU_21970	
<i>bpsB</i>	SubtWiki: BSU_22040	
<i>bpsA</i>	SubtWiki: BSU_22050	
<i>ypL</i>	SubtWiki: BSU_22160	
<i>cotD</i>	SubtWiki: BSU_22200	
<i>ypqA</i>	SubtWiki: BSU_22240	
<i>yppG</i>	SubtWiki: BSU_22250	
<i>yppD</i>	SubtWiki: BSU_22280	
<i>yppC</i>	SubtWiki: BSU_22300	
<i>ypjB</i>	SubtWiki: BSU_22520	

<i>spoIVA</i>	SubtWiki: BSU_22800	UniProt: SP4A_BACSU
<i>ypzH</i>	SubtWiki: BSU_22849	
<i>seaA</i>	SubtWiki: BSU_22850	
<i>ypbA</i>	SubtWiki: BSU_22860	
<i>ypeB</i>	SubtWiki: BSU_22920	UniProt: YPEB_BACSU
<i>sleB</i>	SubtWiki: BSU_22930	UniProt: SLEB_BACCE
<i>spmB</i>	SubtWiki: BSU_23170	UniProt: SPMB_BACSU
<i>spmA</i>	SubtWiki: BSU_23180	UniProt: SPMA_BACSU
<i>dacB</i>	SubtWiki: BSU_23190	UniProt: DACB_BACSU
<i>ypzC</i>	SubtWiki: BSU_23320	
<i>lysA</i>	SubtWiki: BSU_23380	
<i>spoVAF</i>	SubtWiki: BSU_23390	
<i>spoVAEA</i>	SubtWiki: BSU_23401	
<i>spoVAEB</i>	SubtWiki: BSU_23402	
<i>spoVAD</i>	SubtWiki: BSU_23410	UniProt: SP5AD_BACSU
<i>spoVAC</i>	SubtWiki: BSU_23420	
<i>spoVAB</i>	SubtWiki: BSU_23430	
<i>spoVAA</i>	SubtWiki: BSU_23440	
<i>sigF</i>	SubtWiki: BSU_23450	UniProt: RPSF_BACSU
<i>spoIIAB</i>	SubtWiki: BSU_23460	UniProt: SP2AB_BACSU
<i>spoIIAA</i>	SubtWiki: BSU_23470	UniProt: SP2AA_BACSU
<i>dacF</i>	SubtWiki: BSU_23480	UniProt: DACF_BACSU
<i>spoIIM</i>	SubtWiki: BSU_23530	UniProt: SP2M_BACSU
<i>ypjC</i>	SubtWiki: BSU_23930	
<i>ypjB</i>	SubtWiki: BSU_23940	
<i>artP</i>	SubtWiki: BSU_23980	UniProt: ARTP_BACSU
<i>mmgF</i>	SubtWiki: BSU_24120	UniProt: MMGF_BACSU
<i>mmgE</i>	SubtWiki: BSU_24130	UniProt: MMGE_BACSU
<i>mmgD</i>	SubtWiki: BSU_24140	UniProt: MMGD_BACSU
<i>mmgC</i>	SubtWiki: BSU_24150	UniProt: ACDB_BACSU
<i>mmgB</i>	SubtWiki: BSU_24160	UniProt: HBD_BACSU
<i>mmgA</i>	SubtWiki: BSU_24170	UniProt: THL_BACSU
<i>spoOA</i>	SubtWiki: BSU_24220	UniProt: SPOA_BACSU
<i>spoIVB</i>	SubtWiki: BSU_24230	UniProt: SP4B_BACSU
<i>spoIIAH</i>	SubtWiki: BSU_24360	UniProt: SP3AH_BACSU
<i>spoIIAG</i>	SubtWiki: BSU_24370	
<i>spoIIAF</i>	SubtWiki: BSU_24380	UniProt: SP3AF_BACSU
<i>spoIIAE</i>	SubtWiki: BSU_24390	UniProt: SP3AE_BACSU
<i>spoIIAD</i>	SubtWiki: BSU_24400	
<i>spoIIAC</i>	SubtWiki: BSU_24410	
<i>spoIIAB</i>	SubtWiki: BSU_24420	UniProt: SP3AB_BACSU
<i>spoIIAA</i>	SubtWiki: BSU_24430	
<i>ypbV</i>	SubtWiki: BSU_24440	
<i>ypbR</i>	SubtWiki: BSU_24480	
<i>ypbQ</i>	SubtWiki: BSU_24490	
<i>ypbP</i>	SubtWiki: BSU_24500	

<i>yqbO</i>	SubtWiki: BSU_24510	
<i>yqbH</i>	SubtWiki: BSU_24580	
<i>yqbG</i>	SubtWiki: BSU_24590	
<i>sinR</i>	SubtWiki: BSU_24610	UniProt: SINR_BACSU
<i>tasA</i>	SubtWiki: BSU_24620	UniProt: TASA_BACSU
<i>yqzG</i>	SubtWiki: BSU_24650	
<i>pbpA</i>	SubtWiki: BSU_25000	UniProt: PBP2A_BACSU
<i>yqgE</i>	SubtWiki: BSU_25010	
<i>sodA</i>	SubtWiki: BSU_25020	UniProt: SODM_BACSU
<i>yqfZ</i>	SubtWiki: BSU_25060	
<i>ispG</i>	SubtWiki: BSU_25070	
<i>yqfX</i>	SubtWiki: BSU_25080	
<i>yqfI</i>	SubtWiki: BSU_25120	
<i>yqfQ</i>	SubtWiki: BSU_25150	
<i>recO</i>	SubtWiki: BSU_25280	UniProt: RECO_BACSU
<i>dqkA</i>	SubtWiki: BSU_25310	UniProt: UDPK_BACSU
<i>yqfD</i>	SubtWiki: BSU_25350	
<i>yqfC</i>	SubtWiki: BSU_25360	
<i>floA</i>	SubtWiki: BSU_25380	UniProt: FLOA_BACSU
<i>yqxA</i>	SubtWiki: BSU_25520	
<i>spoIIP</i>	SubtWiki: BSU_25530	
<i>gpr</i>	SubtWiki: BSU_25540	UniProt: GPR_BACSU
<i>comER</i>	SubtWiki: BSU_25600	
<i>cwlH</i>	SubtWiki: BSU_25710	UniProt: CWLH_BACSU
<i>yqeC</i>	SubtWiki: BSU_25730	
<i>nucB</i>	SubtWiki: BSU_25750	UniProt: NUCB_BACSU
<i>sigK</i>	SubtWiki: BSU_25760	UniProt: RPSK_BACSU
<i>spoIVCA</i>	SubtWiki: BSU_25770	
<i>arsC</i>	SubtWiki: BSU_25780	UniProt: ARSC_BACSU
<i>yqcK</i>	SubtWiki: BSU_25800	
<i>yqeI</i>	SubtWiki: BSU_25820	
<i>rapE</i>	SubtWiki: BSU_25830	UniProt: RAPE_BACSU
<i>yqcG</i>	SubtWiki: BSU_25860	UniProt: YQCG_BACSU
<i>yqcF</i>	SubtWiki: BSU_25870	UniProt: YQCF_BACSU
<i>yqaO</i>	SubtWiki: BSU_26240	
<i>yqaN</i>	SubtWiki: BSU_26250	
<i>sigKC</i>	SubtWiki: BSU_26390	
<i>yrcC</i>	SubtWiki: BSU_26560	
<i>cypA</i>	SubtWiki: BSU_26740	
<i>yraG</i>	SubtWiki: BSU_26950	
<i>yraF</i>	SubtWiki: BSU_26960	
<i>adbB</i>	SubtWiki: BSU_26970	
<i>yraE</i>	SubtWiki: BSU_26980	
<i>yraD</i>	SubtWiki: BSU_26990	
<i>yrcA</i>	SubtWiki: BSU_27290	
<i>yrrS</i>	SubtWiki: BSU_27300	

<i>phpI</i>	SubtWiki: BSU_27310	UniProt: PBPI_BACSU
<i>yrrI</i>	SubtWiki: BSU_27420	
<i>glnQ</i>	SubtWiki: BSU_27430	
<i>glnH</i>	SubtWiki: BSU_27440	
<i>glnM</i>	SubtWiki: BSU_27450	
<i>glnP</i>	SubtWiki: BSU_27460	
<i>yrsR</i>	SubtWiki: BSU_27469	
<i>yrrD</i>	SubtWiki: BSU_27470	
<i>secDF</i>	SubtWiki: BSU_27650	UniProt: SECDF_BACSU
<i>spoVB</i>	SubtWiki: BSU_27670	UniProt: SP5B_BACSU
<i>yrbG</i>	SubtWiki: BSU_27680	
<i>yrsE</i>	SubtWiki: BSU_27690	
<i>bofC</i>	SubtWiki: BSU_27750	UniProt: BOFC_BACSU
<i>csbX</i>	SubtWiki: BSU_27760	
<i>yrbD</i>	SubtWiki: BSU_27810	
<i>coxA</i>	SubtWiki: BSU_27830	UniProt: COXA_BACSU
<i>safA</i>	SubtWiki: BSU_27840	UniProt: SAFA_BACSU
<i>spoOB</i>	SubtWiki: BSU_27930	UniProt: SP0B_BACSU
<i>rpmA</i>	SubtWiki: BSU_27940	UniProt: RL27_BACSU
<i>spoIVFB</i>	SubtWiki: BSU_27970	UniProt: SP4FB_BACSU
<i>spoIVFA</i>	SubtWiki: BSU_27980	UniProt: SP4FA_BACSU
<i>minC</i>	SubtWiki: BSU_28000	UniProt: MINC_BACSU
<i>spoIIB</i>	SubtWiki: BSU_28060	UniProt: SP2B_BACSU
<i>ysxE</i>	SubtWiki: BSU_28100	
<i>spoVID</i>	SubtWiki: BSU_28110	UniProt: SP6D_BACSU
<i>lonB</i>	SubtWiki: BSU_28210	
<i>gerM</i>	SubtWiki: BSU_28380	UniProt: GERM_BACSU
<i>gerE</i>	SubtWiki: BSU_28410	UniProt: GERE_BACSU
<i>sspI</i>	SubtWiki: BSU_28660	UniProt: SSPI_BACSU
<i>ytxC</i>	SubtWiki: BSU_28960	
<i>ytaF</i>	SubtWiki: BSU_29070	UniProt: YTAF_BACSU
<i>phoR</i>	SubtWiki: BSU_29100	
<i>phoP</i>	SubtWiki: BSU_29110	
<i>citZ</i>	SubtWiki: BSU_29140	UniProt: CISY2_BACSU
<i>ytmI</i>	SubtWiki: BSU_29150	
<i>ytvI</i>	SubtWiki: BSU_29160	
<i>ytrH</i>	SubtWiki: BSU_29239	UniProt: YTRH_BACSU
<i>ytrI</i>	SubtWiki: BSU_29240	UniProt: YTRI_BACSU
<i>gerW</i>	SubtWiki: BSU_29500	
<i>ytfI</i>	SubtWiki: BSU_29510	
<i>refZ</i>	SubtWiki: BSU_29630	
<i>sftA</i>	SubtWiki: BSU_29805	UniProt: SFTA_BACSU
<i>ytsH</i>	SubtWiki: BSU_29910	
<i>yteV</i>	SubtWiki: BSU_30080	
<i>yteT</i>	SubtWiki: BSU_30100	
<i>ytvB</i>	SubtWiki: BSU_30330	

<i>ytrA</i>	SubtWiki: BSU_30460	UniProt: YTRA_BACSU
<i>ytzC</i>	SubtWiki: BSU_30470	
<i>ytIA</i>	SubtWiki: BSU_30595	
<i>ytIC</i>	SubtWiki: BSU_30610	
<i>ytID</i>	SubtWiki: BSU_30620	
<i>rppH</i>	SubtWiki: BSU_30630	
<i>ytkC</i>	SubtWiki: BSU_30640	
<i>ythA</i>	SubtWiki: BSU_30710	UniProt: YTHA_BACSU
<i>ythB</i>	SubtWiki: BSU_30720	UniProt: YTHB_BACSU
<i>yteA</i>	SubtWiki: BSU_30840	
<i>yteA</i>	SubtWiki: BSU_30860	
<i>yteB</i>	SubtWiki: BSU_30870	
<i>yteC</i>	SubtWiki: BSU_30880	
<i>ytxO</i>	SubtWiki: BSU_30890	
<i>cotS</i>	SubtWiki: BSU_30900	UniProt: COTS_BACSU
<i>cotSA</i>	SubtWiki: BSU_30910	UniProt: COTSA_BACSU
<i>cotI</i>	SubtWiki: BSU_30920	UniProt: COTI_BACSU
<i>glgP</i>	SubtWiki: BSU_30940	UniProt: PHSG_BACSU
<i>glgA</i>	SubtWiki: BSU_30950	UniProt: GLGA_BACSU
<i>glgD</i>	SubtWiki: BSU_30960	UniProt: GLGD_BACSU
<i>glgC</i>	SubtWiki: BSU_30970	UniProt: GLGC_BACSU
<i>glgB</i>	SubtWiki: BSU_30980	UniProt: GLGB_BACSU
<i>floT</i>	SubtWiki: BSU_31010	UniProt: FLOT_BACSU
<i>bslA</i>	SubtWiki: BSU_31080	
<i>cdoA</i>	SubtWiki: BSU_31140	UniProt: CDOA_BACSU
<i>tgl</i>	SubtWiki: BSU_31270	UniProt: TGL_BACSU
<i>yugT</i>	SubtWiki: BSU_31290	
<i>yugS</i>	SubtWiki: BSU_31300	
<i>yugP</i>	SubtWiki: BSU_31310	
<i>yuzI</i>	SubtWiki: BSU_31319	
<i>mstX</i>	SubtWiki: BSU_31321	
<i>yugO</i>	SubtWiki: BSU_31322	
<i>yuzA</i>	SubtWiki: BSU_31380	
<i>yugF</i>	SubtWiki: BSU_31420	
<i>kinB</i>	SubtWiki: BSU_31450	
<i>kapB</i>	SubtWiki: BSU_31460	UniProt: KAPB_BACSU
<i>kapD</i>	SubtWiki: BSU_31470	
<i>yufS</i>	SubtWiki: BSU_31590	
<i>comP</i>	SubtWiki: BSU_31690	UniProt: COMP_BACSU
<i>yuzC</i>	SubtWiki: BSU_31730	
<i>yueG</i>	SubtWiki: BSU_31790	
<i>yuzE</i>	SubtWiki: BSU_31810	
<i>yuzF</i>	SubtWiki: BSU_31820	
<i>adeR</i>	SubtWiki: BSU_31920	UniProt: ADER_BACSU
<i>ald</i>	SubtWiki: BSU_31930	UniProt: DHA_BACSU
<i>yuiC</i>	SubtWiki: BSU_32070	

<i>yumB</i>	SubtWiki: BSU_32100	
<i>paiB</i>	SubtWiki: BSU_32140	UniProt: PAIB_BACSU
<i>paiA</i>	SubtWiki: BSU_32150	UniProt: PAIA_BACSU
<i>yutH</i>	SubtWiki: BSU_32270	
<i>yutG</i>	SubtWiki: BSU_32280	
<i>yutC</i>	SubtWiki: BSU_32320	
<i>lytH</i>	SubtWiki: BSU_32340	UniProt: LYTH_BACSU
<i>fisB</i>	SubtWiki: BSU_32350	
<i>yunC</i>	SubtWiki: BSU_32360	
<i>yurS</i>	SubtWiki: BSU_32650	
<i>yurZ</i>	SubtWiki: BSU_32720	
<i>fadM</i>	SubtWiki: BSU_32850	
<i>yuZM</i>	SubtWiki: BSU_32859	
<i>yusN</i>	SubtWiki: BSU_32860	
<i>yusW</i>	SubtWiki: BSU_32950	
<i>gerAA</i>	SubtWiki: BSU_33050	
<i>gerAB</i>	SubtWiki: BSU_33060	
<i>gerAC</i>	SubtWiki: BSU_33070	
<i>babC</i>	SubtWiki: BSU_33470	UniProt: BDBC_BACSU
<i>bdbD</i>	SubtWiki: BSU_33480	UniProt: BDBD_BACSU
<i>cadA</i>	SubtWiki: BSU_33490	UniProt: CADA_BACSU
<i>azoR2</i>	SubtWiki: BSU_33540	
<i>yvaC</i>	SubtWiki: BSU_33550	
<i>smgB</i>	SubtWiki: BSU_33600	UniProt: SSRP_BACSU
<i>yvaM</i>	SubtWiki: BSU_33640	
<i>rgbR</i>	SubtWiki: BSU_33660	
<i>sdpA</i>	SubtWiki: BSU_33750	UniProt: SDPA_BACSU
<i>sdpB</i>	SubtWiki: BSU_33760	UniProt: SDPB_BACSU
<i>sdpC</i>	SubtWiki: BSU_33770	UniProt: SDPC_BACSU
<i>sdpI</i>	SubtWiki: BSU_33780	UniProt: SDPI_BACSU
<i>pgm</i>	SubtWiki: BSU_33910	
<i>yveA</i>	SubtWiki: BSU_34470	
<i>yvdQ</i>	SubtWiki: BSU_34510	
<i>cotQ</i>	SubtWiki: BSU_34520	
<i>cotR</i>	SubtWiki: BSU_34530	UniProt: COTR_BACSU
<i>lgt</i>	SubtWiki: BSU_34990	
<i>yvnB</i>	SubtWiki: BSU_35040	
<i>pcbR</i>	SubtWiki: BSU_35080	UniProt: PCHR_BACSU
<i>ctpB</i>	SubtWiki: BSU_35240	UniProt: CTPB_BACSU
<i>ftsX</i>	SubtWiki: BSU_35250	UniProt: FTSX_BACSU
<i>ftsE</i>	SubtWiki: BSU_35260	UniProt: FTSE_BACSU
<i>tuaH</i>	SubtWiki: BSU_35540	
<i>tuaG</i>	SubtWiki: BSU_35550	
<i>tuaF</i>	SubtWiki: BSU_35560	
<i>gerBA</i>	SubtWiki: BSU_35800	
<i>gerBB</i>	SubtWiki: BSU_35810	

<i>gerBC</i>	SubtWiki: BSU_35820	
<i>ywrK</i>	SubtWiki: BSU_36030	
<i>ywrJ</i>	SubtWiki: BSU_36040	
<i>cotB</i>	SubtWiki: BSU_36050	
<i>cotH</i>	SubtWiki: BSU_36060	UniProt: COTH_BACSU
<i>ywrA</i>	SubtWiki: BSU_36130	
<i>ywqL</i>	SubtWiki: BSU_36170	
<i>ywqK</i>	SubtWiki: BSU_36180	
<i>ywqJ</i>	SubtWiki: BSU_36190	
<i>ywqI</i>	SubtWiki: BSU_36200	
<i>ywqH</i>	SubtWiki: BSU_36210	
<i>mbI</i>	SubtWiki: BSU_36410	
<i>spoIID</i>	SubtWiki: BSU_36420	UniProt: SP3D_BACSU
<i>ywoD</i>	SubtWiki: BSU_36480	
<i>ywoC</i>	SubtWiki: BSU_36490	
<i>ywnJ</i>	SubtWiki: BSU_36540	UniProt: YWNJ_BACSU
<i>spoIIQ</i>	SubtWiki: BSU_36550	UniProt: SP2Q_BACSU
<i>ywnG</i>	SubtWiki: BSU_36570	
<i>rapB</i>	SubtWiki: BSU_36690	UniProt: RAPB_BACSU
<i>spoIID</i>	SubtWiki: BSU_36750	
<i>spoIIT</i>	SubtWiki: BSU_36770	
<i>ywmA</i>	SubtWiki: BSU_36790	
<i>ywlE</i>	SubtWiki: BSU_36930	UniProt: PAP_BACSU
<i>spoIIR</i>	SubtWiki: BSU_36970	
<i>ywkF</i>	SubtWiki: BSU_36990	
<i>racA</i>	SubtWiki: BSU_37030	UniProt: RACA_BACSU
<i>spo0F</i>	SubtWiki: BSU_37130	UniProt: SP0F_BACSU
<i>ywjE</i>	SubtWiki: BSU_37190	
<i>ywjD</i>	SubtWiki: BSU_37200	
<i>pbpG</i>	SubtWiki: BSU_37510	UniProt: PBPG_BACSU
<i>rsfA</i>	SubtWiki: BSU_37620	UniProt: RSFA_BACSU
<i>sinA</i>	SubtWiki: BSU_37800	
<i>spsL</i>	SubtWiki: BSU_37810	
<i>spsK</i>	SubtWiki: BSU_37820	
<i>spsJ</i>	SubtWiki: BSU_37830	
<i>spsI</i>	SubtWiki: BSU_37840	
<i>spsG</i>	SubtWiki: BSU_37850	
<i>spsF</i>	SubtWiki: BSU_37860	
<i>spsE</i>	SubtWiki: BSU_37870	
<i>spsD</i>	SubtWiki: BSU_37880	
<i>spsC</i>	SubtWiki: BSU_37890	
<i>spsB</i>	SubtWiki: BSU_37900	
<i>spsA</i>	SubtWiki: BSU_37910	
<i>gerQ</i>	SubtWiki: BSU_37920	UniProt: GERQ_BACSU
<i>vpr</i>	SubtWiki: BSU_38090	UniProt: SUBV_BACSU
<i>ywcE</i>	SubtWiki: BSU_38130	UniProt: YWCE_BACSU

<i>ywcB</i>	SubtWiki: BSU_38230	
<i>ywcA</i>	SubtWiki: BSU_38240	
<i>ywbB</i>	SubtWiki: BSU_38380	
<i>ywbA</i>	SubtWiki: BSU_38390	
<i>ywaF</i>	SubtWiki: BSU_38440	
<i>katX</i>	SubtWiki: BSU_38630	
<i>yxjF</i>	SubtWiki: BSU_38970	
<i>scoB</i>	SubtWiki: BSU_38980	
<i>scoA</i>	SubtWiki: BSU_38990	
<i>hbuT</i>	SubtWiki: BSU_39000	
<i>citH</i>	SubtWiki: BSU_39060	
<i>yxceE</i>	SubtWiki: BSU_39580	UniProt: YXEE_BACSU
<i>yyeQ</i>	SubtWiki: BSU_40260	
<i>yyeP</i>	SubtWiki: BSU_40270	
<i>yyeO</i>	SubtWiki: BSU_40280	
<i>yyeN</i>	SubtWiki: BSU_40290	
<i>htrC</i>	SubtWiki: BSU_40360	
<i>yyeE</i>	SubtWiki: BSU_40430	
<i>yyzB</i>	SubtWiki: BSU_40460	
<i>gdpP</i>	SubtWiki: BSU_40510	UniProt: GDPP_BACSU
<i>cotF</i>	SubtWiki: BSU_40530	UniProt: COTF_BACSU
<i>yybP</i>	SubtWiki: BSU_40560	
<i>yybI</i>	SubtWiki: BSU_40630	
<i>yyaL</i>	SubtWiki: BSU_40820	
<i>cpB</i>	SubtWiki: BSU_40870	
<i>exaA</i>	SubtWiki: BSU_40880	
<i>yyaD</i>	SubtWiki: BSU_40940	
<i>yyaC</i>	SubtWiki: BSU_40950	
<i>parB</i>	SubtWiki: BSU_40960	
<i>parA</i>	SubtWiki: BSU_40970	
<i>noc</i>	SubtWiki: BSU_40990	UniProt: NOC_BACSU
<i>jag</i>	SubtWiki: BSU_41030	
<i>yidC1</i>	SubtWiki: BSU_41040	
<i>Cry9Da</i>	UniProt: CR9DA_BACTP	
Type-2B bcytolyticdelta-endotoxin	UniProt: CT2BB_BACTJ	
<i>Cry1Fb</i>	UniProt: CR1FB_BACTM	
<i>Cry1Be</i>	UniProt: CR1BE_BACTU	
<i>Cry1Ic</i>	UniProt: CR1IC_BACTU	
<i>Cry1Ac</i>	UniProt: CR1AC_BACTK	
<i>Cry4Ba</i>	UniProt: CR4BA_BACTI	
<i>Cry10.Aa</i>	UniProt: C10AA_BACTI	
<i>Cry1Aa</i>	UniProt: CR1AA_BACTK	
<i>Cry1Ab</i>	UniProt: CR1AB_BACTK	
<i>Cry1Ba</i>	UniProt: CR1BA_BACTK	
<i>Cry1Ca</i>	UniProt: CR1CA_BACTE	
<i>Cry2Aa</i>	UniProt: CR2AA_BACTK	

<i>Cry3Aa</i>	UniProt: CR3AA_BACTT
Type-1A acyolyticdelta-endotoxin	UniProt: CT1AA_BACTM
<i>Cry4Aa</i>	UniProt: CR4AA_BACTI
<i>Cry3Ba</i>	UniProt: CR3BA_BACTO
<i>Cry1Da</i>	UniProt: CR1DA_BACTA
<i>Cry2Ab</i>	UniProt: CR2AB_BACTK
<i>Cry11Aa</i>	UniProt: C11AA_BACTI
<i>cryB15'</i> region	UniProt: YCR2_BACTK
<i>Lon</i> protease1	UniProt: LON1_BACSU
<i>Cry1Cb</i>	UniProt: CR1CB_BACTG
<i>Cry21Aa</i>	UniProt: C21AA_BACTU
Small, acid-soluble spore protein gamma-type	UniProt: SASG_BACIU
Insecticidal crystal toxin protein	UniProt: CR4AA_BACTK
Type-1Ab cytolytic delta-endotoxin	UniProt: CT1AB_BACTV
<i>Cry1Af</i>	UniProt: CR1AF_BACTU
<i>Cry1Ad</i>	UniProt: CR1AD_BACTA
<i>Cry1Eb</i>	UniProt: CR1EB_BACTA
<i>Cry1Fa</i>	UniProt: CR1FA_BACTA
<i>Cry1Ae</i>	UniProt: CR1AE_BACTL
Type-2Aa cytolytic delta-endotoxin	UniProt: CT2AA_BACTY
<i>Cry3Bb</i>	UniProt: CR3BB_BACTU
<i>Cry8Aa</i>	UniProt: CR8AA_BACUK
<i>Cry11b</i>	UniProt: CR11B_BACTE
<i>Cry14Aa</i>	UniProt: C14AA_BACTS
<i>Cry1Ka</i>	UniProt: CR1KA_BACTM
<i>Cry1Jb</i>	UniProt: CR1JB_BACTU
<i>Cry1Hb</i>	UniProt: CR1HB_BACTM
Type-2Ba cytolytic delta-endotoxin	UniProt: CT2BA_BACTI
<i>Cry11Ba</i>	UniProt: C11BA_BACTJ
<i>Cry9Ca</i>	UniProt: CR9CA_BACTO
<i>Cry1Ja</i>	UniProt: CR1JA_BACTU
<i>Cry1Bb</i>	UniProt: CR1BB_BACTU
<i>Cry2Ac</i>	UniProt: CR2AC_BACTU
<i>Cry3Ca</i>	UniProt: CR3CA_BACTK
<i>Cry1Ga</i>	UniProt: CR1GA_BACTU
<i>Cry1Db</i>	UniProt: CR1DB_BACTU
<i>Cry1Ha</i>	UniProt: CR1HA_BACTU
<i>Cry1Ia</i>	UniProt: CR1IA_BACTK
<i>Cry5Ab</i>	UniProt: CR5AB_BACUD
<i>Cry12Aa</i>	UniProt: C12AA_BACTU
<i>Cry6Aa</i> (Fragment)	UniProt: CR6AA_BACTU
<i>Cry6Ba</i> (Fragment)	UniProt: CR6BA_BACTU
<i>Cry5Aa</i>	UniProt: CR5AA_BACUD
<i>Cry1Bc</i>	UniProt: CR1BC_BACTM
<i>Cry1Ea</i>	UniProt: CR1EA_BACTX
<i>ExsA</i>	UniProt: EXSA_BACCE

<i>Cry35Ab1</i>	UniProt: C35AB_BACTU
<i>Cry34Ab1</i>	UniProt: C34AB_BACTU
<i>Cry9Aa</i>	UniProt: CR9AA_BACTG
<i>HPr</i>	UniProt: PTHP_BACTI
<i>Cry2Ad</i>	UniProt: CR2AD_BACTU
<i>Cry1Ag</i>	UniProt: CR1AG_BACTU
<i>Cry1Id</i>	UniProt: CR1ID_BACTU
<i>Cry1Bd</i>	UniProt: CR1BD_BACTZ
<i>Cry1Gb</i>	UniProt: CR1GB_BACTZ
Spore germination protein XA	UniProt: GERXA_BACAN
<i>Cry11Bb</i>	UniProt: C11BB_BACTV
<i>Cry9Ea</i>	UniProt: CR9EA_BACTA

APÊNDICE B. lista dos genomas utilizados na busca *in silico*

<i>Clostridium botulinum</i> A str ATCC 3502	<i>Bacillus altitudinis</i> strain ws31
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 2	<i>Bacillus altitudinis</i> strain HQ-51-Ba
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 15	<i>Bacillus aerophilus</i> strain 232
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain E28 3	<i>Bacillus altitudinis</i> strain 6ww6
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain SM1 1	<i>Bacillus altitudinis</i> strain GR-8
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain E17 4	<i>Bacillus altitudinis</i> strain GLB197
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 39	<i>Bacillus altitudinis</i> strain CMF5
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 3	<i>Bacillus pumilus</i> strain TUAT1
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 38	<i>Bacillus xiamenensis</i> strain VV3
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 13	<i>Bacillus pumilus</i> strain NDY-10
<i>Bacillus cytotoxicius</i> strain CH 23	<i>Bacillus pumilus</i> strain 145
<i>Bacillus pseudomycoides</i> DSM 12442	<i>Bacillus pumilus</i> strain ONU 554
<i>Bacillus pseudomycoides</i> strain 219298	<i>Bacillus pumilus</i> strain AR03
<i>Bacillus pseudomycoides</i> strain BTZ	<i>Bacillus pumilus</i> strain ZB201701
<i>Bacillus nitratireducens</i> strain BM02	<i>Bacillus pumilus</i> strain NCTC10337
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN03 1	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032
<i>Bacillus mycoides</i> strain ATCC 6462	<i>Bacillus pumilus</i> strain SH-B9
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN09 1	<i>Bacillus safensis</i> strain AHB2
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN29 1	<i>Bacillus safensis</i> strain GX-H6
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN51 1	<i>Bacillus safensis</i> strain U17-1
<i>Bacillus mycoides</i> KBAB4	<i>Bacillus safensis</i> strain LG01
<i>Bacillus mycoides</i> strain TH26	<i>Bacillus safensis</i> strain BRM1
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN37 2	<i>Bacillus safensis</i> strain U14-5
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN36 3	<i>Bacillus safensis</i> strain BS-10L
<i>Bacillus mycoides</i> strain BPN121	<i>Bacillus safensis</i> strain H31R-08
<i>Bacillus toyonensis</i> strain JAS411	<i>Bacillus safensis</i> strain PgKB20
<i>Bacillus toyonensis</i> strain JAS13 1	<i>Bacillus safensis</i> strain PRO114
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112	<i>Bacillus glycinifermentans</i> strain MGMM1
<i>Bacillus toyonensis</i> strain JAS03 3	<i>Bacillus glycinifermentans</i> strain KBN06P03352
<i>Bacillus toyonensis</i> strain JAS22 1	<i>Bacillus glycinifermentans</i> strain SRCM103574
<i>Bacillus toyonensis</i> strain BPN45 4	<i>Bacillus glycinifermentans</i> isolate BGLY
<i>Bacillus toyonensis</i> strain P18	<i>Bacillus haynesii</i> strain P19
<i>Bacillus toyonensis</i> strain DC11	<i>Bacillus licheniformis</i> strain TAB7
<i>Bacillus toyonensis</i> strain HA0190	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13
<i>Bacillus toyonensis</i> strain UTDF19-29B	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580
<i>Bacillus luti</i> strain FJ	<i>Bacillus licheniformis</i> strain BL1202
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SCDB 14
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 4F5	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CBA7132
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bt-GS57	<i>Bacillus licheniformis</i> strain PB3
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain GC-91	<i>Bacillus licheniformis</i> strain ATCC 9789
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain SA11	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SRCM100027
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str HD-1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SRCM100141
<i>Bacillus thuringiensis</i> RZ2MS9	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain BA59
<i>Bacillus cereus</i> strain K8	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain MBLB1156
<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 4222	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain CNY01

<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar tenebrionis strain NB125	<i>Bacillus atropbaeus</i> strain NS2
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt18247	<i>Bacillus atropbaeus</i> strain NX-12
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC 047	<i>Bacillus atropbaeus</i> strain GQJK17
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar thuringiensis str T01001	<i>Bacillus atropbaeus</i> strain SRCM101359
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar berliner ATCC 10792	<i>Bacillus atropbaeus</i> strain PENSV20
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain Bt18679	<i>Bacillus atropbaeus</i> 1942
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain JAS07 5	<i>Bacillus atropbaeus</i> subsp glogigii strain BSS
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain JAS28 2	<i>Bacillus mojavensis</i> strain UCMB5075
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain JAS08 1	<i>Bacillus halotolerans</i> strain MEC B301
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain SR52	<i>Bacillus halotolerans</i> strain XE48
<i>Bacillus albus</i> strain PFYN01	<i>Bacillus mojavensis</i> strain LDFZ001
<i>Bacillus albus</i> strain DLOU-Yingkou	<i>Bacillus halotolerans</i> strain S-5
<i>Bacillus tropicus</i> strain LM1212-DB	<i>Bacillus halotolerans</i> strain B13
<i>Bacillus tropicus</i> strain CK18	<i>Bacillus halotolerans</i> strain MBH1
<i>Bacillus tropicus</i> strain JMT105-2	<i>Bacillus halotolerans</i> strain KKD1
<i>Bacillus tropicus</i> strain FDAARGOS 897	<i>Bacillus halotolerans</i> strain F41-3
<i>Bacillus tropicus</i> strain FDAARGOS 920	<i>Bacillus halotolerans</i> strain XH-1
<i>Bacillus cereus</i> strain FM1	<i>Bacillus halotolerans</i> strain ZB201702
<i>Bacillus tropicus</i> strain EMB20	<i>Bacillus subtilis</i> subsp subtilis str BAB-1
<i>Bacillus tropicus</i> strain AOA-CPS1	<i>Bacillus subtilis</i> XF-1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 4342	<i>Bacillus subtilis</i> subsp natto BEST195
<i>Bacillus tropicus</i> strain FDAARGOS 782	<i>Bacillus subtilis</i> subsp subtilis strain SRCM101441
<i>Bacillus cereus</i> F837 76	<i>Bacillus subtilis</i> TO-A
<i>Bacillus cereus</i> strain ISSFR-3F	<i>Bacillus subtilis</i> BEST7003
<i>Bacillus anthracis</i> str SVA11	<i>Bacillus subtilis</i> QB928
<i>Bacillus anthracis</i> strain HYU01	<i>Bacillus subtilis</i> subsp subtilis str AG1839
<i>Bacillus anthracis</i> str BF1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp subtilis str 168
<i>Bacillus anthracis</i> strain Cvac02	<i>Bacillus vallismortis</i> strain Bac111
<i>Bacillus anthracis</i> strain Han	<i>Bacillus vallismortis</i> strain DSM 11031
<i>Bacillus anthracis</i> str Vollum	<i>Bacillus tequilensis</i> strain EA-CB0015
<i>Bacillus anthracis</i> str A16	<i>Bacillus cabrialesii</i> strain TE3
<i>Bacillus anthracis</i> str Ames	<i>Bacillus subtilis</i> subsp spizizenii TU-B-10
<i>Bacillus anthracis</i> str Ames Ancestor	<i>Bacillus subtilis</i> subsp spizizenii str W23
<i>Bacillus anthracis</i> str A0248	<i>Bacillus subtilis</i> subsp spizizenii ATCC 6633
<i>Bacillus paranthracis</i> strain Bc006	<i>Bacillus spizizenii</i> strain B-354
<i>Bacillus paranthracis</i> strain SHOU-BC01	<i>Bacillus inaquosorum</i> strain KCTC 13429
<i>Bacillus paranthracis</i> strain Gxun-30	<i>Bacillus inaquosorum</i> strain DE111
<i>Bacillus paranthracis</i> strain KF11	<i>Bacillus inaquosorum</i> strain BSXE-2102
<i>Bacillus paranthracis</i> strain Bt C4	<i>Bacillus inaquosorum</i> strain A65 1
<i>Bacillus paranthracis</i> strain BC307	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SRCM101267
<i>Bacillus paranthracis</i> strain NVH 0075 95	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain 205
<i>Bacillus paranthracis</i> strain CFSAN068816	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350
<i>Bacillus cereus</i> AH187	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> isolate ELA1901024
<i>Bacillus cereus</i> NC7401	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MBLB 0692
<i>Bacillus paranthracis</i> strain SSBC101	<i>Bacillus velezensis</i> CAU B946
<i>Bacillus paranthracis</i> strain PR1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MBE1283

<i>Bacillus pacificus</i> strain NCCP 15909	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain GXU-1
<i>Bacillus pacificus</i> strain anQ-h4	<i>Bacillus velezensis</i> strain L-S60
<i>Bacillus pacificus</i> strain ANSB901	<i>Bacillus vallismortis</i> strain NBIF-001
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain A15 1
<i>Bacillus fonticola</i> strain CS13	<i>Bacillus velezensis</i> strain YJ11-1-4
<i>Bacillus smithii</i> strain DSM 4216	<i>Bacillus subtilis</i> strain ATCC 19217
<i>Bacillus badius</i> strain NBPM-293	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ZJU1
<i>Bacillus aquiflavi</i> strain 3H-10	<i>Bacillus velezensis</i> strain JS25R
<i>Bacillus dafuensis</i> strain FJAT-25496	<i>Bacillus velezensis</i> NAU-B3
<i>Bacillus infantis</i> NRRL B-14911	<i>Bacillus velezensis</i> strain CC09
<i>Bacillus weihaiensis</i> strain Alg07	<i>Bacillus velezensis</i> UCMB5033
<i>Bacillus gobiensis</i> strain FJAT-4402	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42
<i>Bacillus altitudinis</i> strain BDGP7	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42
<i>Bacillus pumilus</i> strain B6033	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain GKT04
<i>Bacillus altitudinis</i> strain TM2	<i>Bacillus velezensis</i> AS43 3
<i>Bacillus altitudinis</i> strain BA06	<i>Bacillus velezensis</i> TrigoCor1448
<i>Bacillus altitudinis</i> strain NJ-V2	

APÊNDICE C. Lista de metabólitos encontrados análise do metaboloma dos exsudatos de milho

Molécula	Abundância Média		Var.	Classificação
	Controle Não Inoculado	Inoculado com RZ2MS9		
Glycerol	208,38	291,55	+ -	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Hydroheptelidic acid	37,82	N.E.	--	Não Categorizado
Diacetin	29,06	N.E.	--	Diradylglycerols
D-Glucose	24,24	14,31	+ -	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
3-Mmethoxybenzene-1,2-diol	22,06	N.E.	--	Benzenediols
Ethanolamine	19,55	N.E.	--	Amines
2,5-Dimethoxybenzaldehyde	17,75	10,05	+ -	Methoxybenzenes
Diethylene glycol	17,74	N.E.	--	Ethers
3-Hydroxybutyric acid	17,51	N.E.	--	Beta hydroxy acids and derivatives
1,2,3-Butanetriol	17,44	N.E.	--	Alcohols and polyols
L-Leucine	11,31	N.E.	--	Amino acids, peptides, and analogues
Palmitic Acid	9,17	4,38	-	Fatty acids and conjugates
2-Propenoic acid, 3-[1,3,4,5,6,7-hexahydro-5-(1-methylethyl)-3-oxo-4-isobenzofuranyl]-2-(hydroxymethyl)	8,90	N.E.	--	Não Categorizado
1-Monoacetin	8,80	5,8	+ -	Monoradylglycerols
2-Butenedioic acid	8,35	N.E.	--	Dicarboxylic acids and derivatives
L-Valine	8,20	N.E.	--	Amino acids, peptides, and analogues
Diisobutyl phthalate	7,65	1,15	-	Benzoic acids and derivatives
Sucrose	6,68	5,95	+ -	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Myristic acid	5,87	N.E.	--	Fatty acids and conjugates
D-Allofuranose	5,55	N.E.	--	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Glycolamide	5,48	0,97	-	Carboxylic acid derivatives
Benzoic Acid	5,40	8,43	+ -	Benzoic acids and derivatives
D-Threitol	5,37	N.E.	--	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Scyllo-Inositol	5,24	15,85	+	Alcohols and polyols
DL-Pyroglutamic acid	5,23	N.E.	--	Amino acids, peptides, and analogues
3-a-Mannobiose	4,92	N.E.	--	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Serine	4,40	N.E.	--	Amino acids, peptides, and analogues
L-Tyrosine	4,23	N.E.	--	Amino acids, peptides, and analogues
Benzeneacetic acid	3,56	N.E.	--	Benzene and substituted derivatives

4-Hydroxy-4,11b-dimethyltetradecahydro-6a,9-methanocyclohepta[a]naphthalene-8-carboxylic acid	3,53	1,28	-	Não Categorizado
Kaurane-17,18-dioic acid	3,43	N.E.	--	Diterpenoids
1-Deoxypentitol	3,33	1,75	+/-	Alcohols and polyols
1-Hexadecanol	3,33	N.E.	--	Fatty alcohols
Mercaptoacetic acid	3,10	N.E.	--	Carboxylic acids
L-Threonine	3,06	N.E.	--	Amino acids, peptides, and analogues
D-(+)-Gluconolactone	2,81	N.E.	--	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
3-Hydroxyvaleric acid	2,73	N.E.	--	Fatty acids and conjugates
Glyceryl-glycoside	2,20	4,8	+	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Propanedioic acid	2,08	N.E.	--	Dicarboxylic acids and derivatives
3-Hydroxy-3,4-dimethylpentanoic acid	1,84	N.E.	--	Não Categorizado
3,4-Dimethylbenzoic acid	1,41	N.E.	--	Benzoic acids and derivatives
D-Ribose	1,32	N.E.	--	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Butanoic acid	1,00	3	+	Fatty acids and conjugates
Uraci	0,98	N.E.	--	Pyrimidines and pyrimidine derivatives
Benzenepropanoic aci	0,95	3,17	+	Phenylpropanoic acids
(E)-4-Hydroxynon-2-enoic acid	0,67	N.E.	--	Fatty acids and conjugates
Phthalic acid	0,65	N.E.	--	Benzoic acids and derivatives
3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,4,9,9-pentamethyl-5-[(trimethylsilyl)oxy]-	0,55	N.E.	--	Não Categorizado
2-(4'-Methoxyphenyl)-2-(3'-methyl-4'methoxyphenyl)propane	0,49	N.E.	--	Não Categorizado
Nonadecane	0,38	N.E.	--	Alkanes
2-Hydroxyethyl palmitate	0,36	N.E.	--	Carboximidic acids
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	0,15	N.E.	--	Carbonyl compounds
5-hydroxyvaleric acid	N.E.	30,18	++	Fatty acids and conjugates
4-Hydroxybutanoic acid	N.E.	28,21	++	Fatty acids and conjugates
Erythritol	N.E.	17,06	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Mandelic acid, 3,4-dimethoxy-, methyl ester	N.E.	8,52	++	Não Categorizado
Glyceric acid	N.E.	6,52	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
3-Deoxytetrionic acid	N.E.	5,96	++	Short-chain hydroxy acids and derivatives
2,3-Dihydroxy-2-methylbutanoic acid	N.E.	4,31	++	Fatty acids and conjugates
Tyrosol	N.E.	3,97	++	Tyrosols and derivatives
D-(+)-Arabitol	N.E.	3,64	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Hexanoic acid	N.E.	3,54	++	Fatty acids and conjugates

D-(-)-Ribofuranose	N.E.	3,35	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
D-(+)-Talofuranose	N.E.	2,93	++	Não Categorizado
3-Hydroxyisovaleric acid	N.E.	2,7	++	Fatty acids and conjugates
Nonanoic acid	N.E.	2,63	++	Fatty acids and conjugates
Ribitol	N.E.	2,41	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Galactinol	N.E.	2,35	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1,2,4-Benzenetriol	N.E.	2,2	++	Não Categorizado
4-Coumaric acid	N.E.	1,76	++	Hydroxycinnamic acids and derivatives
Itaconic acid	N.E.	1,31	++	Fatty acids and conjugates
(Z)-Docos-9-enenitrile	N.E.	1,07	++	Não Categorizado
1,2,4-Butanetriol	N.E.	0,93	++	Alcohols and polyols
4-Hydroxybenzaldehyde	N.E.	0,7	++	Carbonyl compounds
Dihydroxyacetone	N.E.	0,49	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
Diocetyl terephthalate	N.E.	0,46	++	Benzoic acids and derivatives
Tetradecane	N.E.	0,43	++	Alkanes
γ -Resorcylic acid, methyl ester	N.E.	0,39	++	Não Categorizado
Hexadecane	N.E.	0,21	++	Alkanes
D-Trehalose	N.E.	0,13	++	Carbohydrates and carbohydrate conjugates

* Lista de metabólitos encontrados análise do metaboloma dos exsudatos de milho. Var – Variação de abundância entre os exsudatos de milho inoculado com o RZ2MS9 e não inoculado. -- Composto que apresentou redução de pelo menos 10 vezes com a inoculação do RZ2MS9. - Composto que apresentou redução de pelo menos 2 vezes com a inoculação do RZ2MS9. +- Composto que apresentou variação inferior a 2 vezes com a inoculação do RZ2MS9. + Composto que apresentou aumento de pelo menos 2 vezes com a inoculação do RZ2MS9. ++ Composto que apresentou aumento de pelo menos 10 vezes com a inoculação do RZ2MS9.

APÊNDICE D. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas	Efeito	Dimensões das raízes					N° de Pontas	
		Comprimento (cm)	Área Projetada (cm ²)	Área Superficial (cm ²)	Diâmetro Médio (mm)	Volume de Raízes (cm ³)		
		Simplex	Interação	Interação	Simplex	Interação		
Dosagem	Esporos	10 ⁴ UFC/ml	101,4 a	8,2 a	25,6 a	0,8 b	0,5	335,3 a
		10 ⁵ UFC/ml	91,9 a	7,6 a	24,0 a	0,8 a	0,5	224,9 b
		10 ⁶ UFC/ml	94,7 b	8,1 a	25,6 a	0,9 a	0,6	253,3 b
		10 ⁷ UFC/ml	79,6 b	6,9 b	21,7 b	0,9 a	0,5	274,0 b
		10 ⁸ UFC/ml	76,8 c	6,6 b	20,8 b	0,9 a	0,4	207,3 b
	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	98,7 a	8,0 a	25,1 a	0,8 b	0,5 b	138,3 b
		10 ⁵ UFC/ml	105,2 a	9,1 a	28,6 a	0,9 a	0,6 a	495,4 a
		10 ⁶ UFC/ml	83,6 b	6,8 b	21,5 b	0,8 a	0,4 c	415,2 a
		10 ⁷ UFC/ml	94,0 b	8,3 a	26,1 a	0,9 a	0,6 a	448,7 a
		10 ⁸ UFC/ml	80,2 c	6,4 b	20,0 b	0,8 a	0,4 c	166,1 b
	Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	92,5 a	7,6 a	23,8 a	0,8 b	0,5	107,3
		10 ⁵ UFC/ml	96,2 a	8,3 a	25,9 a	0,9 a	0,6	108,3
		10 ⁶ UFC/ml	95,7 b	8,0 a	25,3 a	0,8 a	0,5	85,9
		10 ⁷ UFC/ml	90,0 b	7,7 a	24,1 a	0,9 a	0,5	87,7
		10 ⁸ UFC/ml	70,0 c	6,3 b	19,9 b	0,9 a	0,5	72,4

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE E. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Comprimento de Raízes (cm) por Classe de diâmetro (mm)					
		0<C≤0,5	0,5<C≤1,0	1,0<C≤1,5	1,5<C≤2,0	2,0<C≤2,5	
Efeito		Simple	Simple	Simple	Interação	Simple	
Dosagem	Esporos	10 ⁴ UFC/ml	18,7 a	69,4 a	10,9 b	0,8 b	0,5
		10 ⁵ UFC/ml	14,3 a	64,8 a	9,9 a	1,0 b	0,5
		10 ⁶ UFC/ml	11,3 b	68,6 a	10,7 b	1,7 a	0,5
		10 ⁷ UFC/ml	9,9 b	58,4 a	8,1 b	0,7 b	0,6
		10 ⁸ UFC/ml	9,0 b	54,6 b	10,6 b	1,1 b	0,6
	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	13,1 a	74,9 a	8,0 b	1,1	0,7
		10 ⁵ UFC/ml	15,1 a	70,7 a	15,3 a	1,6	1,3
		10 ⁶ UFC/ml	13,3 b	59,2 a	8,9 b	0,6	0,4
		10 ⁷ UFC/ml	14,5 b	63,4 a	11,8 b	1,0	0,8
		10 ⁸ UFC/ml	14,9 b	54,1 b	8,8 b	1,0	0,5
Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	14,3 a	65,5 a	10,7 b	0,8	0,4	
	10 ⁵ UFC/ml	13,2 a	65,7 a	14,6 a	1,0	0,5	
	10 ⁶ UFC/ml	10,7 b	72,8 a	10,5 b	0,6	0,5	
	10 ⁷ UFC/ml	10,1 b	67,3 a	10,3 b	0,8	0,3	
	10 ⁸ UFC/ml	6,6 b	50,7 b	10,3 b	0,8	0,4	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE F. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas	Efeito	Área Superficial (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)					
		0<AS<=0,5	0,5<AS<=1,0	1,0<AS<=1,5	1,5<AS<=2,0	2,0<AS<=2,5	
		Simple	Simple	Simple	Interação	Simple	
Dosagem	Esporos	10 ⁴ UFC/ml	1,1 a	17,3 a	3,8 b	0,4 b	0,4
		10 ⁵ UFC/ml	1,0 a	16,1 a	3,5 a	0,6 b	0,4
		10 ⁶ UFC/ml	0,7 b	16,9 a	3,8 b	0,9 a	0,3
		10 ⁷ UFC/ml	0,6 b	14,6 a	2,9 b	0,4 b	0,4
		10 ⁸ UFC/ml	0,6 b	13,6 b	3,8 b	0,6 b	0,4
	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	1,0 a	18,2 a	2,8 b	0,6	0,5
		10 ⁵ UFC/ml	0,9 a	18,0 a	5,4 a	0,8	0,9
		10 ⁶ UFC/ml	0,9 b	14,7 a	3,1 b	0,3	0,3
		10 ⁷ UFC/ml	0,9 b	16,1 a	4,1 b	0,6	0,6
		10 ⁸ UFC/ml	1,2 b	13,2 b	3,1 b	0,5	0,3
	Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	1,1 a	16,6 a	3,8 b	0,4	0,3
		10 ⁵ UFC/ml	1,1 a	16,7 a	5,1 a	0,5	0,4
		10 ⁶ UFC/ml	0,9 b	18,4 a	3,7 b	0,3	0,3
		10 ⁷ UFC/ml	0,8 b	16,8 a	3,7 b	0,4	0,2
		10 ⁸ UFC/ml	0,5 b	13,0 b	3,7 b	0,4	0,3

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE G. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas	Efeito	Área Projetada (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)					
		0<AP<=0,5	0,5<AP<=1,0	1,0<AP<=1,5	1,5<AP<=2,0	2,0<AP<=2,5	
		Simple	Simple	Simple	Interação	Simple	
Dosagem	Esporos	10 ⁴ UFC/ml	0,37 a	5,50 a	1,22 b	0,14 b	0,12
		10 ⁵ UFC/ml	0,33 a	5,14 a	1,13 a	0,18 b	0,12
		10 ⁶ UFC/ml	0,24 b	5,38 a	1,21 b	0,30 a	0,10
		10 ⁷ UFC/ml	0,21 b	4,64 a	0,92 b	0,12 b	0,14
		10 ⁸ UFC/ml	0,18 b	4,34 b	1,21 b	0,18 b	0,13
	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	0,31 a	5,79 a	0,91 b	0,19	0,15
		10 ⁵ UFC/ml	0,30 a	5,74 a	1,71 a	0,27	0,28
		10 ⁶ UFC/ml	0,28 b	4,67 a	0,98 b	0,11	0,08
		10 ⁷ UFC/ml	0,30 b	5,12 a	1,30 b	0,18	0,18
		10 ⁸ UFC/ml	0,37 b	4,19 b	0,99 b	0,17	0,11
Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	0,34 a	5,28 a	1,21 b	0,14	0,08	
	10 ⁵ UFC/ml	0,34 a	5,32 a	1,62 a	0,17	0,12	
	10 ⁶ UFC/ml	0,29 b	5,86 a	1,18 b	0,10	0,11	
	10 ⁷ UFC/ml	0,26 b	5,36 a	1,18 b	0,13	0,07	
	10 ⁸ UFC/ml	0,16 b	4,14 b	1,17 b	0,14	0,10	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE H. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas	Efeito	Volume (cm ³) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)					
		0<V<=0,5	0,5<V<=1,0	1,0<V<=1,5	1,5<V<=2,0	2,0<V<=2,5	
		Não Significativo	Simples	Simples	Interação	Simples	
Dosagem	Esporos	10 ⁴ UFC/ml	0,008	0,349 a	0,108 b	0,019 b	0,021
		10 ⁵ UFC/ml	0,008	0,326 a	0,102 a	0,024 b	0,021
		10 ⁶ UFC/ml	0,006	0,338 a	0,109 b	0,040 a	0,017
		10 ⁷ UFC/ml	0,005	0,295 a	0,082 b	0,016 b	0,025
		10 ⁸ UFC/ml	0,004	0,276 b	0,109 b	0,024 b	0,022
	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	0,007	0,359 a	0,081 b	0,026	0,027
		10 ⁵ UFC/ml	0,007	0,373 a	0,152 a	0,035	0,049
		10 ⁶ UFC/ml	0,007	0,295 a	0,086 b	0,014	0,014
		10 ⁷ UFC/ml	0,007	0,330 a	0,114 b	0,024	0,033
		10 ⁸ UFC/ml	0,009	0,260 b	0,089 b	0,023	0,019
	Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	0,008	0,342 a	0,109 b	0,019	0,014
		10 ⁵ UFC/ml	0,008	0,347 a	0,142 a	0,022	0,021
		10 ⁶ UFC/ml	0,007	0,377 a	0,106 b	0,013	0,020
		10 ⁷ UFC/ml	0,007	0,342 a	0,107 b	0,017	0,013
		10 ⁸ UFC/ml	0,004	0,270 b	0,105 b	0,019	0,018

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE I.

Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Pesagens				
		Massa seca (mg) Plântula	Massa seca (mg) Raiz	Massa seca (mg) Parte aérea	Relação/Raiz Parte Aérea	
Efeito		Interação	Interação	Interação	Simples	
Dosagem	Esporos	10 ⁴ UFC/ml	190,1 b	39,1 a	31,3	1,2
		10 ⁵ UFC/ml	187,5 b	35,6 a	34,8	1,0
		10 ⁶ UFC/ml	194,9 b	30,8 a	29,0	1,1
		10 ⁷ UFC/ml	216,2 a	21,4 b	26,4	0,8
	Células Vegetativas	10 ⁸ UFC/ml	214,1 a	32,8 a	34,3	1,0
		10 ⁴ UFC/ml	204,7	44,7 a	35,6 a	1,3
		10 ⁵ UFC/ml	199,3	21,9 b	18,8 c	1,2
		10 ⁶ UFC/ml	203,8	36,4 a	30,5 a	1,2
Meio de Cultura	10 ⁷ UFC/ml	195,2	39,4 a	33,2 a	1,2	
	10 ⁸ UFC/ml	178,3	40,6 a	26,3 b	1,5	
	10 ⁴ UFC/ml	165,3	37,2	30,1	1,2	
	10 ⁵ UFC/ml	177,9	38,7	32,2	1,2	
		10 ⁶ UFC/ml	185,1	34,2	29,0	1,2
		10 ⁷ UFC/ml	174,2	35,4	27,3	1,3
		10 ⁸ UFC/ml	184,1	32,6	29,2	1,1

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE J.

Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Dimensões das raízes						
		Comprimento (cm)	Área Projetada (cm ²)	Área Superficial (cm ²)	Diâmetro Médio (mm)	Volume de Raízes (cm ³)	Nº de Pontas	
Efeito		Não Significativo	Interação	Interação	Não Significativo	Interação	Interação	
Inóculo	10 ⁴ UFC/ml	Esporos	101,4	8,2	25,6	0,8	0,5	335,3 a
		Células Vegetativas	98,7	8,0	25,1	0,8	0,5	138,3 b
		Meio de Cultura	92,5	7,6	23,8	0,8	0,5	107,3 b
	10 ⁵ UFC/ml	Esporos	91,9	7,6 b	24 b	0,8	0,5 b	224,9 b
		Células Vegetativas	105,2	9,1 a	28,6 a	0,9	0,6 a	495,4 a
		Meio de Cultura	96,2	8,3 b	25,9 b	0,9	0,6 b	108,3 c
	10 ⁶ UFC/ml	Esporos	94,7	8,1 a	25,6 a	0,9	0,6 a	253,3 b
		Células Vegetativas	83,6	6,8 b	21,5 b	0,8	0,4 b	415,2 a
		Meio de Cultura	95,7	8 a	25,3 a	0,8	0,5 a	85,9 c
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	79,6	6,9	21,7	0,9	0,5 b	274 b	
	Células Vegetativas	94,0	8,3	26,1	0,9	0,6 a	448,7 a	
	Meio de Cultura	90,0	7,7	24,1	0,9	0,5 b	87,7 c	
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	76,8	6,6	20,8	0,9	0,4	207,3 a	
	Células Vegetativas	80,2	6,4	20,0	0,8	0,4	166,1 a	
	Meio de Cultura	70,0	6,3	19,9	0,9	0,5	72,4 b	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da inoculação. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de dosagem de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples foram analisados de forma conjunta independentemente da concentração do inóculo e as letras colocadas em função do tipo de inóculo independente de sua concentração.

APÊNDICE K. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Comprimento de Raízes (cm) por Classe de diâmetro (mm)					
		0<C<=0,5	0,5<C<=1,0	1,0<C<=1,5	1,5<C<=2,0	2,0<C<=2,5	
Efeito		Não Significativo	Não Significativo	Não Significativo	Não Significativo	Simplex	
Inóculo	10 ⁴ UFC/ml	Esporos	18,7	69,4	10,9	0,8	0,5 b
		Células Vegetativas	13,1	74,9	8,0	1,1	0,7 a
		Meio de Cultura	14,3	65,5	10,7	0,8	0,4 b
	10 ⁵ UFC/ml	Esporos	14,3	64,8	9,9	1,0	0,5 b
		Células Vegetativas	15,1	70,7	15,3	1,6	1,3 a
		Meio de Cultura	13,2	65,7	14,6	1,0	0,5 b
	10 ⁶ UFC/ml	Esporos	11,3	68,6	10,7	1,7 a	0,5 b
		Células Vegetativas	13,3	59,2	8,9	0,6 b	0,4 a
		Meio de Cultura	10,7	72,8	10,5	0,6 b	0,5 b
	10 ⁷ UFC/ml	Esporos	9,9	58,4	8,1	0,7	0,6 b
		Células Vegetativas	14,5	63,4	11,8	1,0	0,8 a
		Meio de Cultura	10,1	67,3	10,3	0,8	0,3 b
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	9,0	54,6	10,6	1,1	0,6 b	
	Células Vegetativas	14,9	54,1	8,8	1,0	0,5 a	
	Meio de Cultura	6,6	50,7	10,3	0,8	0,4 b	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da inoculação. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de dosagem de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples foram analisados de forma conjunta independentemente da concentração do inóculo e as letras colocadas em função do tipo de inóculo independente de sua concentração.

APÊNDICE L. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Área Superficial (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)					
		0<AS<=0,5	0,5<AS<=1,0	1,0<AS<=1,5	1,5<AS<=2,0	2,0<AS<=2,5	
Efeito		Não Significativo	Não Significativo	Não Significativo	Interação	Simple	
Inóculo	10 ⁴ UFC/ml	Esporos	1,1	17,3	3,8	0,4	0,4 b
		Células Vegetativas	1,0	18,2	2,8	0,6	0,5 a
		Meio de Cultura	1,1	16,6	3,8	0,4	0,3 b
	10 ⁵ UFC/ml	Esporos	1,0	16,1	3,5	0,6	0,4 b
		Células Vegetativas	0,9	18,0	5,4	0,8	0,9 a
		Meio de Cultura	1,1	16,7	5,1	0,5	0,4 b
	10 ⁶ UFC/ml	Esporos	0,7	16,9	3,8	0,9 a	0,3 b
		Células Vegetativas	0,9	14,7	3,1	0,3 b	0,3 a
		Meio de Cultura	0,9	18,4	3,7	0,3 b	0,3 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	0,6	14,6	2,9	0,4	0,4 b	
	Células Vegetativas	0,9	16,1	4,1	0,6	0,6 a	
	Meio de Cultura	0,8	16,8	3,7	0,4	0,2 b	
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	0,6	13,6	3,8	0,6	0,4 b	
	Células Vegetativas	1,2	13,2	3,1	0,5	0,3 a	
	Meio de Cultura	0,5	13,0	3,7	0,4	0,3 b	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da inoculação. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de dosagem de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples foram analisados de forma conjunta independentemente da concentração do inóculo e as letras colocadas em função do tipo de inóculo independente de sua concentração.

APÊNDICE M. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Área Projetada (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)					
		0<AP<=0,5	0,5<AP<=1,0	1,0<AP<=1,5	1,5<AP<=2,0	2,0<AP<=2,5	
Efeito		Não Significativo	Não Significativo	Não Significativo	Interação	Simple	
Inóculo	10 ⁴ UFC/ml	Esporos	0,37	5,5	1,22	0,14	0,12 b
		Células Vegetativas	0,31	5,79	0,91	0,19	0,15 a
		Meio de Cultura	0,34	5,28	1,21	0,14	0,08 b
	10 ⁵ UFC/ml	Esporos	0,33	5,14	1,13	0,18	0,12 b
		Células Vegetativas	0,30	5,74	1,71	0,27	0,28 a
		Meio de Cultura	0,34	5,32	1,62	0,17	0,12 b
	10 ⁶ UFC/ml	Esporos	0,24	5,38	1,21	0,30 a	0,10 b
		Células Vegetativas	0,28	4,67	0,98	0,11 b	0,08 a
		Meio de Cultura	0,29	5,86	1,18	0,10 b	0,11 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	0,21	4,64	0,92	0,12	0,14 b	
	Células Vegetativas	0,30	5,12	1,30	0,18	0,18 a	
	Meio de Cultura	0,26	5,36	1,18	0,13	0,07 b	
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	0,18	4,34	1,21	0,18	0,13 b	
	Células Vegetativas	0,37	4,19	0,99	0,17	0,11 a	
	Meio de Cultura	0,16	4,14	1,17	0,14	0,1 b	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da inoculação. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de dosagem de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples foram analisados de forma conjunta independentemente da concentração do inóculo e as letras colocadas em função do tipo de inóculo independente de sua concentração.

APÊNDICE N. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas		Volume (cm ³) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)					
		0<V<=0,5	0,5<V<=1,0	1,0<V<=1,5	1,5<V<=2,0	2,0<V<=2,5	
Efeito		Não Significativo	Não Significativo	Não Significativo	Não Significativo	Simple	
Inóculo	10 ⁴ UFC/ml	Esporos	0,008	0,349	0,108	0,019	0,021 b
		Células Vegetativas	0,007	0,359	0,081	0,026	0,027 a
		Meio de Cultura	0,008	0,342	0,109	0,019	0,014 b
	10 ⁵ UFC/ml	Esporos	0,008	0,326	0,102	0,024	0,021 b
		Células Vegetativas	0,007	0,373	0,152	0,035	0,049 a
		Meio de Cultura	0,008	0,347	0,142	0,022	0,021 b
	10 ⁶ UFC/ml	Esporos	0,006	0,338	0,109	0,040 a	0,017 b
		Células Vegetativas	0,007	0,295	0,086	0,014 b	0,014 a
		Meio de Cultura	0,007	0,377	0,106	0,013 b	0,020 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	0,005	0,295	0,082	0,016	0,025 b	
	Células Vegetativas	0,007	0,330	0,114	0,024	0,033 a	
	Meio de Cultura	0,007	0,342	0,107	0,017	0,013 b	
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	0,004	0,276	0,109	0,024	0,022 b	
	Células Vegetativas	0,009	0,260	0,089	0,023	0,019 a	
	Meio de Cultura	0,004	0,270	0,105	0,019	0,018 b	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da inoculação. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de dosagem de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples foram analisados de forma conjunta independentemente da concentração do inóculo e as letras colocadas em função do tipo de inóculo independente de sua concentração.

APÊNDICE O. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest

Variáveis analisadas	Efeito	Pesagens			Relação/Raiz Parte Aérea	
		Massa seca (mg) Plântula	Massa seca (mg) Raiz	Massa seca (mg) Parte aérea		
		Interação	Interação	Interação	Simplex	
Inóculo	10 ⁴ UFC/ml	Esporos	190,1 a	39,1	31,3	1,2 b
		Células Vegetativas	204,7 a	44,7	35,6	1,3 a
		Meio de Cultura	165,3 b	37,2	30,1	1,2 a
	10 ⁵ UFC/ml	Esporos	187,5	35,6 a	34,8 a	1,0 b
		Células Vegetativas	199,3	21,9 b	18,8 b	1,2 a
		Meio de Cultura	177,9	38,7 a	32,2 a	1,2 a
	10 ⁶ UFC/ml	Esporos	194,9	30,8	29,0	1,1 b
		Células Vegetativas	203,8	36,4	30,5	1,2 a
		Meio de Cultura	185,1	34,2	29,0	1,2 a
	10 ⁷ UFC/ml	Esporos	216,2 a	21,4 b	26,4	0,8 b
		Células Vegetativas	195,2 b	39,4 a	33,2	1,2 a
		Meio de Cultura	174,2 c	35,4 a	27,3	1,3 a
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	214,1 a	32,8	34,3	1,0 b	
	Células Vegetativas	178,3 b	40,6	26,3	1,5 a	
	Meio de Cultura	184,1 b	32,6	29,2	1,1 a	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em germitest em função da inoculação. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de dosagem de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples foram analisados de forma conjunta independentemente da concentração do inóculo e as letras colocadas em função do tipo de inóculo independente de sua concentração.

APÊNDICE P. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Dimensões das raízes						
		Comprimento (cm)	Area Projetada (cm ²)	Area Superficial (cm ²)	Diâmetro Médio (mm)	Volume de Raízes (cm ³)	Pontas	
Efeito		Interação	Interação	Interação	Simples	Interação	Interação	
Esporos	10 ⁴ UFC/ml	549,79 a	23,32 a	73,28 a	0,43	0,78	2101,2	
	10 ⁵ UFC/ml	407,9 b	18,15 b	57,03 b	0,45	0,65	2133	
	10 ⁶ UFC/ml	657,95 a	27,72 a	87,07 a	0,42	0,92	2655,6	
	10 ⁷ UFC/ml	578,93 a	26,26 a	82,51 a	0,46	0,94	2510,8	
	10 ⁸ UFC/ml	544,45 a	24,34 a	76,46 a	0,45	0,87	2004,2	
	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	622,34	29,85	93,78	0,48	1,13	2851,8
		10 ⁵ UFC/ml	656,28	31,4	98,63	0,48	1,19	2194,6
		10 ⁶ UFC/ml	641,52	29,93	94,02	0,47	1,1	3028
10 ⁷ UFC/ml		561,77	25,48	80,04	0,45	0,91	2133,4	
Meio de Cultura	10 ⁸ UFC/ml	625,7	30,69	96,42	0,5	1,19	2330,6	
	10 ⁴ UFC/ml	515,44	23,39 b	73,47 b	0,46	0,84	1769,4 b	
	10 ⁵ UFC/ml	543,66	24,61 a	77,33 a	0,45	0,88	2610,6 a	
	10 ⁶ UFC/ml	436,12	19,19 b	60,29 b	0,44	0,67	2277,2 a	
	10 ⁷ UFC/ml	635,29	28,89 a	90,77 a	0,45	1,03	3115,4 a	
	10 ⁸ UFC/ml	583,8	25,79 a	81,01 a	0,45	0,9	2308,6 a	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE Q. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Comprimento de Raízes (cm) por Classe de diâmetro (mm)								
		0<C <=0,5	0,5<C <=1,0	1,0<C <=1,5	1,5<C <=2,0	2,0<C <=2,5	2,5<C <=3,0	3,0<C <=3,5	3,5<C <=4,0	
Efeito		Interação	Simple	Simple	Simple	Interação	Simple	Simple	Simple	
Esporos	10 ⁴ UFC/ml	425,04 a	71,91	41,23	6,53	1,19 a	0,88	0,89	0,6	
	10 ⁵ UFC/ml	298,78 b	68,39	33,61	4,05	0,58 b	0,64	0,33	0,56	
	10 ⁶ UFC/ml	508,06 a	87,82	48,2	8,59	2,1 a	0,64	0,41	0,72	
	10 ⁷ UFC/ml	430,53 a	89,28	45,83	7,85	1,85 a	0,78	0,63	0,53	
	10 ⁸ UFC/ml	402,48 a	88,05	41,4	6,62	2,02 a	0,68	0,65	0,31	
Dosagem	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	451,79	101,87	47,86	11,24	3,36	1,64	1,26	1,17
		10 ⁵ UFC/ml	481,2	101,51	53,76	10,23	3,41	1,65	0,98	0,84
		10 ⁶ UFC/ml	479,31	91,51	52,68	10,06	2,62	0,92	1,13	1,07
		10 ⁷ UFC/ml	413,33	94,04	40,78	7,56	1,88	0,76	0,77	0,7
		10 ⁸ UFC/ml	452,11	95,6	55,71	13	4,2	1,66	0,7	0,86
Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	391,98	66,82	40,89	9,86	2,07 a	0,85	0,45	0,67	
	10 ⁵ UFC/ml	387,76	101,66	41,35	7,61	2,16 a	0,78	0,28	0,32	
	10 ⁶ UFC/ml	316,11	75,88	37,69	3,84	0,4 b	0,44	0,23	0,42	
	10 ⁷ UFC/ml	474,27	97,63	44,87	11,44	3,28 a	1,22	0,72	0,62	
	10 ⁸ UFC/ml	444,67	81,03	43,69	8,84	2,24 a	0,81	0,7	0,53	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE R.

Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Área Superficial (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)							
		0<AS <=0,5	0,5<AS <=1,0	1,0<AS <=1,5	1,5<AS <=2,0	2,0<AS <=2,5	2,5<AS <=3,0	3,0<AS <=3,5	3,5<AS <=4,0
Efeito		Interação	Simple	Simple	Interação	Interação	Simple	Simple	Simple
Esporos	10 ⁴ UFC/ml	23,92 a	17,3	15,22	3,43	0,83 a	0,77	0,91	0,7
	10 ⁵ UFC/ml	15,85 b	16,65	12,28	2,12	0,41 b	0,55	0,33	0,66
	10 ⁶ UFC/ml	28,23 a	21,01	17,82	4,52	1,46 a	0,54	0,41	0,83
	10 ⁷ UFC/ml	24,92 a	21,93	16,87	4,14	1,31 a	0,67	0,63	0,63
	10 ⁸ UFC/ml	22,63 a	21,07	15,27	3,49	1,42 a	0,57	0,66	0,37
Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	25,23	24,62	17,89	5,95	2,34	1,41	1,28	1,37
	10 ⁵ UFC/ml	28,17	24,17	20,11	5,42	2,38	1,42	0,99	0,98
	10 ⁶ UFC/ml	27,83	21,84	19,72	5,27	1,83	0,79	1,15	1,24
	10 ⁷ UFC/ml	23,19	22,62	15,11	4,02	1,31	0,65	0,78	0,83
	10 ⁸ UFC/ml	26,47	22,69	20,78	6,86	2,91	1,41	0,7	1
Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	22,38 a	15,91	15,31	5,14 a	1,44 a	0,74	0,46	0,78
	10 ⁵ UFC/ml	20,11 b	24,79	15,16	4,02 a	1,49 a	0,67	0,28	0,37
	10 ⁶ UFC/ml	15,71 b	19,12	13,84	2,02 b	0,28 b	0,37	0,23	0,5
	10 ⁷ UFC/ml	26,62 a	23,06	16,91	6,06 a	2,29 a	1,06	0,73	0,73
	10 ⁸ UFC/ml	26,56 a	18,86	16,36	4,63 a	1,58 a	0,69	0,71	0,63

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE S.

Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Área Projetada (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)							
		0<AP <=0,5	0,5<AP <=1,0	1,0<AP <=1,5	1,5<AP <=2,0	2,0<AP <=2,5	2,5<AP <=3,0	3,0<AP <=3,5	3,5<AP <=4,0
Efeito		Interação	Simple	Simple	Interação	Interação	Simple	Simple	Simple
Esporos	10 ⁴ UFC/ml	7,61 a	5,51	4,85	1,09	0,27 a	0,25	0,29	0,22
	10 ⁵ UFC/ml	5,05 b	5,30	3,91	0,67	0,13 b	0,17	0,10	0,21
	10 ⁶ UFC/ml	8,99 a	6,69	5,67	1,44	0,46 a	0,17	0,13	0,27
	10 ⁷ UFC/ml	7,93 a	6,98	5,37	1,32	0,42 a	0,21	0,20	0,20
	10 ⁸ UFC/ml	7,20 a	6,71	4,86	1,11	0,45 a	0,18	0,21	0,12
Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	8,03	7,84	5,69	1,89	0,75	0,45	0,41	0,44
	10 ⁵ UFC/ml	8,97	7,69	6,40	1,73	0,76	0,45	0,32	0,31
	10 ⁶ UFC/ml	8,86	6,95	6,28	1,68	0,58	0,25	0,37	0,40
	10 ⁷ UFC/ml	7,38	7,20	4,81	1,28	0,42	0,21	0,25	0,27
	10 ⁸ UFC/ml	8,43	7,22	6,62	2,18	0,93	0,45	0,22	0,32
Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	7,13 a	5,06	4,87	1,64 a	0,46 a	0,24	0,15	0,25
	10 ⁵ UFC/ml	6,40 b	7,89	4,82	1,28 b	0,47 a	0,21	0,09	0,12
	10 ⁶ UFC/ml	5,00b	6,08	4,41	0,64 a	0,09 b	0,12	0,07	0,16
	10 ⁷ UFC/ml	8,47 a	7,34	5,38	1,93 a	0,73 a	0,34	0,23	0,23
	10 ⁸ UFC/ml	8,45 a	6,00	5,21	1,47 a	0,50 a	0,22	0,23	0,20

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE T. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Volume (cm ³) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)								
		0<V <=0,5	0,5<V <=1,0	1,0<V <=1,5	1,5<V <=2,0	2,0<V <=2,5	2,5<V <=3,0	3,0<V <=3,5	3,5<V <=4,0	
Efeito		Interação	Simple	Simple	Interação	Interação	Simple	Simple	Simple	
Esporos	10 ⁴ UFC/ml	0,14 a	0,34	0,45	0,14	0,05 a	0,05	0,07	0,06	
	10 ⁵ UFC/ml	0,09 b	0,33	0,36	0,09	0,02 b	0,04	0,03	0,06	
	10 ⁶ UFC/ml	0,16 a	0,41	0,53	0,19	0,08 a	0,04	0,03	0,08	
	10 ⁷ UFC/ml	0,15 a	0,44	0,5	0,18	0,07 a	0,05	0,05	0,06	
	10 ⁸ UFC/ml	0,13 a	0,42	0,45	0,15	0,08 a	0,04	0,05	0,04	
Dosagem	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	0,15	0,49	0,54	0,25	0,13	0,1	0,1	0,13
	10 ⁵ UFC/ml	0,17	0,48	0,61	0,23	0,13	0,1	0,08	0,09	
	10 ⁶ UFC/ml	0,17	0,43	0,59	0,22	0,1	0,05	0,09	0,12	
	10 ⁷ UFC/ml	0,14	0,45	0,45	0,17	0,07	0,04	0,06	0,08	
	10 ⁸ UFC/ml	0,16	0,45	0,62	0,29	0,16	0,1	0,06	0,09	
Meio de Cultura	10 ⁴ UFC/ml	0,13 a	0,31	0,46	0,21 a	0,08 a	0,05	0,04	0,07	
	10 ⁵ UFC/ml	0,11 b	0,5	0,45	0,17 a	0,08 a	0,05	0,02	0,03	
	10 ⁶ UFC/ml	0,08 b	0,39	0,41	0,08 b	0,02 b	0,03	0,02	0,05	
	10 ⁷ UFC/ml	0,16 a	0,45	0,51	0,26 a	0,13 a	0,07	0,06	0,07	
	10 ⁸ UFC/ml	0,16 a	0,36	0,49	0,19 a	0,09 a	0,05	0,06	0,06	

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE U. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Massa seca das plantas (g)	
		Massa Seca de Raízes	Massa seca da parte aérea
Efeito		Simplex	Interação
Esporos	10 ⁴ UFC/ml	87,7	212,22
	10 ⁵ UFC/ml	81,14	204,2
	10 ⁶ UFC/ml	102,28	251,74
	10 ⁷ UFC/ml	106,52	204,36
	10 ⁸ UFC/ml	96,34	215,4
Dosagem	Células Vegetativas	10 ⁴ UFC/ml	112,64
		10 ⁵ UFC/ml	123,26
		10 ⁶ UFC/ml	106,81
		10 ⁷ UFC/ml	93,04
		10 ⁸ UFC/ml	125,78
Meio de Cultura		10 ⁴ UFC/ml	94,92
		10 ⁵ UFC/ml	96,02
		10 ⁶ UFC/ml	78,2
		10 ⁷ UFC/ml	106,62
		10 ⁸ UFC/ml	102,44

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE V. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Dimensões das raízes					
		Comprimento (cm)	Área Projetada (cm ²)	Área Superficial (cm ²)	Diâmetro Médio (mm)	Volume de Raízes (cm ³)	N° de Pontas
Efeito		Interação	Interação	Interação	Simples	Interação	Interação
10 ⁴ UFC/ml	Esporos	549,79	23,32 b	73,28 b	0,43 b	0,78 b	2101,2 b
	Células Vegetativas	622,34	29,85 a	93,78 a	0,48 a	1,13 a	2851,8 a
	Meio de Cultura	515,44	23,39 b	73,47 b	0,46 b	0,84 b	1769,4 b
10 ⁵ UFC/ml	Esporos	407,9 b	18,15 c	57,03 c	0,45 b	0,65 b	2133
	Células Vegetativas	656,28 a	31,4 a	98,63 a	0,48 a	1,19 a	2194,6
	Meio de Cultura	543,66 a	24,61 b	77,33 b	0,45 b	0,88 b	2610,6
10 ⁶ UFC/ml	Esporos	657,95 a	27,72 a	87,07 a	0,42 b	0,92 a	2655,6
	Células Vegetativas	641,52 a	29,93 a	94,02 a	0,47 a	1,1 a	3028
	Meio de Cultura	436,12 b	19,19 b	60,29 b	0,44 b	0,67 b	2277,2
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	578,93	26,26	82,51	0,46 b	0,94	2510,8
	Células Vegetativas	561,77	25,48	80,04	0,45 a	0,91	2133,4
	Meio de Cultura	635,29	28,89	90,77	0,45 b	1,03	3115,4
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	544,45	24,34	76,46	0,45 b	0,87 b	2004,2
	Células Vegetativas	625,7	30,69	96,42	0,5 a	1,19 a	2330,6
	Meio de Cultura	583,8	25,79	81,01	0,45 b	0,9 b	2308,6

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE W.

Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Comprimento de Raízes (cm) por Classe de diâmetro (mm)							
		0<C <=0,5	0,5<C <=1,0	1,0<C <=1,5	1,5<C <=2,0	2,0<C <=2,5	2,5<C <=3,0	3,0<C <=3,5	3,5<C <=4,0
Efeito		Interação	Simple	Simple	Simple	Interação	Simple	Simple	Simple
10 ⁴ UFC/ml	Esporos	425,04	71,91 b	41,23 b	6,53 b	1,19 b	0,88 b	0,89 b	0,6 b
	Células Vegetativas	451,79	101,87 a	47,86 a	11,24 a	3,36 a	1,64 a	1,26 a	1,17 a
	Meio de Cultura	391,98	66,82 b	40,89 b	9,86 b	2,07 b	0,85 b	0,45 b	0,67 b
10 ⁵ UFC/ml	Esporos	298,78 b	68,39 b	33,61 b	4,05 b	0,58 b	0,64 b	0,33 b	0,56 b
	Células Vegetativas	481,2 a	101,51 a	53,76 a	10,23 a	3,41 a	1,65 a	0,98 a	0,84 a
	Meio de Cultura	387,76 b	101,66 b	41,35 b	7,61 b	2,16 a	0,78 b	0,28 b	0,32 b
Inóculo 10 ⁶ UFC/ml	Esporos	508,06 a	87,82 b	48,2 b	8,59 b	2,1 a	0,64 b	0,41 b	0,72 b
	Células Vegetativas	479,31 a	91,51 a	52,68 a	10,06 a	2,62 a	0,92 a	1,13 a	1,07 a
	Meio de Cultura	316,11 b	75,88 b	37,69 b	3,84 b	0,4 b	0,44 b	0,23 b	0,42 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	430,53	89,28 b	45,83 b	7,85 b	1,85	0,78 b	0,63 b	0,53 b
	Células Vegetativas	413,33	94,04 a	40,78 a	7,56 a	1,88	0,76 a	0,77 a	0,7 a
	Meio de Cultura	474,27	97,63 b	44,87 b	11,44 b	3,28	1,22 b	0,72 b	0,62 b
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	402,48	88,05 b	41,4 b	6,62 b	2,02 b	0,68 b	0,65 b	0,31 b
	Células Vegetativas	452,11	95,6 a	55,71 a	13 a	4,2 a	1,66 a	0,7 a	0,86 a
	Meio de Cultura	444,67	81,03 b	43,69 b	8,84 b	2,24 b	0,81 b	0,7 b	0,53 b

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE X. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Área Superficial (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)							
		0<AS <=0,5	0,5<AS <=1,0	1,0<AS <=1,5	1,5<AS <=2,0	2,0<AS <=2,5	2,5<AS <=3,0	3,0<AS <=3,5	3,5<AS <=4,0
Efeito		Interação	Simples	Simples	Interação	Interação	Simples	Simples	Simples
10 ⁴ UFC/ml	Esporos	23,92	17,3 b	15,22 b	3,43	0,83 b	0,77 b	0,91 b	0,7 b
	Células Vegetativas	25,23	24,62 a	17,89 a	5,95	2,34 a	1,41 a	1,28 a	1,37 a
	Meio de Cultura	22,38	15,91 b	15,31 b	5,14	1,44 b	0,74 b	0,46 b	0,78 b
10 ⁵ UFC/ml	Esporos	15,85 b	16,65 b	12,28 b	2,12 b	0,41 b	0,55 b	0,33 b	0,66 b
	Células Vegetativas	28,17 a	24,17 a	20,11 a	5,42 a	2,38 a	1,42 a	0,99 a	0,98 a
	Meio de Cultura	20,11 b	24,79 b	15,16 b	4,02 a	1,49 a	0,67 b	0,28 b	0,37 b
Inóculo 10 ⁶ UFC/ml	Esporos	28,23 a	21,01 b	17,82 b	4,52 a	1,46 a	0,54 b	0,41 b	0,83 b
	Células Vegetativas	27,83 a	21,84 a	19,72 a	5,27 a	1,83 a	0,79 a	1,15 a	1,24 a
	Meio de Cultura	15,71 b	19,12 b	13,84 b	2,02 b	0,28 b	0,37 b	0,23 b	0,5 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	24,92	21,93 b	16,87 b	4,14	1,31	0,67 b	0,63 b	0,63 b
	Células Vegetativas	23,19	22,62 a	15,11 a	4,02	1,31	0,65 a	0,78 a	0,83 a
	Meio de Cultura	26,62	23,06 b	16,91 b	6,06	2,29	1,06 b	0,73 b	0,73 b
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	22,63	21,07 b	15,27 b	3,49	1,42 b	0,57 b	0,66 b	0,37 b
	Células Vegetativas	26,47	22,69 a	20,78 a	6,86	2,91 a	1,41 a	0,7 a	1 a
	Meio de Cultura	26,56	18,86 b	16,36 b	4,63	1,58 b	0,69 b	0,71 b	0,63 b

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE Y. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Área Projetada (cm ²) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)							
		0<AP <=0,5	0,5<AP <=1,0	1,0<AP <=1,5	1,5<AP <=2,0	2,0<AP <=2,5	2,5<AP <=3,0	3,0<AP <=3,5	3,5<AP <=4,0
Efeito		Interação	Simple	Simple	Interação	Interação	Simple	Simple	Simple
10 ⁴ UFC/ml	Esporos	7,61	5,51 b	4,85 b	1,09	0,27 b	0,25 b	0,29 b	0,22 b
	Células Vegetativas	8,03	7,84 a	5,69 a	1,89	0,75 a	0,45 a	0,41 a	0,44 a
	Meio de Cultura	7,13	5,06 b	4,87 b	1,64	0,46 b	0,24 b	0,15 b	0,25 b
10 ⁵ UFC/ml	Esporos	5,05 b	5,3 b	3,91 b	0,67 b	0,13 b	0,17 b	0,1 b	0,21 b
	Células Vegetativas	8,97 a	7,69 a	6,4 a	1,73 a	0,76 a	0,45 a	0,32 a	0,31 a
	Meio de Cultura	6,4 b	7,89 b	4,82 b	1,28 a	0,47 a	0,21 b	0,09 b	0,12 b
10 ⁶ UFC/ml	Esporos	8,99 a	6,69 b	5,67 b	1,44 a	0,46 a	0,17 b	0,13 b	0,27 b
	Células Vegetativas	8,86 a	6,95 a	6,28 a	1,68 a	0,58 a	0,25 a	0,37 a	0,4 a
	Meio de Cultura	5 b	6,08 b	4,41 b	0,64 b	0,09 b	0,12 b	0,07 b	0,16 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	7,93	6,98 b	5,37 b	1,32	0,42	0,21 b	0,2 b	0,2 b
	Células Vegetativas	7,38	7,2 a	4,81 a	1,28	0,42	0,21 a	0,25 a	0,27 a
	Meio de Cultura	8,47	7,34 b	5,38 b	1,93	0,73	0,34 b	0,23 b	0,23 b
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	7,2	6,71 b	4,86 b	1,11	0,45 b	0,18 b	0,21 b	0,12 b
	Células Vegetativas	8,43	7,22 a	6,62 a	2,18	0,93 a	0,45 a	0,22 a	0,32 a
	Meio de Cultura	8,45	6 b	5,21 b	1,47	0,5 b	0,22 b	0,23 b	0,2 b

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE Z. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Volume (cm ³) das Raízes por Classe de diâmetro (mm)							
		0<V <=0,5	0,5<V <=1,0	1,0<V <=1,5	1,5<V <=2,0	2,0<V <=2,5	2,5<V <=3,0	3,0<V <=3,5	3,5<V <=4,0
Efeito		Interação	Simple	Simple	Interação	Interação	Simple	Simple	Simple
10 ⁴ UFC/ml	Esporos	0,14	0,34 b	0,45 b	0,14	0,05 b	0,05 b	0,07 b	0,06 b
	Células Vegetativas	0,15	0,49 a	0,54 a	0,25	0,13 a	0,1 a	0,1 a	0,13 a
	Meio de Cultura	0,13	0,31 b	0,46 b	0,21	0,08 b	0,05 b	0,04 b	0,07 b
10 ⁵ UFC/ml	Esporos	0,09 b	0,33 b	0,36 b	0,09 b	0,02 b	0,04 b	0,03 b	0,06 b
	Células Vegetativas	0,17 a	0,48 a	0,61 a	0,23 a	0,13 a	0,1 a	0,08 a	0,09 a
	Meio de Cultura	0,11 b	0,5 b	0,45 b	0,17 a	0,08 a	0,05 b	0,02 b	0,03 b
10 ⁶ UFC/ml	Esporos	0,16 a	0,41 b	0,53 b	0,19 a	0,08 a	0,04 b	0,03 b	0,08 b
	Células Vegetativas	0,17 a	0,43 a	0,59 a	0,22 a	0,1 a	0,05 a	0,09 a	0,12 a
	Meio de Cultura	0,08 b	0,39 b	0,41 b	0,08 b	0,02 b	0,03 b	0,02 b	0,05 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	0,15	0,44 b	0,5 b	0,18	0,07	0,05 b	0,05 b	0,06 b
	Células Vegetativas	0,14	0,45 a	0,45 a	0,17	0,07	0,04 a	0,06 a	0,08 a
	Meio de Cultura	0,16	0,45 b	0,51 b	0,26	0,13	0,07 b	0,06 b	0,07 b
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	0,13	0,42 b	0,45 b	0,15	0,08 b	0,04 b	0,05 b	0,04 b
	Células Vegetativas	0,16	0,45 a	0,62 a	0,29	0,16 a	0,1 a	0,06 a	0,09 a
	Meio de Cultura	0,16	0,36 b	0,49 b	0,19	0,09 b	0,05 b	0,06 b	0,06 b

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

APÊNDICE AA. Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação

Variáveis analisadas		Massa seca das plantas (g)	
		Massa Seca de Raízes	Massa seca da parte aérea
Efeito		Simplex	Interação
10 ⁴ UFC/ml	Esporos	87,7 b	212,22
	Células Vegetativas	112,64 a	220,7
	Meio de Cultura	94,92 b	215,74
10 ⁵ UFC/ml	Esporos	81,14 b	204,2
	Células Vegetativas	123,26 a	255,52
	Meio de Cultura	96,02 b	224,28
10 ⁶ UFC/ml	Esporos	102,28 b	251,74 a
	Células Vegetativas	106,81 a	207,35 b
	Meio de Cultura	78,2 b	179,3 b
10 ⁷ UFC/ml	Esporos	106,52 b	204,36
	Células Vegetativas	93,04 a	188,08
	Meio de Cultura	106,62 b	244,3
10 ⁸ UFC/ml	Esporos	96,34 b	215,4
	Células Vegetativas	125,78 a	209,22
	Meio de Cultura	102,44 b	201,66

* Resultados do teste de promoção de crescimento de milho pelo RZ2MS9 em casa de vegetação em função da dosagem. Letras iguais na coluna para linhas do mesmo grupo de tipo de inóculo não diferem entre si para o teste de scott knott para um alfa estabelecido de 5%. Variáveis onde o efeito foi simples forma analisados de forma conjunta independentemente do tipo de inóculo e as letras colocadas em função da concentração de inóculo independente de seu tipo.

4. NOCAUTE DOS GENES *kinA* E *sigF* ESSENCIAIS A ESPORULAÇÃO NO *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9

Resumo

O nocaute de genes é uma importante ferramenta para estudo da função dos mesmos, permitindo uma avaliação direta da função do gene nocauteado no metabolismo do organismo estudado. Em relação aos genes de esporulação de *Bacillus* muitos trabalhos reportam vários nocautes bem sucedidas para estudo da função desses genes e de como eles atuam no processo de montagem e germinação dos endósporos. Sendo selecionados com bases nesses estudos os genes *kinA* e *sigF* para realização do nocaute na linhagem *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9. Sendo o primeiro uma proteína sensora das condições ambientais e responsável por sinalizar para o início da esporulação e o segundo um fator sigma expresso já durante a montagem dos endósporos. O nocaute desses genes chaves para a esporulação objetivava obter linhagens deficientes para esse processo e por consequência que exibissem fenótipo defeituoso para a formação de endósporos. Permitindo em uma etapa posterior a avaliação de como o processo de esporulação impacta na atividade de promoção de crescimento de plantas da linhagem RZ2MS9. Entretanto nas cinco tentativas de nocaute realizadas não foi possível obter os mutantes de interesse, sendo obtidas linhagens com fenótipo de atraso para a esporulação, mas que não apresentavam mutação nos genes alvo para o nocaute. Não foram observados grandes problemas na montagem dos plasmídeos e cassetes para o nocaute pela técnica de CRISPR-Cas9, sendo o procedimento para o nocaute realizado até suas etapas finais. Dessa forma este capítulo se concentra em descrever e discutir os resultados observados, tentando traçar hipóteses por traz da ineficiência no nocaute que possam guiar as futuras tentativas de nocaute da linhagem RZ2MS9.

Palavra chave: Esporulação, CRISPR, Replicação de plasmídeos, Nocaute

4.1. Introdução

A capacidade de formação de endósporos é uma habilidade presente em alguns grupos de bactérias Gram-positivas, notadamente as do gênero do *Bacillus*, que confere a estas a habilidade de resistirem a condições adversas (FREITAS; VILDOSO, 2004; ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019; TAN; RAMAMURTHI, 2013). Os endósporos protegem uma cópia do material genético da bactéria e alguns ribossomos dentro do citoplasma desidratado de uma pequena célula que também é protegida por uma grossa parede de peptidoglicanos (denomina córtex) e por múltiplas camadas de proteínas, compondo a capa do endósporo (TAN; RAMAMURTHI, 2013; LECCA et al., 2016; HIGGINS; DWORKIN, 2012). Tal configuração cria uma grossa barreira que protege os endósporos das adversidades do meio externo ao mesmo tempo em que o citoplasma desidratado mantém praticamente nula a atividade metabólica dos endósporos e protege o material genético da bactéria de danos. Dessa forma, os endósporos podem permanecer viáveis por anos no ambiente aguardando condições ambientais favoráveis a germinação da célula e consequente retorno desta ao seu estado metabólico ativo (TAN; RAMAMURTHI, 2013; LECCA et al., 2016; HIGGINS; DWORKIN, 2012).

Todo esse processo, da montagem dos endósporos até a germinação do mesmo, é regulado por dezenas de genes diferentes, cuja expressão é estritamente regulada para montagem ordenada do endósporo em um complexo processo que ocorre tanto dentro do pré-esporo em formação quanto fora dele, pela célula mãe. Além disso, sendo a esporulação um processo com alto custo metabólico, que uma vez iniciado não pode mais ser revertido até sua completa finalização, também existe uma complexa rede regulatória responsável por garantir que a decisão pela esporulação somente ocorra quando estritamente necessário (TAN; RAMAMURTHI, 2013; LECCA et al., 2016;

HIGGINS; DWORKIN, 2012; HOON; EICHENBERGER; VITKUP, 2010). Dessa forma, toda a regulação da esporulação também está ligada a vários outros processos celulares relacionados a sobrevivência em condições adversas, como a produção de biofilme, competência celular e liberação de enzimas extracelulares para digestão de outras bactérias ao redor (HIGGINS; DWORKIN, 2012; TAN; RAMAMURTHI, 2013; HOON; EICHENBERGER; VITKUP, 2010).

Apesar dessa complexa regulação alguns genes desempenham um papel mais central na regulação da montagem do endósporo, atuando quase que como uma espinha dorsal na regulação do processo de montagem. Iniciando pelo processo decisório da esporulação histidinas quinases (sendo KinA e KinB as mais comuns) monitoram as condições ambientais. Uma vez ativadas estas se autofosforilam e em seguida iniciam uma cascata de fosforilações que vai culminar na fosforilação e ativação do regulador central da esporulação Spo0A, que uma vez fosforilado passa a se ligar ao DNA da bactéria estimulando ou reprimindo a expressão de dezenas de genes diferentes. Mais especificamente KinA ou KinB fosforilam a fosfotransferase Spo0F, que por sua vez fosforila a fosfotransferase Spo0B que por sua vez fosforila Spo0A. Tal cascata de fosforilações permite a célula um controle fino do processo, dado que cada uma das etapas do mesmo pode ser revertida através de fosfatases específicas (incluindo a fosforilação de Spo0A) o que garante que os níveis celulares de Spo0A fosforizado (Spo0A~P) permaneçam baixos enquanto as condições ambientais permitirem a sobrevivência e a reprodução da célula. Uma vez que as condições ambientais piorem os níveis de Spo0A~P no citoplasma celular aumentam ativando mecanismos para tolerância a condições adversas (tais como biofilme, canibalismo e competência celular) e uma vez que os níveis de Spo0A~P se tornem altos o suficiente é iniciado o processo de esporulação. Nesse ponto a expressão do fator sigma σ^H começa a regular um processo de divisão celular assimétrica que resulta na formação de uma pequena célula em um dos polos que em seguida é engolfada pela célula maior, formando um compartimento celular dentro da mesma, denominado de forespore ou pré-esporo, com a célula maior sendo denominada célula mãe. A partir da divisão assimétrica o processo de esporulação se torna irreversível de tal forma que mutações deletérias em genes que atuem após essa etapa resultam ou em morte celular ou em formação de endósporos inviáveis (HIGGINS; DWORKIN, 2012; TAN; RAMAMURTHI, 2013). Após a formação do pré-esporo o fator sigma σ^F , expresso dentro do pré-esporo, inicia-se a expressão das proteínas que vão iniciar a montagem interna do endósporo ao mesmo tempo que também expressa proteínas responsáveis por criar uma comunicação entre os dois compartimentos celulares de tal forma que após uma determinada etapa da montagem passa a ser ativado o fator sigma σ^E na célula mãe que dará continuidade expressão dos genes para montagem externa no endósporo. Ao mesmo tempo σ^E também estimula a expressão de proteínas para montagem de canais de comunicação entre a célula mãe e o pré-esporo que por sua vez permite a transmissão de sinal para ativação do fator sigma σ^G no pré-esporo. Uma vez ativado σ^G começa a regular a expressão dos genes para finalização da montagem interna do endósporo, tais como os das proteínas sensoras para germinação, das pequenas proteínas solúveis em ácido (responsáveis por proteger o DNA no citoplasma desidratado), da síntese de ácido dipicolínico (DPA) e do bombeamento de cálcio para o citoplasma do pré-esporo (que junto com o DPA forma o quelato Ca-DPA responsável por desidratar o citoplasma do endósporo). Ao mesmo tempo σ^G também estimula a expressão de proteínas que vão ativar o fator sigma σ^K na célula mãe, responsável pela finalização da montagem externa do endósporo estimulando a síntese de proteínas que vão compor as camadas da capa do endósporo e de proteínas censoras para germinação do mesmo. Uma vez finalizado esse processo a célula mãe inicia um processo de lise liberando o endósporo já formado no ambiente (HIGGINS; DWORKIN, 2012; TAN; RAMAMURTHI, 2013). O resumo desse processo central de regulação da formação dos endósporos foi esquematizado na figura 34, abaixo.

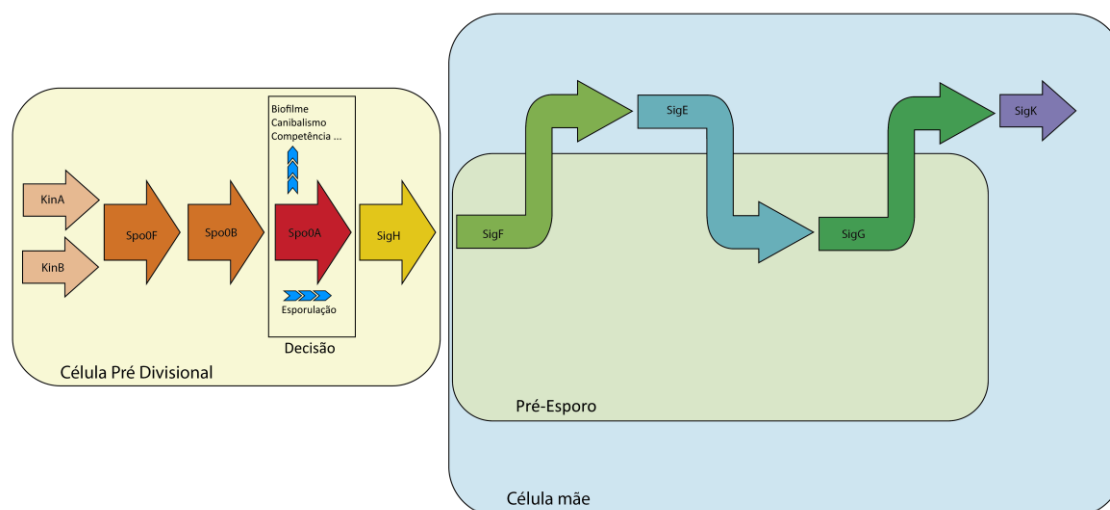


Figura 34. Esquematização da espinha dorsal da cascata regulatória durante a formação dos endósporos em *Bacillus*.

Vários são os estudos avaliando o efeito do nocaute de genes relacionados esporulação, tanto dessa espinha dorsal regulatória, quanto de outros genes relacionados ao processo (Apêndice A). Tais estudos apresentam diferentes objetivos, desde a descoberta de novos genes relacionados ao processo (MEESKE et al., 2016; SHI et al., 2020) até a manipulação da bactéria para otimização de processos industriais a utilizando (ZHANG; DUAN; WU, 2016; ZHANG et al., 2022; ZHOU et al., 2019; SAMBROOK; RUSSELL, 2006). Neste último caso observe-se um consenso de que a esporulação é um processo indesejado para esse tipo de aplicação, dado a quase ausência de atividade metabólica neste estado, sendo o nocaute de genes chaves da esporulação uma solução para obtenção de linhagens deficientes a esse processo.

Entretanto mesmo que o nocaute de um único gene chave para a esporulação já possa produzir linhagens com drástica redução na produção de endósporos existem alguns problemas teóricos quanto a escolha dos genes para nocaute ao se tentar construir uma linhagem não esporulante. A esporulação é um processo metabolicamente bastante custoso e que a partir de certo ponto do processo não pode mais ser revertido. Nessa perspectiva, o processo de esporulação pode ser dividido em duas etapas, a etapa decisória e a etapa de execução onde na primeira a célula avalia as condições ambientais a fim de decidir ou não se inicia o processo e no segundo ocorre a execução em via de mão única da montagem do endósporo. Idealmente um nocaute que vise obter uma linhagem não esporulante se voltaria para os genes chave da etapa decisória, evitando o início da etapa de execução, fazendo com que a célula permaneça vegetativa, metabolicamente ativa e insensível as condições ambientais. Entretanto como essa etapa decisória também atua regulando outros processos do metabolismo celular o nocaute de genes dessa etapa também pode levar a alterações indesejadas no metabolismo e redução do *fitness* da bactéria. Dessa forma nocautes que visem afetar somente a esporulação acabam ficando quase que restritos a genes essenciais da etapa de execução, como os realizados por (ZHANG; DUAN; WU, 2016; ZHANG et al., 2022; ZHOU et al., 2019; SAMBROOK; RUSSELL, 2006). O que por sua vez não necessariamente impede que as células iniciem o processo de esporulação, mas faz com que as que iniciem acabem morrendo por não conseguirem completar esse processo.

Nessa perspectiva o presente trabalho optou pela escolha de dois genes para realização do nocaute, um pertencente a etapa decisória e outro a de execução, de forma a poder obter linhagens complementares entre si quanto a deficiência na esporulação para posterior estudo da interferência desse processo na interação bactéria planta.

Entre os genes da etapa decisória Shemesh e Chai (2013) apontam uma drástica alteração na forma de crescimento das colônias e na formação de biofilme para linhagens $\Delta spo0F$, $\Delta spo0B$ e $\Delta spo0A$ em *B. subtilis*. Em contrapartida as linhagens $\Delta kinA$ e $\Delta kinB$ apresentaram poucas alterações na forma das colônias e na formação de biofilme indicando um possível menor impacto do nocaute dessas quinases no restante do metabolismo celular. Um resultado similar também foi observado por Grau et al. (2015) utilizando *B. subtilis*, onde as linhagens $\Delta spo0F$, $\Delta kinB$ e $\Delta spo0A$ apresentaram uma grande redução na sua velocidade de espalhamento em placa, em contrapartidas as linhagens $\Delta kinA$ e $\Delta sigF$ não apresentaram essas alterações. Além disso, analisando o efeito dos nocautes das diferentes histidinas quinases de *B. subtilis* na sua motilidade, produção de biofilme e esporulação os autores apontaram a histidina quinase KinA como sendo mais relacionada a esporulação em detrimento aos demais processos. Em consonância a esse resultado Tojo, Hirooka e Fujita (2013) observaram uma redução de 88,9% na formação de endósporos com o nocaute de *kinA*, em detrimento de uma redução de 69,0% com o nocaute de *kinB*. Esse maior impacto na esporulação também é apontado por Jiang et al. (2000) que categoriza *kinA* como a principal histidina quinase para esporulação em *B. subtilis*, atribuindo uma redução de 95% na esporulação com o nocaute desse gene. Ao mesmo tempo também indica que a substituição dos domínios sensores de *kinB* pelos de *kinA* restaura completamente a capacidade de esporulação de *B. subtilis*, apontando que essa maior importância de *kinA* para a esporulação possa estar mais relacionado ao tipo de estímulo à esporulação presente nas culturas de laboratório do que a uma maior importância desse gene em si. Hipótese essa que acaba sendo corroborada pelos resultados de Liu et al. (2018) onde o meio de cultura alterou o impacto dos nocautes de *kinA* e *kinB* para a esporulação, com o nocaute de *kinB* apresentando um maior impacto em um dos meios avaliados.

Já entre os genes da etapa de execução, destaca-se o gene *sigF*, sendo inclusive referenciado o nocaute desse gene como o padrão para obtenção de linhagens não esporulantes (dado que o mesmo impede completamente a formação de endósporos pela bactéria) (SHI et al., 2020). O nocaute de *sigF* também é bastante avaliado em trabalhos que buscam melhorar linhagens de *Bacillus* para uso industrial, impedindo a formação de endósporos e, portanto, aumentando a eficiência dos processos de interesse (ZHANG et al., 2022; ZHOU et al., 2019; SAMBROOK; RUSSELL, 2006). Por exemplo, Zhou et al. (2019) chegaram a observar incrementos de até 19% na produção de proteases da linhagem $\Delta sigF$ em relação a selvagem não nocauteada, ao mesmo tempo que tanto as linhagens $\Delta sigF$ e $\Delta sigE$ não apresentaram nenhuma formação de endósporo detectável. Em contrapartida os mesmos autores também observaram uma massiva morte celular nas linhagens $\Delta sigF$ e $\Delta sigE$ após o tempo de crescimento em que a linhagem selvagem normalmente estaria esporulada (com a redução da quantidade de células viáveis chegando a ordem de 10^3 a 10^4 vezes). Tal queda da viabilidade evidencia o problema já citado da não reversibilidade do processo de esporulação de tal forma que nesse exemplo citado o nocaute de *sigF* e *sigE* não impediu o início do mesmo, só o impediu de se completar. Esse último ponto fica ainda mais evidenciado pela observação de células com duplas divisões assimétricas para a linhagem $\Delta sigF$. Fenótipo esse característico dos nocautes de *sigF* e que é resultante do não prosseguimento da esporulação. Fazendo com que a célula faça uma segunda divisão assimétrica no polo oposto como uma tentativa de forçar a continuidade do processo de formação de endósporos, mas que em função da não presença de um fator sigma σ^F funcional acaba ficando permanentemente travado nessa etapa até a inevitável morte da célula (HIGGINS; DWORKIN, 2012; TAN; RAMAMURTHI, 2013).

Ainda considerando os genes chave para a esporulação em *Bacillus* já citados uma busca na anotação do genoma da linhagem RZ2MS9 de *Bacillus thuringiensis* (GenBank: CP049978.1) revelou que todos eles estão presentes nessa linhagem e, à exceção de *kinB*, todos tem uma única cópia no genoma (tabela 34). Visando a obtenção dos mutantes para esporulação observa-se na literatura que para a etapa de decisão os dois melhores candidatos seriam as

histidinas quinase *kinA* e *kinB* com *kinA* se apresentando como mais promissor em função de seu maior impacto na esporulação. Soma-se a isso a presença de duas cópias de *kinB* no RZ2MS9 e faz-se a opção de *kinA* para o nocaute. Já para a etapa de execução a literatura se concentra bastante no fator sigma *sigF*, sendo o nocaute deste considerado um padrão para linhagens não esporulantes. Isso somado a presença de um fenótipo definido para os nocautes de *sigF* justificam a opção por esse gene para o segundo nocaute pretendido.

Tabela 34. Ocorrência dos principais genes de esporulação no *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9

Gene	GenBank	Nº de cópias
<i>kinA</i>	WP_030027183.1	1
<i>kinB</i>	WP_000964152.1 WP_000420369.1	2
<i>spo0F</i>	WP_000398594.1	1
<i>spo0B</i>	WP_001003584.1	1
<i>spo0A</i>	WP_021727703.1	1
<i>sigH</i>	WP_000387193.1	1
<i>sigF</i>	WP_000350728.1	1
<i>sigE</i>	WP_000976948.1	1
<i>sigG</i>	WP_000197755.1	1
<i>sigK</i>	WP_000051382.1	1

Já com relação ao nocaute observa-se que grande parte dos trabalhos envolvendo nocaute de genes de esporulação em *Bacillus* é realizado por meio da técnica de recombinação homologa (anexo 1), onde uma sequência com regiões homologas ao alvo, mas contendo em seu interior um gene marcador de resistência a antibiótico, se integra no alvo impedindo o funcionamento correto do mesmo (e por consequência realizando o nocaute) (SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021). Esta técnica apresenta muitos desafios, como a baixa eficiência, instabilidade das linhagens mutantes, a polaridade do gene alvo, limitações quanto aos antibióticos disponíveis para seleção e a presença de cicatrizes e marcas não desejadas no local da mutação (SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021). Em contrapartida a indução de nocautes pela técnica de CRISPR-Cas9 permite a edição precisa e eficiente de um alvo no genoma, principalmente se comparados as metodologias anteriores para manipulação genética de organismos, representando uma verdadeira revolução nesse campo (SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021; BURBY; SIMMONS, 2017; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016).

O sistema CRISPR é originalmente um sistema de defesa adaptativo de microrganismos contra vírus. Onde pequenas sequências de DNA homologas aos vírus invasores são armazenadas de maneira regularmente espaçada, dando origem a sigla CRISPR cuja tradução live é repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas. Essas pequenas sequências homologas as sequências do material genético dos vírus alvo são denominadas protoespaçadores e são as responsáveis por guiar a enzima Cas até o alvo para clivagem. Nos sistemas CRISPR sintéticos esses protoespaçadores costumam ter 20 pb. e, portanto, costumam ser denominados como N₂₀. Nos sistemas naturais os diversos protoespaçadores são expressos juntos em uma única fita de RNA denominada de pré CRISPR RNA (Pré-crRNA). Essa fita é então clivada nas regiões palindrômicas, geralmente pela ação conjunta de uma RNase III e de um crRNA transativador (tracrRNA), produzindo um CRISPR RNA (crRNA). Esse mesmo tracrRNA também apresenta uma região homologa a uma das extremidades do crRNA permitindo a ligação entre os dois RNAs e formando uma estrutura com um grampo que é reconhecido pela enzima Cas e se liga nela para guiar o processo de clivagem. No caso da Cas9 (sistema CRISPR tipo II de *Streptococcus pyogenes*) essa clivagem é de DNA, onde a enzima primeiramente reconhece pequenas sequências NGG (denominadas de PAM), abre a fita de DNA e depois semeia o RNA guia avaliando a complementariedade de bases. Se as sequências forem complementares a Cas9 executa

o corte do DNA, o que em condições naturais leva a inativação do vírus invasor. Para sistema de edição sintéticos o crRNA e o tracrRNA são fusionados em um único RNA (denominado de sgRNA) a fim de simplificar o processo de montagem e evitar possíveis erros decorrentes das diferenças na maquinaria de processamento de RNA dos diferentes organismos. O sgRNA pode ainda ser mais simplificado removendo algumas sequências a fim de se manter somente o grampo de ligação a Cas9 e a sequência guia aumentando a eficiência de ligação a Cas9 e por consequência do processo de clivagem, produzindo um grRNA (SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021; ALTENBUCHNER, 2016; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016; LI, 2015).

Entretanto apesar do sistema CRISPR ter representado uma revolução ao criar uma espécie de tesoura de DNA guiada o corte da região alvo não significa por si só um nocaute. Uma vez clivado o DNA se este não for reparado ocorrerá a morte da célula, de tal forma que a ação da Cas9 pode apresentar um efeito tóxico a grande parte das células (ALTENBUCHNER, 2016; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016; ZHOU et al., 2019). O reparo do DNA pode ocorrer de duas formas. Através de mecanismos não homólogos onde as duas extremidades de DNA são simplesmente unidas uma à outra em um processo que frequentemente leva a perda ou alteração de algumas bases na região do corte. Ou por meio de mecanismos homólogos onde outra porção de DNA homóloga a clivada fornece um guia para as enzimas de reparo, frequentemente fazendo com que a região reparada se torne idêntica a porção de DNA que serviu de guia para o reparo (WIGLEY, 2012; CHATTERJEE; WALKER, 2017). Em bactérias os mecanismos de reparo não homólogos são muito pouco eficientes sendo frequente a necessidade de se fornecer um DNA guia para o mecanismo de reparo, denominado de cassete de DNA doador. Esse cassete frequentemente tem braços completamente homólogos as regiões adjacentes ao alvo de corte, mas modificações na região do corte de forma a induzir mutações específicas na região alvo (ALTENBUCHNER, 2016; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016; ZHOU et al., 2019).

Por sua vez a linhagem RZMS9 de *B. thuringiensis*, alvo das tentativas de nocaute para os genes de esporulação, é uma bactéria promotora do crescimento de plantas com grande potencial, já sendo a muito tempo estudado pela equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” da ESALQ-USP. Esse *Bacillus* isolado da rizosfera do guaranazeiro o (*Paullinia cupana*) apresentou consistente capacidade de promover o crescimento de plantas, atuando principalmente no sistema radicular destas em função da sua produção de fitormônios, em especial auxina (AIA) (BATISTA et al., 2018; FIGUEREDO et al., 2023; FIGUEREDO et al., 2023; BATISTA et al., 2021; ALMEIDA et al., 2021). Entretanto nenhum estudo até então avaliou como a capacidade de esporulação, intrínseca dos *Bacillus*, influencia na sua habilidade como promotor de crescimento de plantas, principalmente dado que seu principal mecanismo de ação (a produção de AIA) depender que a célula esteja ativa metabolicamente para ocorrer.

Nessa perspectiva este trabalho objetivou a construção de linhagens do RZ2MS9 deficientes na capacidade de esporulação, permitindo a observação de quanto essa capacidade influencia na sua interação com as plantas. Foram avaliados dois sistemas binários o pCas9-pCRISPR e o pCas-pTargetF, em ambos foi realizado a clonagem nos plasmídeos pCas9, pCRISPR e pTargetF dos protoespaçadores contendo os alvos de interesse para o nocaute CRISPR. Além disso foram montados com sucesso os cassetes de DNA doadores para o direcionamento do nocaute, e obtidas as linhagens carregando os plasmídeos para expressão da Cas9 (RZ2MS9::pCas9 e RZZ2MS9::pCas, sendo esta última construída por Figueredo et al. (2023) em estudos anteriores). A transformação da linhagem RZ2MS9 para nocaute da mesma foi realizada até suas etapas finais, entretanto em todas as cinco tentativas realizadas não foi possível observar nenhuma alteração nas regiões alvo para os nocautes de interesse. Sendo assim foi descrito a seguir as tentativas de

obtenção de linhagens do RZ2MS9 nocauteadas para os genes *kinA* e *sigF* sendo ao final discutido as possíveis causas das falhas na tentativa de nocaute.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Material biológico

As linhagens e temperaturas de crescimento utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 35. Todas essas linhagens foram crescidas a partir de estoque a -80°C em meio de cultura Luria Bertani (LB) (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

Tabela 35. Linhagens Bacterianas utilizadas

Linhagem	Plasmídeo Carregado	Temperatura de crescimento
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
<i>B. thuringiensis</i> RZ2MS9		28 °C
<i>B. thuringiensis</i> RZ2MS9::pCas	pCas	28 °C
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α		37 °C
<i>E. coli</i> DH5 α ::pCas	pCas	28 °C
<i>E. coli</i> DH5 α ::pTargetF	pTargetF	37 °C
<i>E. coli</i> DH5 α ::pCas9	pCas9	37 °C
<i>E. coli</i> DH5 α ::pCRISPR	pCRISPR	37 °C

A linhagem RZ2MS9::pCas foi construída em estudos anteriores com o RZ2MS9 (FIGUEREDO et al., 2023), as linhagens de *E. coli* DH5 α ::pCas e DH5 α ::pTargetF foram obtidas em estudos anteriores junto a Addgene (FIGUEREDO et al., 2023) e as linhagens DH5 α ::pCas9 e DH5 α ::pCRISPR foram também obtidas junto a Addgene para este trabalho.

Para o nocaute pelo sistema CRISPR-Cas9 foram utilizados dois pares de plasmídeos desenvolvidos para esse fim (JIANG et al., 2013; JIANG et al., 2015). O par pCas9 (Addgene Plasmid: #42876) e pCRISPR (Addgene Plasmid: #42875) e o par pCas (Addgene Plasmid: #62225) e pTargetF (Addgene Plasmid: #62226).

O plasmídeo pCas9 contém uma origem de replicação genérica do tipo p15A, gene de resistência a cloranfenicol, gene para síntese da enzima Cas9, tracrRNA, crRNA, sítios de restrição de *Bsal* para inserção da sequência do protoespaçadora referente ao alvo desejado, além de sítios de restrição diversos para outras enzimas de restrição.

O plasmídeo pCRISPR contém uma origem de replicação genérica do tipo pUC, gene de resistência a canamicina, crRNA e sítios de restrição de *Bsal* para inserção da sequência do protoespaçadora referente ao alvo desejado (sendo que esses dois últimos elementos se encontram duplicados no plasmídeo), além de sítios de restrição diversos para outras enzimas de restrição.

O plasmídeo pCas contém uma origem de replicação genérica do tipo pSC101, gene para síntese de uma versão termo-sensível da proteína RepA (necessária para a replicação do plasmídeo), gene para resistência a canamicina, genes do fago lambda para recombinação e reparo do DNA (Gam, Beta e Exo), promotor dependente de arabinose flanquado os genes do fago lambda, gene para síntese da enzima Cas9, tracrRNA, gRNA, gene para síntese de proteína reguladora em função da presença de arabinose, além de sítios de restrição diversos. Por fim o plasmídeo

pTargetF apresenta uma origem de replicação genérica do tipo pUC, sitio para clonagem do protoespaçador, gene de resistência a espectinomicina, gRNA e diversos sítios de restrição.

Além dos plasmídeos foram utilizados diversos primers tanto para a amplificação de sequências de interesse quanto para a clonagem dos protoespaçadores alvo para o nocaute (Apêndice C).

4.2.2. Antibiograma

Foram realizadas avaliações quanto a resistência do RZ2MS9 aos antibióticos cloranfenicol e espectinomicina. Para isso a bactéria foi crescida em meio LB overnight e depois espalhada em placas contendo os antibióticos a serem testados (Tabela 36). Especificamente para a espectinomicina também foi avaliado o crescimento da linhagem RZ2MS9 em meio líquido contendo este antibiótico, sendo para isso feito a inoculação da bactéria em tubo tipo Falcon de 50 ml contendo 5 ml de meio LB líquido com o antibiótico a uma densidade ótica inicial (OD_{600nm}) de 0,01. Para o crescimento tanto as placas quanto os Tubos tipo Falcon foram incubados a 28 °C, sendo que os tubos foram mantidos sob agitação a 180 rpm.

Tabela 36. Ensaios de resistência a antibiótico realizadas com o RZ2MS9

Antibiótico testado	Meio	Concentrações avaliadas	Período de avaliação
Cloranfenicol	LB Sólido	50 µg/ml	7 dias
Espectinomicina	LB Sólido	400, 500, 600, 700 e 800 µg/ml	4 dias
	LB Líquido	400, 500, 600, 700 e 800 µg/ml	3 dias

4.2.3. Sequenciamento de DNA

Todas as amostras de DNA para sequenciamento deste trabalho foram enviadas para o Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas do CENA-USP para sequenciamento Sanger.

4.2.4. Busca por sistemas anti-CRISPR na linhagem RZ2MS9

Para predição de possíveis sistemas anti-CRISPR no RZ2MS9 o genoma dessa linhagem foi submetido as bases de dados CRISPRimmunity (<http://www.microbiome-bigdata.com/CRISPRimmunity/index/home>) e AcrFinder (<https://bcbl.unl.edu/AcrFinder/>) (YI et al., 2020) para realização da predição.

4.2.5. Seleção dos protoespaçadores

As sequencias dos genes *kinA* e *sigF* da linhagem RZ2MS9 (juntamente com o genoma da mesma) foram submetidas as plataformas CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/>), CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) e CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) para seleção dos protoespaçadores alvo para os respectivos genes. Adicionalmente as sequencias desses genes também foram submetidos ao Pfam (<http://pfam.xfam.org/browse>) para anotação dos domínios funcionais das proteínas. Os resultados obtidos nas 3

plataformas para anotação de protoespaçadores alvo foram primeiramente analisados para exclusão de quaisquer protoespaçadores com alvo em outras partes do genoma (*off-targets*) e depois comparados entre si para obtenção de uma lista consenso de protoespaçadores. Após isso foram selecionados 2 protoespaçadores por gene (kinA1, kinA2, sigF1 e sigF2) dando prioridade para sequências com índices de eficiência predita mais altos, índices médios de %CG, que estivessem na porção média do gene e cuja deleção afetasse regiões de domínios funcionais da proteína. Foram desenhados tanto protoespaçadores com 20 bases a partir da sequência PAM (N₂₀) quanto com 30 bases (N₃₀), este último obtido adicionando-se mais 10 bases à porção 5' do respectivo N₂₀. As sequências N₃₀ foram utilizadas para clonagem nos plasmídeos pCas9 e pCRISPR, conforme recomendação dos autores (JIANG et al., 2013).

4.2.6. Construção dos plasmídeos carregando os protoespaçadores

4.2.6.1. Obtenção das células competentes de *E. coli* e dos plasmídeos pCas9, pCRISPR e pTarget

Para obtenção dos plasmídeos estes foram extraídos das linhagens de *E. coli* DH5 α que os armazenavam utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante.

Para obtenção de células eletrocompetentes de *E. coli* para a transformação com os plasmídeos construídos a linhagem DH5 α foi inoculada em Erlenmeyers de 500 ml contendo 250 ml de meio SOB (20 g/l tripton, 5 g/l extrato de levedura e 0,5 g/l de NaCl) a uma densidade óptica inicial (OD_{600nm}) de 0,1. As bactérias foram incubadas a 37 °C e agitação de 180 rpm até atingirem OD_{600nm} entre 0,6 e 0,8. Após, as bactérias foram resfriadas até 4 °C e centrifugadas a 4000 rpm por 10 min para separação das células do meio de cultura. As células peletizadas foram ressuspensas com água miliQ e em seguida novamente centrifugadas a 4000 rpm por 10 min para lavagem dos sais, sendo esse processo repetido 2 vezes. Após a centrifugação final o pellet de células foi ressuspendido em solução de glicerol 10 %, centrifugado a 4000 rpm, 4 °C por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet restante foi ressuspendido no restante de solução de glicerol que não foi descartado. A suspensão de células eletrocompetentes resultante foi separada em alíquotas de 50 μ l e armazenada a -80 °C para posterior uso nas transformações por eletroporação.

4.2.6.2. Clonagem de protoespaçadores nos plasmídeos pCas9, pCRISPR e pTarget

A clonagem dos protoespaçadores no pCas9 e no pCRISPR foi realizada seguindo os protocolos descritos por (JIANG et al., 2013) para clonagem utilizando enzimas de restrição do tipo IIS (*BsaI*), similar ao método de Golden Gate, mas com algumas adaptações. As sequências N₃₀, para clonagem no pCas9 e pCRISPR, e N₂₀, para clonagem no pCRISPR, foram sintetizadas em oligonucleotídeos com adaptadores para ligação no plasmídeo (Figura 35). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Exxtend® tanto a sequência N₃₀ (ou N₂₀) quanto o seu complemento para montagem de sequência fita dupla e posterior ligação ao plasmídeo.

A clonagem dos protoespaçadores no pTargetF foi realizada pelo método de *Gap repair* (JACOBUS; GROSS, 2015), sendo desenhado primers para amplificação de partes do plasmídeo e anexação dos N₂₀ aos fragmentos. Posteriormente essas partes serão transformados em DH5 α para recombinação das mesmas e montagem do plasmídeo completo (Figura 36).

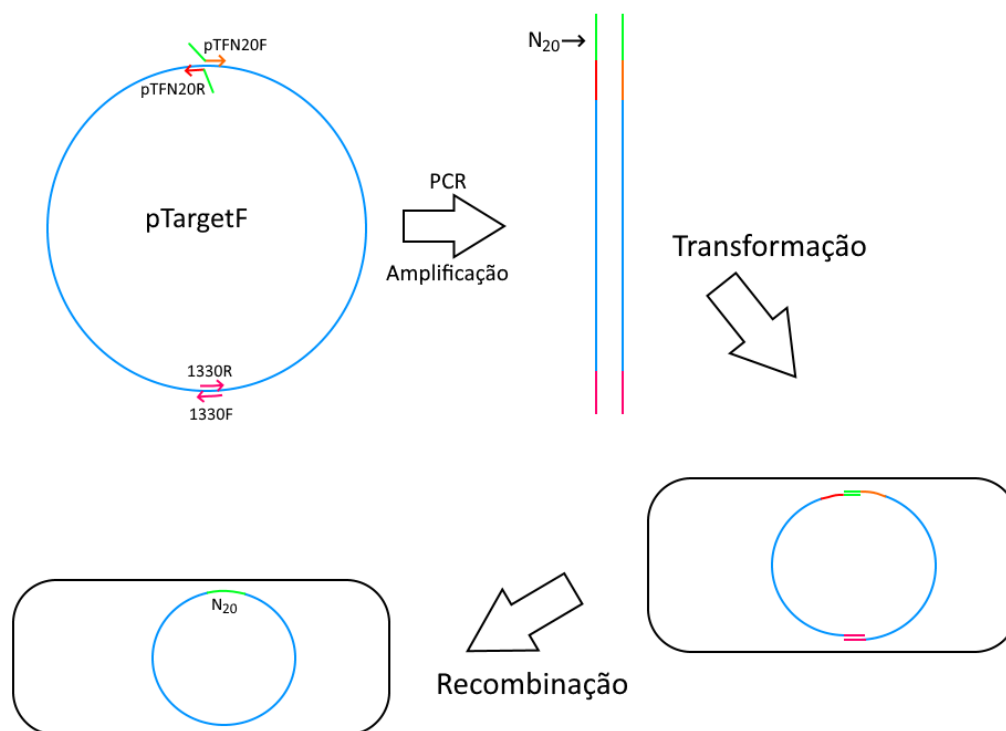


Figura 36. Processo de clonagem dos protoespaçadores no pTargetF por *Gap repair*.

Para amplificação dos fragmentos foram utilizados *primers* contendo os N₂₀ anexados (primers pTF N20). Estes foram desenhados para que o N₂₀ seja inserido entre o promotor J23119 e a sequência do gRNA presente no pTargetF, substituindo a sequência de 20 pb original do plasmídeo pelo alvo desejado para o sistema CRISPR-Cas9. Para amplificação das partes do plasmídeo foram utilizadas as combinações pTF N20F e 1330R para amplificação da parte 1 e pTF N20R e 1330F para amplificação da parte 2. A descrição das sequências de primers utilizados pode ser encontrada Apêndice C. As PCRs de amplificação foram realizadas utilizando a Taq Phusion High Fidelity (NEB®) (10 μ l do 5x Phusion HF Buffer, 0,2 mM de DNTPs, 0,5 μ M de cada primer, 1,5 μ l de DMSO, 0,5 μ l da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 10 ng de DNA e água miliQ para completar o volume de 50 μ l) com uma etapa inicial de desnaturação a 98 °C por 30 seg, 35 ciclos com desnaturação a 98 °C por 5 seg, anelamento a 60 °C por 30 seg e amplificação a 72 °C por 30 seg e por fim 5 min de amplificação final a 72 °C.

Os produtos da PCR de amplificação foram submetidos a digestão com *DpnI*. Para a reação de digestão com a *DpnI* foram utilizados 2 ng de produto de PCR, 2 μ l de *DpnI* (NEB®), 5 μ l de 10X NEBuffer e água miliQ para completar o volume final de 50 μ l. O produto dessa digestão foi então purificado com o uso do Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva®) seguindo as instruções do fabricante.

As partes do plasmídeo purificadas foram então utilizadas para transformação de células de DH5 α eletrocompetentes, sendo utilizado para transformação 100 ng de cada parte do seu respectivo par. A transformação foi realizada em cubetas de 0,2 cm utilizando uma voltagem de 2,5 kV em pulso único em eletroporador modelo

MicroPulser Electroporator (BIO-RAD®). Após a eletroporação adicionou-se 1 ml de meio LB as células e incubou-se a suspensão resultante a 37 °C por 1 h sob agitação de 180 rpm. Após esse período, a suspensão de células foi plaqueada em meio LB contendo 100 µg/ml de espectinomicina para seleção das células transformadas com o plasmídeo. As placas com LB foram incubadas a 37 °C por 24 h para crescimento das colônias.

As colônias crescidas foram repicadas novamente em meio LB contendo 100 µg/ml de espectinomicina e uma porção das células crescidas foi submetida a PCR de colônia para amplificação da porção onde foi inserida o N₂₀ a fim de se selecionar as colônias contendo os plasmídeos corretamente montados. A PCR de colônia foi realizada utilizando a Platus Taq DNA Polymerase (Sinapse®), as células coletadas em cada colônia foram misturadas em água miliQ da qual se tirou 1 µl como template da reação de PCR. A reação de PCR foi montada utilizando 5 µl 10x Buffer, 1 µl dNTPs a 10 mM, 1 µl primer pTargetN20 Forward a 10 mM, 1 µl primer pTargetN20 Reverse a 10 mM, 0,6µl Platus Taq DNA Polymerase, 7 µl Solução de MgCl₂ 25 mM, 1 µl da suspensão de célula de *E. coli* e 33,4 µl de água miliQ. A reação foi feita com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por 1 min e amplificação a 72 °C por 1 min e por fim 10 min de amplificação final a 72 °C. Os produtos dessa PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva®) e os produtos da purificação foram enviados para sequenciamento para avaliação da montagem dos plasmídeos.

Adicionalmente também realizado o sequenciamento completo dos plasmídeos pTargetF, sendo utilizados os primers 1330F, pTargetN20 Forward, pTargetAssy1 Forward e pTargetAssy2 Forward. Os plasmídeos foram extraídos da *E. coli* utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante.

4.2.7. Construção dos cassetes de DNAs doadores para a edição sítio dirigida

A construção dos cassetes de DNAs doadores foi realizada desenhando-se primers que amplificaram as regiões *upstream* e *downstream* dos genes alvo de tal forma a também adicionar pontas complementares entre si nos dois fragmentos amplificados. Tal complementariedade permite a junção dos dois fragmentos em um único fragmento da sequência do gene contendo uma deleção de sua porção mediana que foi utilizado como cassete doador nas transformações pra Nocaute dos genes de esporulação da linhagem RZ2MS9. Na figura 37, abaixo, foi ilustrado o processo de montagem dos cassetes. A seleção da região a ser deletada e consequente desenho dos primers para montagem dos cassetes foram feitas se atentando a anotação de domínios funcionais feita pelo Pfam, sendo os cassetes desenhados para deleção de grandes porções dos domínios funcionais do alvo.

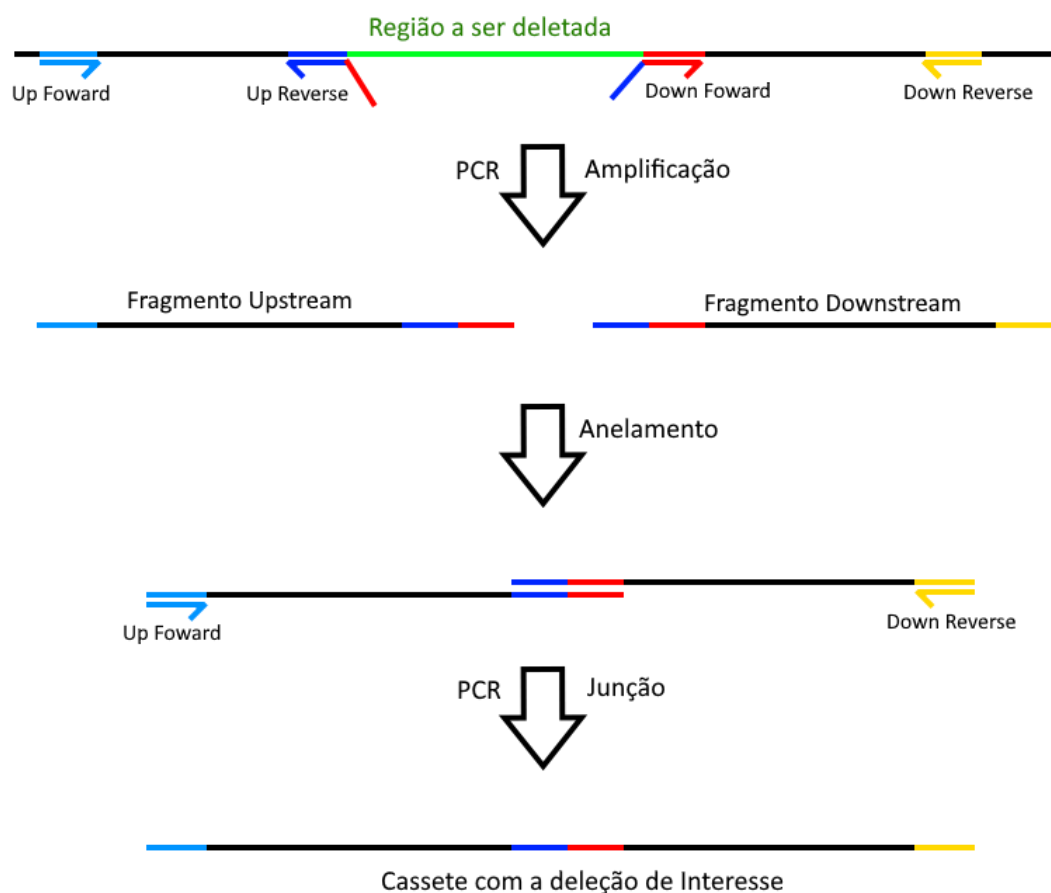


Figura 37. Processo de montagem dos Cassetes de DNA doadores

As reações de PCR para montagem dos Cassetes foram montadas utilizando 5 μ l 10x Taq Buffer (Sigma®), 1 μ l dNTPs a 10mM, 1 μ l primer Forward a 10mM, 1 μ l primer reverse a 10mM, 0,6 μ l Taq DNA Polymerase (Sigma®), 7 μ l Solução de MgCl₂ 25mM, 2 μ l de template de DNA e 32,4 μ l de água miliQ. A reação foi feita com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3min, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30seg, anelamento a 60°C por 1min e amplificação a 72°C por 1min e por fim 10min de amplificação final a 72°C. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva®).

A primeira rodada de amplificações foi realizada utilizando os respectivos primers Foward e Reverse para amplificação dos fragmentos Upstream e Downstream dos genes alvos, sendo utilizado o DNA extraído da linhagem RZ2MS9 como template da reação. O DNA do RZ2MS9 foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. Já para a segunda rodada de amplificação por PCR os respectivos pares de fragmentos Upstream e Downstream foram diluídos para a concentração padronizada de 25ng/ μ l e adicionados 1 μ l de cada como template de DNA da reação. Além disso a reação foi iniciada sem a adição dos primers para o anelamento dos fragmentos nos ciclos iniciais da reação. Após o terceiro ciclo de amplificação a reação foi passada e foram adicionados a reação os respectivos primers Up Foward e Down Reverse para amplificação do fragmento completo e a reação prosseguiu até o final sem mais interrupções.

Após cada PCR realizada as amostras foram corridas em gel de agarose 1 % a 2,3 V/cm para verificação dos resultados das PCRs. Uma vez obtido o cassete montado este foi armazenado a -20 °C e usado como template de amplificação (Utilizando os respectivos primers Up Foward e Down Reverse para o cassete) para a produção de mais

cassetes para as tentativas de nocaute, reduzindo o trabalho para produção do cassete. Os cassetes produzidos também foram sequenciados para confirmação da sua sequência e verificação de sua correta montagem. Na tabela 37, abaixo, foram descritos os pares de primers utilizados para a montagem dos cassetes utilizados neste trabalho. Adicionalmente também foi desenhado um cassete sintético de *sigF* de 200pb. (Apêndice B) para a realização dos nocautes, sendo colocado neste um sítio de corte para BamHI como uma marca para facilitar a identificação e seleção dos mutantes.

Tabela 37. Tabela 6: Lista de cassetes doadores montados para as tentativas de nocaute do RZ2MS9

Cassete	Tamanho (pb.)	Deleção (pb.)	Fragmentos	Primes
Cassete kinA-1	337	832	Fragmento Upstream	<u>KinA O UP F</u> <u>KinA O UP R</u>
			Fragmento Downstream	<u>KinA O DOWN F</u> <u>KinA O DOWN R</u>
Cassete kinA-2	643	832	Fragmento Upstream	<u>KinA_1_F</u> <u>KinA O UP R</u>
			Fragmento Downstream	<u>KinA O DOWN F</u> <u>KinA_1_R</u>
Cassete kinA-3	380	420	Fragmento Upstream	<u>KinA O 2 UP F</u> <u>KinA O 2 UP R</u>
			Fragmento Downstream	<u>KinA O 2 DOWN F</u> <u>KinA O 2 DOWN R</u>
Cassete kinA-4	1055	420	Fragmento Upstream	<u>KinA_1_F</u> <u>KinA O 2 UP R</u>
			Fragmento Downstream	<u>KinA O 2 DOWN F</u> <u>KinA_1_R</u>
Cassete sigF-4	320	451	Fragmento Upstream	<u>SigF O-2 UP F</u> <u>SigF O-2 UP R</u>
			Fragmento Downstream	<u>SigF O-2 DOWN F</u> <u>SigF O-2 DOWN R</u>
Cassete SigF D1	200	367	Cassete sintético	

4.2.8. Avaliação do fenótipo de esporulação

Para avaliação do fenótipo de esporulação da linhagem RZ2MS9, a mesma foi cultivada em tubos do tipo Falcons de 50 ml contendo 5 ml de meio GM 200 (5 g/l Triptona, 5 g/l extrato de levedura, 2 g/l glicose, 1,2 g/l NaCl, 6,8 mg/l ZnCl₂, 101,6 mg/l MgCl₂.6H₂O, 1,96 mg/l MnCl₂.6H₂O, 29,4 mg/l CaCl₂.2H₂O, 13,5 mg/l FeCl₃.6H₂O e 10 µl/l HCl 32 %. pH 6,8) a 28 °C e 180 rpm de rotação durante 72 h. Após esse período o estado das células foi avaliado tanto por coloração com azul de Coomassie (conforme descrito por (MARTINS, 2016)) quanto por observação direta por microscopia de contraste de fase. A avaliação do fenótipo foi realizada nas tentativas 1 e 5 de nocaute. Sendo que na 1ª tentativa realizou-se a avaliação por meio de coloração com azul de Coomassie e na 5ª foi avaliado o fenótipo dos transformantes por meio de microscopia de contraste de fase.

Para avaliação por coloração com azul de Coomassie um esfregaço da suspensão de células foi fixado através de calor em uma lâmina de microscópio. Após isso foi adicionado sobre a lâmina uma solução de azul Coomassie (0,25 % de azul de Coomassie, 50 % de etanol e 7 % de ácido acético) por 30 seg antes de ser lavada com água. As lâminas foram então secas e analisadas em microscópio ótico. Já para a observação direta uma alíquota de 2µl da suspensão de

células é adicionada sobre a lâmina e coberta por uma lamínula para ser observada em um microscópio de contraste de fase.

4.2.9. Tentativas e nocaute dos genes de esporulação

4.2.9.1. Células eletrocompetentes da linhagem RZ2MS9

A obtenção de células competentes da linhagem RZ2MS9 foi realizada seguindo o protocolo descrito por (SCHURTER; GEISER; MATH, 1989) com algumas modificações. A linhagem RZ2MS9 foi inoculada em Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio LB suplementado com 0,1 ml de glicina 10% (a partir de um pré-inóculo também crescido em LB suplementado com glicina) para uma OD_{550nm} de 0,01. A bactéria foi então incubada a 28°C a 200 rpm até atingir a OD_{550nm} de 0,2 (+0,05). Após, o meio com as células foi resfriado a 4°C por 10 minutos antes de ser submetido a centrifugação (12.000 g a 4°C por 4 min) para separação das células do meio de cultura. O pellet de células obtido foi ressuscitado em 5 ml de buffer de eletroporação (400 mM sacarose, 1 mM MgCl₂ e 1 mM KH₂PO₄) e em seguida novamente centrifugado nas mesmas condições para lavagem das células. Essa lavagem foi repetida 2 vezes e ao final da 2ª vez o pellet foi novamente ressuscitado em 5 ml de buffer de eletroporação e a suspensão de células foi aliquotada em 0,8 ml para uso imediato nas transformações.

4.2.9.2. Verificação da transformação

Para verificação da transformação da linhagem RZ2MS9, foram realizados PCRs de colônia nas colônias recuperadas das placas de seleção com antibiótico. Para tal as colônias foram repicadas em novas placas, mantendo os antibióticos da sua respectiva seleção, e uma porção das células foi misturada em água miliQ para obtenção da suspensão de células utilizada na PCR de colônia.

As reações de PCR foram montadas utilizando 5 µl 10x Taq Buffer (Sigma®), 1 µl dNTPs a 10 mM, 1 µl primer Forward a 10 mM, 1 µl primer reverse a 10 mM, 0,6 µl Taq DNA Polymerase (Sigma®), 7 µl Solução de MgCl₂ 25 mM, 1 µl da suspensão de células como template de DNA e 33,4 µl de água miliQ. A reação foi feita com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5min, 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por 1min e amplificação a 72°C por 1 min e por fim 10 min de amplificação final a 72 °C. foram utilizados para verificação da presença dos plasmídeos pCRISPR, pCas9, pTargetF e pCas respectivamente os pares de primers pCRISPRdt2-F e pCRISPRdt2-R, Pcas9dt-F e Pcas9dt-R, pTargetN20 Forward e pTargetN20 Reverse e os pares pCasF-pCasR. Por sua vez para avaliação dos nocautes foram usados os pares de primer KinA_F_1 e KinA_R_1 e o par SigF_F_1 e SigF_R_1 respectivamente para avaliação dos genes *kinA* e *sigF*. A sequência dos primers foi descrita no Apêndice D.

4.2.9.3. Construção das linhagens RZ2MS9::pCas9, RZ2MS9::pCRISPR e RZ2MS9::pCas9-pCRISPR

Para construção das linhagens RZ2MS9::pCas9, RZ2MS9::pCRISPR e RZ2MS9::pCas9-pCRISPR foram utilizados 40 ng do plasmídeo pCas9 e 30 ng do plasmídeo pCRISPR por transformação. Estes foram adicionados junto a suspensão de células eletrocompetentes do RZ2MS9 em cubetas de eletroporação de 0,2 cm. A suspensão de células foi então eletroporada utilizando um pulso único de 2,5 kV em eletroporador modelo *ECM 399 Electroporation System* (BTX®). Após a eletroporação foi adicionado 1ml de meio LB a suspensão de células que foi incubada a 28 °C e agitação de 180 rpm por 2 h. Após esse período a suspensão de células foi plaqueada em placas de LB contendo os respectivos antibióticos (tabela 8) para seleção das células transformadas com a plasmídeo. As placas foram avaliadas após 72 h para recuperação das colônias resistentes ao antibiótico cloranfenicol (25 µg/ml) para as transformações com o plasmídeo pCas9 e Canamicina (50 µg/ml) para as transformações com o plasmídeo pCRISPR. Adicionalmente foi realizado uma PCR de colônia para verificação da presença dos plasmídeos no RZ2MS9.

4.2.9.4. Tentativas de Nocaute dos genes de Esporulação

Foram realizadas 5 tentativas de nocaute dos genes de esporulação, cada qual utilizando combinações concentrações diferentes de plasmídeos e cassetes de DNA doador para transformação (Apêndice D). Nas três primeiras tentativas foi utilizado o par de plasmídeos pCa9-pCRISPR, sendo utilizado protoespaçadores com 30 (N₃₀) e 20 (N₂₀) bases. Nestas também foi realizada a dupla transformação, com os plasmídeos pCa9 e pCRISPR carregando os protoespaçadores alvo sendo transformados simultaneamente na linhagem selvagem. Adicionalmente também foi avaliado o efeito da adição de tetraciclina (2 µg/ml) nas placas de LB utilizadas na seleção dos transformantes a fim de se verificar se o promotor *tet* (sensível a tetraciclina) localizado logo após o crRNA nos plasmídeos, e no sentido oposto, apresentava alguma ação que poderia aumentar a eficiência do nocaute. Já nas duas últimas tentativas foi utilizado o par de plasmídeos pCas-pTargetF. Sendo feito um teste na 4° tentativa avaliando a transformação com e sem o uso de cassetes de DNAs doadores. A descrição completa das combinações e quantidades de material genético utilizados em cada transformação foram colocados no Apêndice D.

Para as transformações os plasmídeos e cassetes foram adicionados às suspensões de células competentes em cubetas de 0,2 cm a eletroporadas com pulso único de 2,5 kV em eletroporador modelo *ECM 399 Electroporation System* (BTX®) (1° a 4° tentativa) ou *MicroPulser Electroporator* (BIO-RAD®) (5° tentativa). Após, foi adicionado 1 mL de LB as células que foram incubadas a 28°C e agitação de 180 rpm por 2 h. A suspensão de células resultante foi plaqueada em placas de LB (0,1ml da suspensão de células por placa) contendo antibióticos para seleção dos transformantes (apêndice D). Os transformantes foram avaliados após 24h (5° tentativa) ou 72 h (1° a 4° tentativa) de incubação a 28 °C.

Nas 2° e 3° tentativa de nocaute foi também realizado o plaqueamento das células crescidas em meio líquido em placas controle sem antibiótico. Nessas mesmas tentativas após o período de incubação as placas com antibiótico foram lavadas com 1ml de solução PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄ e pH 7,4) e a suspensão de células obtidas foi novamente plaqueada em placas de LB sem antibiótico. Já colônias das placas controle foram repicadas e estriadas em placas com antibiótico para seleção e obtenção de colônias isoladas. As novas placas foram então incubadas por 72h e as colônias crescidas nas placas foram repicadas em placas de LB com os respectivos antibióticos para nova seleção.

As colônias crescidas nas placas foram repicadas e submetidas a PCR de colônia para detecção dos plasmídeos transformados (1°, 4° e 5° tentativas) e do nocaute dos genes de esporulação. Os produtos das PCRs foram purificados utilizando os kits GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare®) (1° a 4° tentativas) e Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) (5° tentativa), seguindo as instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento para avaliação do possível nocaute.

4.2.9.5. Avaliação dos plasmídeos pCas e pTargetF utilizados nas transformações com o RZ2MS9

Para avaliação dos plasmídeos pCas e pTargetF ambos foram enviados para sequenciamento. A extração do plasmídeo pCas foi realizada utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen®) realizando uma etapa prévia de digestão das células e após isso seguindo as instruções do fabricante. Essa etapa foi feita ressuspensando o pellet de células um tampão de lise (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA e 20 % Sacarose) juntamente com 10 mg/ml de lisozima (concentração final), e incubando a suspensão resultante a 55 °C por 20 min. Adicionalmente uma das amostras do RZ2MS9::pCas foi macerada utilizando nitrogênio líquido antes dessa digestão a fim de aumentar a eficiência da extração. Ao final, prosseguiu-se normalmente com as instruções do kit a partir da etapa 2, com a adição de 250 µL do Buffer P1. Os plasmídeos extraídos foram também submetidos a uma PCR para amplificação de um fragmento dos mesmos utilizando 5µl 10x Taq Buffer (Sigma®), 1µl dNTPs a 10 mM, 1µl primer pCasF a 10 mM, 1µl primer pCasR a 10 mM, 0,6 µl Taq DNA Polymerase (Sigma®), 7 µl Solução de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de template de DNA e 32,4 µl de água miliQ. A reação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min para PCR de colônia ou 3min para a PCR com DNA extraído, 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por 1min e amplificação a 72 °C por 1 min e por fim 10 min de amplificação final a 72 °C. Como controle positivo do processo também se realizou essa PCR no plasmídeo pCas extraído da *E. coli* DH5α onde estava estocado (extração também realizada com o kit QIAprep Spin Miniprep seguindo as intruções do fabricante). Todos os fragmentos de PCR do pCas obtidos foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) e posteriormente enviados para sequenciamento.

Adicionalmente realizou-se uma transformação do RZ2MS9 selvagem com os plasmídeos pTargetF contendo os N₂₀ a fim de se avaliar se estaria havendo alguma incompatibilidade dos plasmídeos durante a transformação no RZ2MS9. Para isso foram utilizados os plasmídeos pTargetF contendo os protoespaçadores N₂₀ kinA1, kinA2, sigF1 e sigF2 para transformação de células eletrocompetentes da linhagem RZ2MS9 selvagem (Apêndice D). As transformações foram realizadas de forma similar as do item 4.2.9.4, sendo utilizado o eletroporador modelo *MicroPulser Electroporator* (BIO-RAD®) para a eletroporação e o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) para purificação dos fragmentos de PCR.

4.2.10. Buscas complementares in sílico por genes de resistência a antibióticos no genoma do RZ2MS9

Foram realizadas buscas utilizando a ferramenta online BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para os genes smR (presente no plasmídeo pTargetF e que confere resistência a espectinomicina e a estreptomicina) e aadA (referenciado como o principal gene bacteriano de resistência a espectinomicina (HOLLINGSHEAD; VAPNEK, 1985)) no genoma do RZ2MS9.

Complementarmente foi realizado uma busca na anotação do genoma do RZ2MS9 depositada no NCBI (GenBank: CP049978.1, BioProject: PRJNA343080) por genes relacionados aos antibióticos cloranfenicol e espectinomicina e a bombas de efluxo de antibióticos.

4.3. Resultados

4.3.1. Antibiograma

Não foram observados crescimentos de colônias nas placas com cloranfenicol, sendo que alguns outros testes realizados com o RZ2MS9 indicaram que a concentração de 15 µg/ml de cloranfenicol já é eficiente em inibir completamente o crescimento dessa bactéria (dados não apresentados). Entretanto, para a espectinomicina as concentrações de antibióticos testadas somente conseguiram segurar o crescimento da bactéria em meio sólido nas primeiras 24 h. Após isso foram observadas o crescimento de colônias nas placas para todas as concentrações de antibióticos avaliadas (Figura 38). Dessa forma estabeleceu-se um tempo limite de 24 h para avaliação das placas contendo espectinomicina para o RZ2MS9. No meio líquido as concentrações de antibiótico acima de 600 µg/ml se mostraram eficientes em parar o crescimento da bactéria dentro das condições e tempo avaliados (tabela 38).

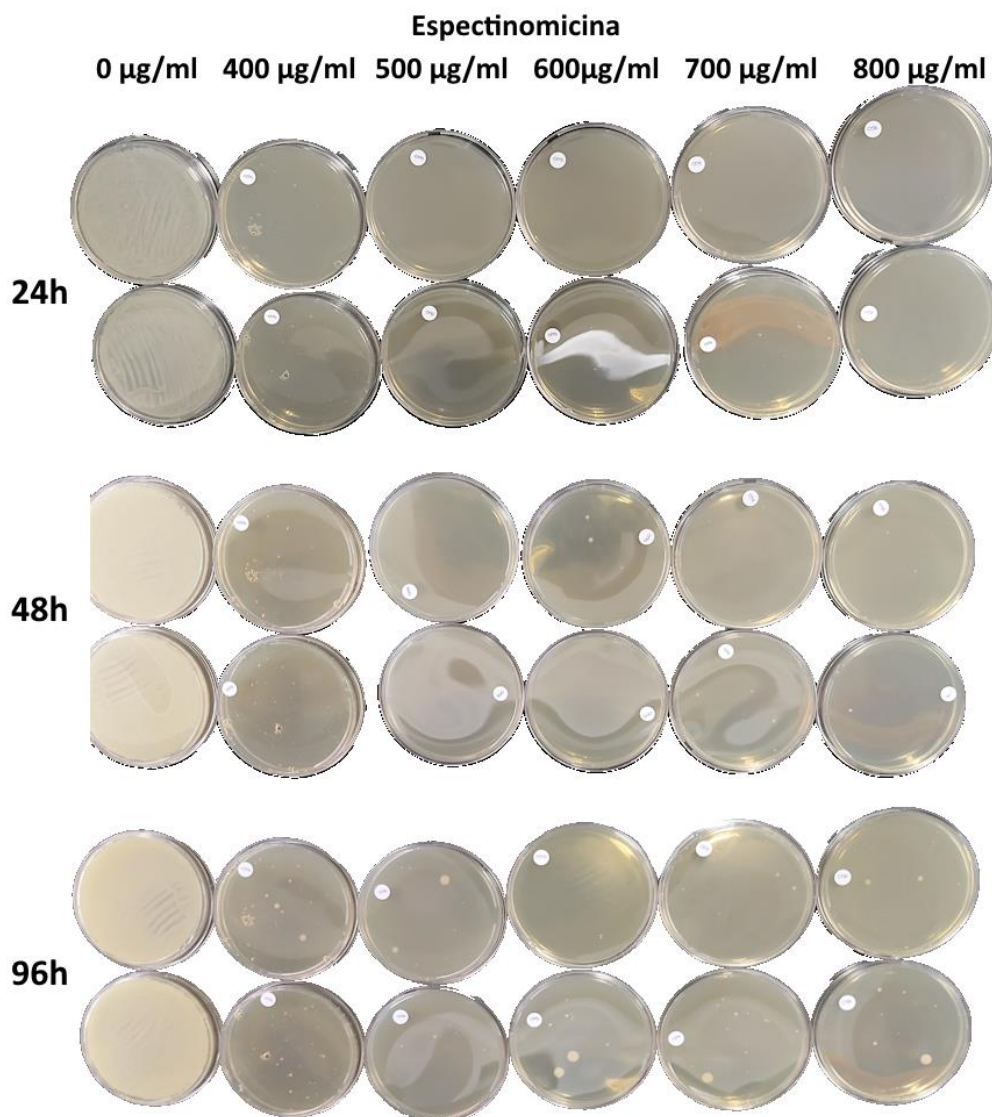


Figura 38. Placas do antibiograma para espectinomicina do RZ2MS9.

Tabela 38. Medições de OD_{600nm} do antibiograma do RZ2MS9 para espectinomicina em LB líquido

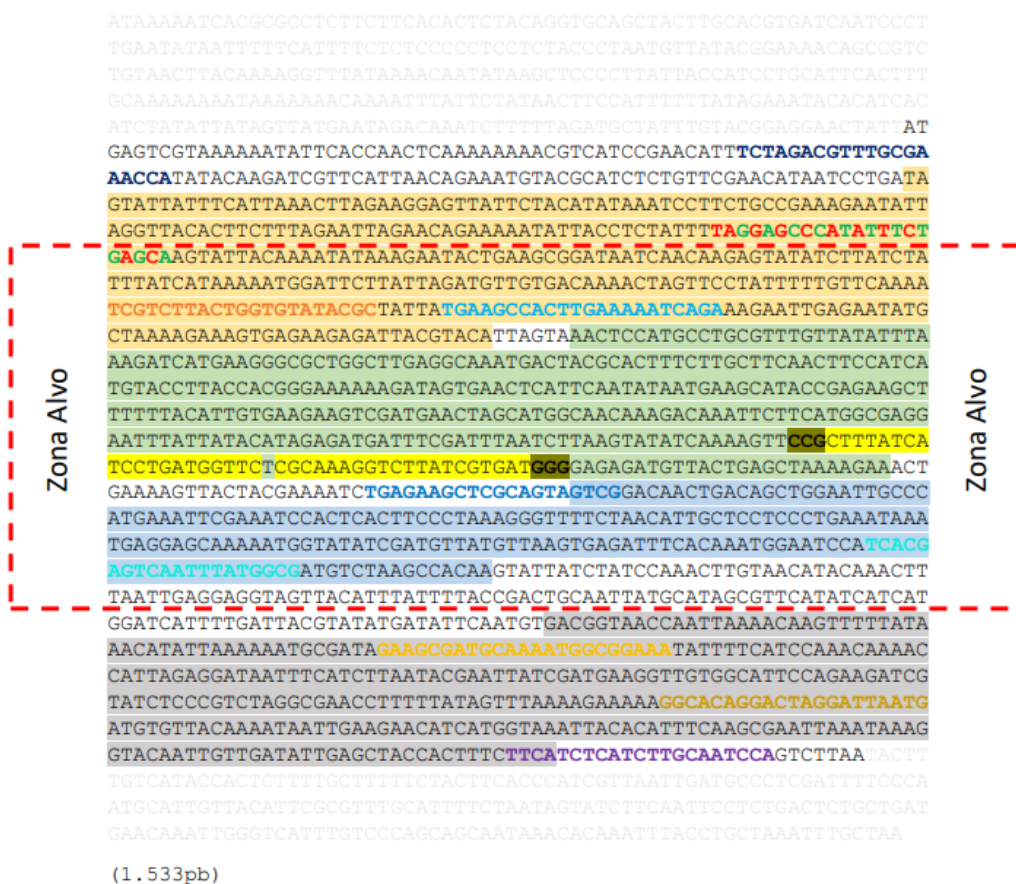
Concentração de espectinomicina (µg/ml)	24h		72h	
	Falcon 1	Falcon 2	Falcon 1	Falcon 2
0	1,731	1,842	2,036	1,728
400	0,013	0,199	1,406	1,498
500	0,040	0,012	1,149	0,001
600	0,008	0,007	0,006	0,000
700	0,004	0,007	0,012	0,011
800	0,006	0,007	0,004	0,004

Não foi observado o crescimento de colônias nas placas de cloranfenicol a 50µg/ml sendo essas concentrações para seleção posteriormente reduzida para 25 µg/ml de cloranfenicol em função da baixa seleção de transformantes e instabilidade de crescimentos destes nessa concentração de antibiótico. A concentração de espectinomicina para seleção dos transformantes RZ2MS9::pTargetF foi inicialmente de 500 µg/ml, em função dos resultados de Figueredo (2018), e depois elevada para 600 µg/ml em função dos resultados obtidos no antibiograma.

As concentrações de canamicina utilizadas, tanto para seleção dos transformantes RZ2MS9::pCRISPR e RZ2MS9::pCas foram baseadas nos resultados de Figueredo (2018), sendo reduzidas para 50 µg/ml nas seleções dos transformantes RZ2MS9::pCRISPR em função da baixa eficiência de recuperação de transformantes obtida em ensaios anteriormente realizados avaliando a transformação desse plasmídeo na linhagem RZ2MS9.

4.3.2. Seleção dos protoespaçadores

Foram selecionados no total 2 protoespaçadores para cada gene (Tabela 39), com diferentes posicionamentos nos genes *kinA* e *sigF* (Figuras 39 e 40).



Proto-Espaçadores	Primers Cassetes	Domínios da Proteína
PAM	KinA O UP F	- Domínio de reconhecimento Pas9
N₂₀	KinA O UP R	- Domínio de reconhecimento Pas4
	KinA O DOWN F	- Domínio de Aceptor de P
	KinA O DOWN R	- Domínio ATPase
	KinA O 2 UP F	
	KinA O 2 UP R	
	KinA O 2 DOWN F	
	KinA O 2 DOWN R	
	KinA_1_F	
	KinA_1_R	

Figura 39. Posicionamento dos protoespaçadores selecionados para *kinA* (GenBank: WP030027183.1) bem como dos primers para a montagem dos cassetes. Os primers KinA_O_UP_F e KinA_O_2_UP_F ocupam posições bastante próximas em função disso se deve a representação sobreposta de ambos na figura.

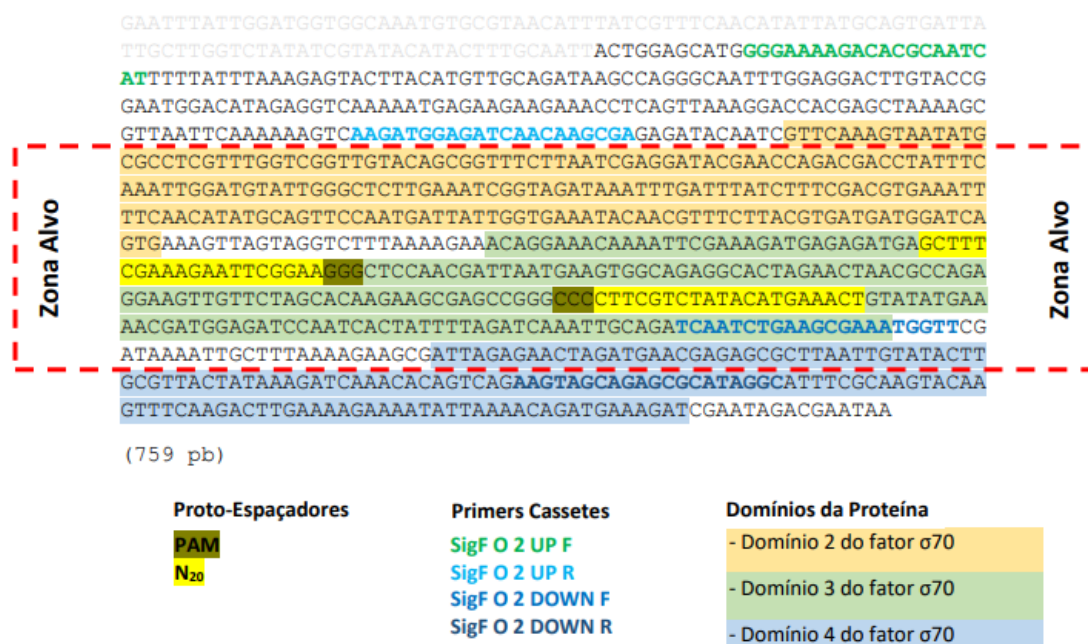


Figura 40. Posicionamento dos protoespaçadores selecionados para *sigF* (GenBank: WP000350728.1) bem como dos primers para a montagem dos cassetes.

Tabela 39. Lista dos protoespaçadores selecionados para as tentativas de nocaute no RZ2MS9

Nome	PAM	Sequência (5'-3')	Direção	Eficiência*		%CG
				Do	OF	
N ₂₀ kinA1		GAACCATCAGGATGATAAAG				40
N ₃₀ kinA1	CGG	ACCTTTGCGAGAACCATCAGG ATGATAAAG	Anti Senso	55	67	43
N ₂₀ kinA2		CGCAAAGGTCTTATCGTGAT				45
N ₃₀ kinA2	GGG	TGATGGTTCTCGCAAAGGTCT TATCGTGAT	Senso	44	64	43
N ₂₀ sigF1		GCTTTCGAAAGAATTCGGAA				40
N ₃₀ sigF1	GGG	TGAGAGATGAGCTTTCGAAAAG AATTCGGAA	Senso	68	78	40
N ₂₀ sigF2		AGTTTCATGTATAGACGAAG				35
N ₃₀ sigF2	GGG	TTTCATATACAGTTTCATGTAT AGACGAAG	Anti Senso	62	62	30

*Valores preditos para a sequência N₂₀ pelo CRISPOR; Do - Doench' 16; Eficiência de clivagem predita pelo método de Doench2016; OF - Out-of-frame: Probabilidade da clivagem gerada pela Cas9 de criar uma deleção que não seja múltipla de 3, quebrando o quando de leitura dos códons da proteína.

4.3.3. Busca por sistemas anti-CRISPR na linhagem RZ2MS9

No genoma da linhagem RZ2MS9 não foi encontrado nenhum sistema anti-CRISPR conhecido. Os resultados do CRISPRimmunity chegaram a predizer 7 sequências de possíveis prófagos e 2 sequências possivelmente

relacionas ao sistema CRISPR, mas não chegou a encontrar nenhuma proteína componente do sistema CRISPR atualmente descrita (figura 41).

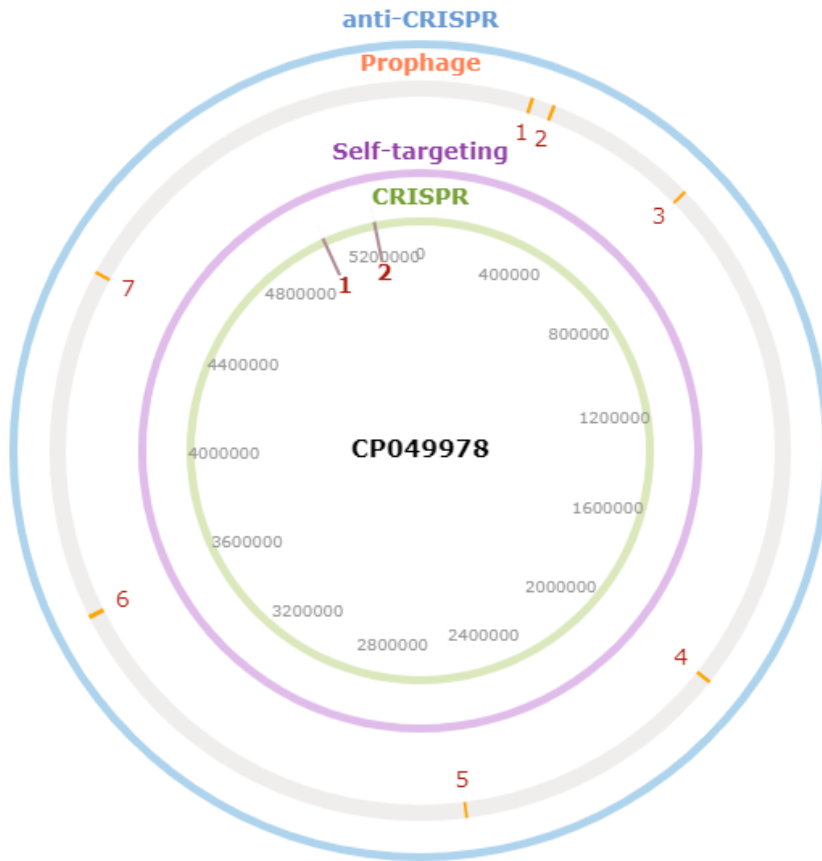


Figura 41. Resultados da busca na base de dados CRISPRimmunity onde ficam destacados a ausência de um sistema anti-CRISPR conhecido e a presença de alguma sequencias possivelmente relacionadas a prófagos e ao sistema CRISPR.

4.3.4. Construção dos plasmídeos carregando os protoespaçadores

4.3.4.1. pCas9 e pCRISPR

Foram obtidos os plasmídeos pCas9 carregando o protoespaçador N₃₀ sigF2 e pCRISPR carregando os protoespaçadores N₃₀ kinA1, N₃₀ kinA2, N₃₀ sigF1, N₃₀ sigF2, N₂₀ kinA1, N₂₀ kinA2, N₂₀ sigF1 e N₂₀ sigF2 (Figura 42). Adicionalmente, foi confirmada a inserção dos protoespaçadores por meio da digestão com a enzima *BsaI* do plasmídeo extraído da *E. coli* DH5 α . Em contrapartida o baixo número de colônias obtidas também levanta um alerta sobre o uso do método de clonagem utilizado. Também é colocado a dificuldade de clonagem dos protoespaçadores no plasmídeo pCas9, tendo sido recuperadas apenas 2 colônias da transformação contendo o protoespaçador N₃₀ sigF2.

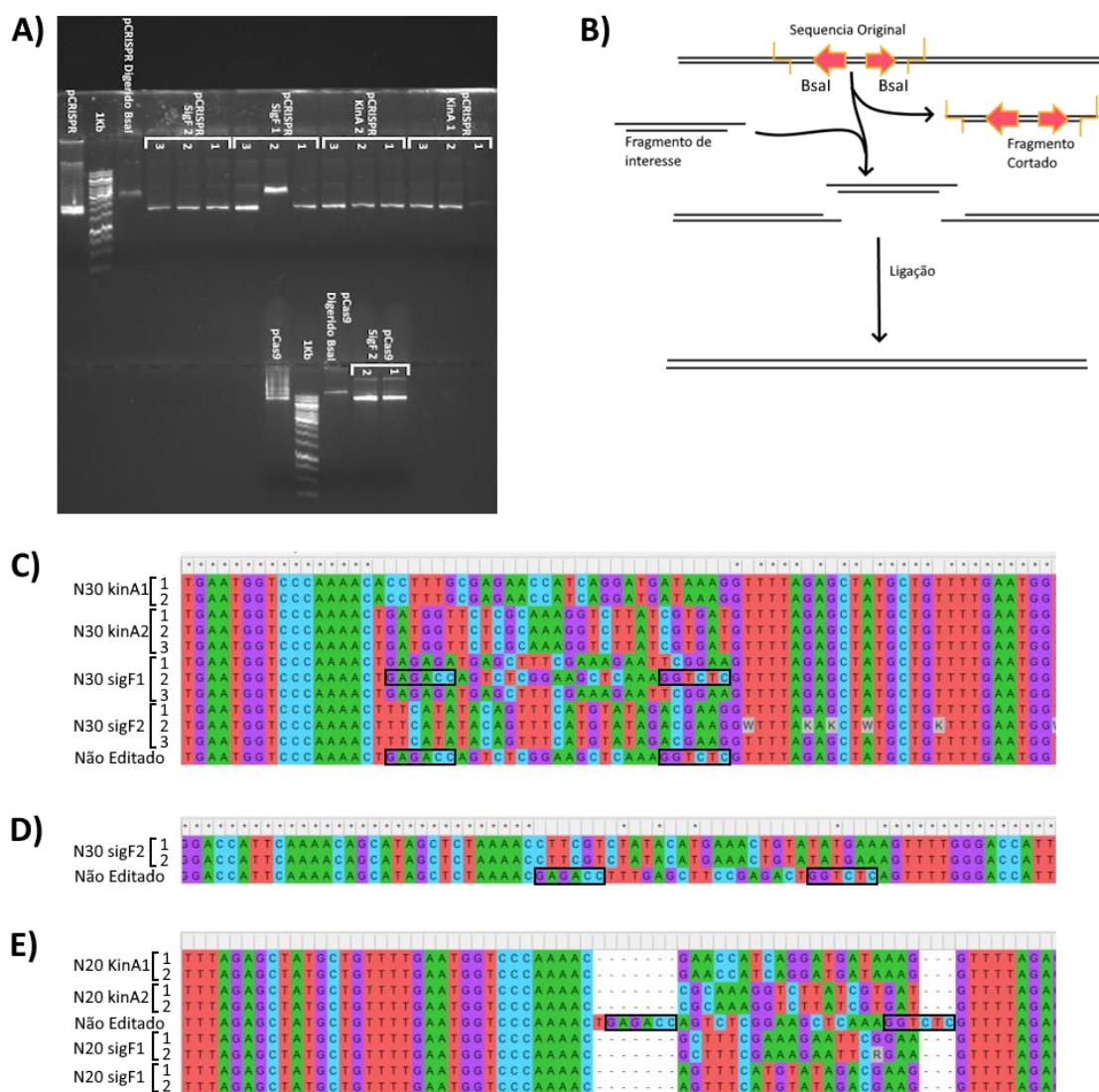


Figura 42. Resultados da clonagem dos protoespaçadores nos plasmídeos pCas9 e pCRISPR. A) Gel de eletroforese revelando o resultado da digestão dos plasmídeos por *BsaI* e por consequência a inserção dos protoespaçadores nos plasmídeos. B) Esquemática do processo da clonagem evidenciando a remoção dos sítios de reconhecimento da *BsaI* durante a clonagem, permitindo o processo de triagem da inserção. C) Resultado dos sequenciamentos do plasmídeo pCRISPR para inserção dos protoespaçadores N₃₀, marcados em preto foram evidenciados os sítios de reconhecimento da *BsaI*, mantidos no plasmídeo onde não houve a entrada do inserto. D) Resultado dos sequenciamentos do plasmídeo pCas9 para inserção dos protoespaçadores N₃₀, marcados em preto foram evidenciados os sítios de reconhecimento da *BsaI*. E) Resultado dos sequenciamentos do plasmídeo pCRISPR para inserção dos protoespaçadores N₂₀, marcados em preto foram evidenciados os sítios de reconhecimento da *BsaI*.

4.3.4.2. pTargetF

Foram obtidos os plasmídeos pTargetF contendo todos os protoespaçadores N₂₀ clonados, entretanto foi observada uma baixa taxa de inserção para alguns dos protoespaçadores clonados (Figura 43). Com destaque para os protoespaçadores N₂₀ sigF1 e N₂₀ sigF2 com uma taxa de colônias contendo o plasmídeo com o devido inserto de 5% e 15% respectivamente. Para os protoespaçadores N₂₀ kinA1 e N₂₀ kinA2 essa taxa foi 64% e 55% respectivamente, levantando o questionamento se essas eficiências poderiam ter relação com as sequências a serem clonadas. Independente disso a observação dessas baixas taxas de clonagem somado a dificuldade em se fazer uma triagem das

colônias crescidas para detecção daquelas que carregam o plasmídeo com o inserto de interesse levanta um alerta sobre a clonagem por *gap repair*, que apesar de ser mais simples pode apresentar desafios em função da baixa eficiência de clonagem.

O sequenciamento completo dos plasmídeos pTargetF confirmou novamente a correta montagem dos mesmos. Não havendo nenhuma alteração na sequência original, a exceção da região de inserção dos N₂₀S onde novamente se confirmou a correta clonagem dos mesmos nos respectivos plasmídeos (Figura 44).

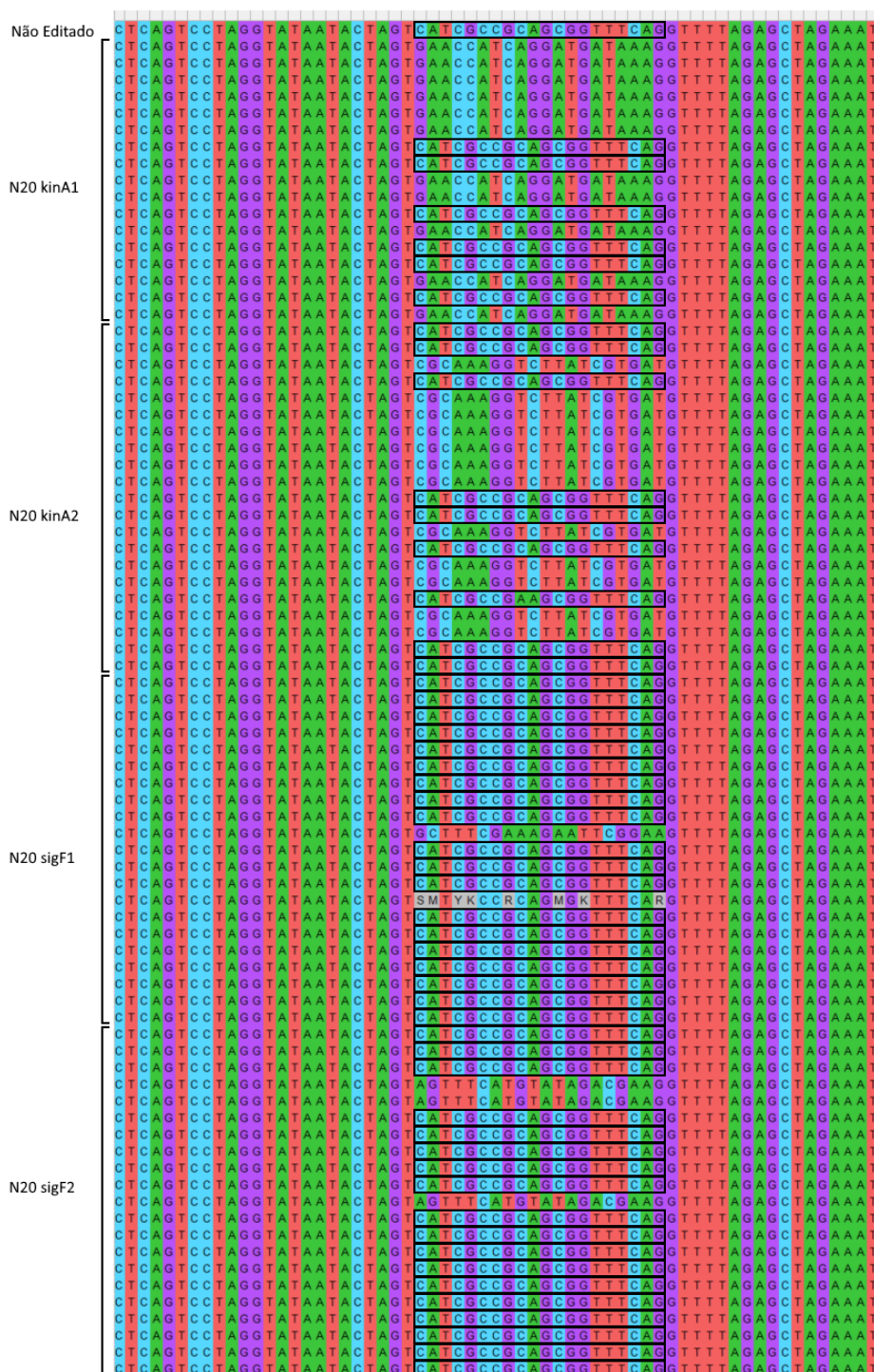


Figura 43. Resultados da clonagem dos protoespaçadores no plasmídeo pTargetF. Resultado dos sequenciamentos do plasmídeo pTargetF para inserção dos protoespaçadores N₃₀, marcados em preto foram evidenciados as sequências originais do plasmídeo no sítio de clonagem do N₂₀, evidenciando os plasmídeos onde não houve a entrada do inserto de interesse.

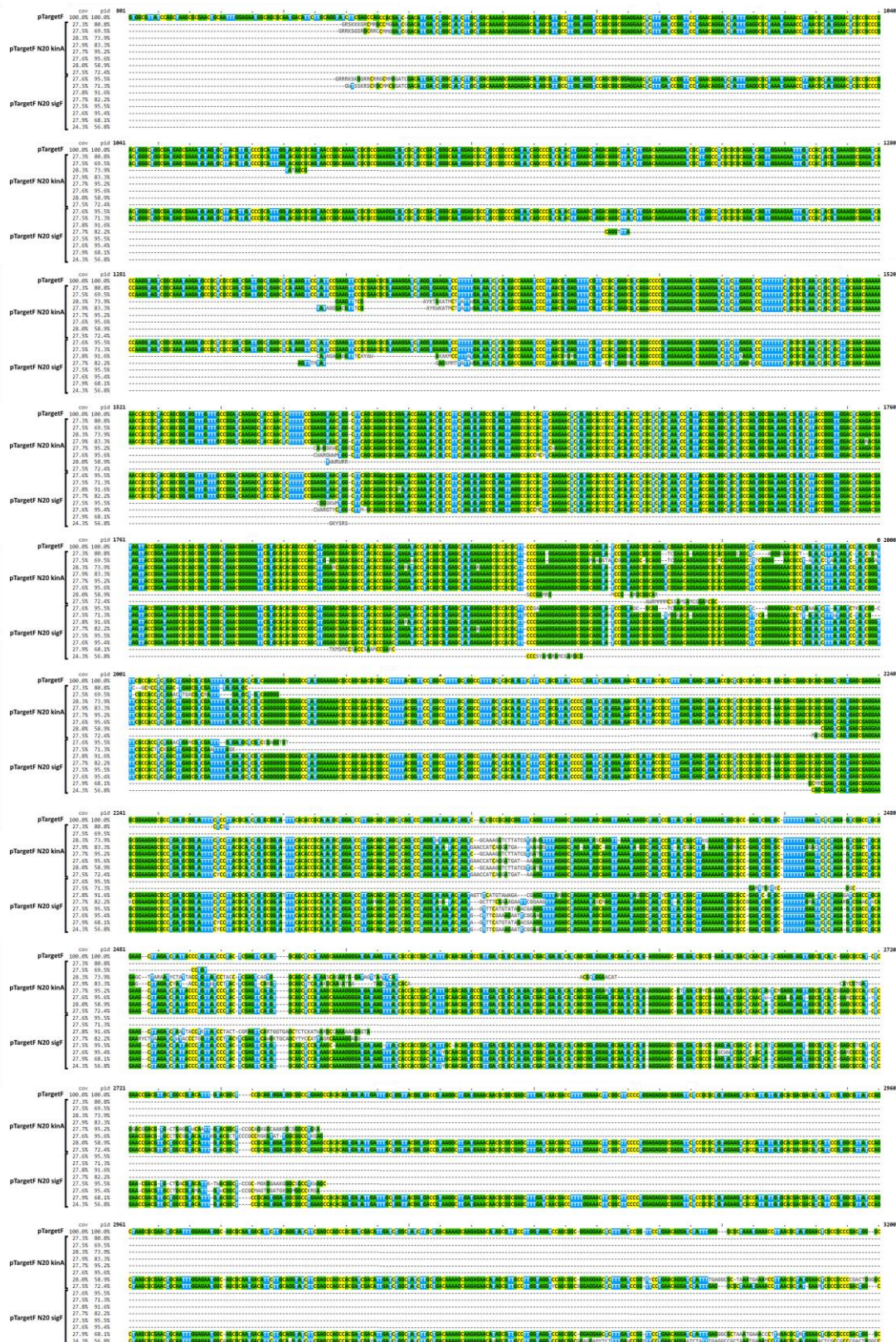


Figura 44. Alinhamento dos resultados do sequenciamento dos plasmídeos pTargetF evidenciando o correto alinhamento com a sequência original do plasmídeo e comprovando a sua integridade

4.3.5. Construção dos cassetes de DNAs doadores para a edição sítio dirigida

Foram obtidos os 4 cassetes para *kinA* e 1 para *sigF*, respectivamente cassetes kinA-1, kinA-2, kinA-3, kinA-4 e sigF-4. A confirmação da montagem foi primeiramente realizada por gel de eletroforese e depois por sequenciamento dos cassetes (Figura 45).

4.3.6. Tentativas e nocaute dos genes de esporulação

Na primeira tentativa de nocaute foram obtidos possíveis transformantes RZ2MS9::pCas-pCRISPR-N₃₀ kinA1 e RZ2MS9::pCas9-pCRISPR-N₃₀ kinA1 oriundos da dupla transformação com os plasmídeos pCas9 e pCRISPR-N₃₀ kinA1 na linhagem RZ2MS9. A transformação com a linhagem RZ2MS9::pCas9 não resultou no crescimento de nenhuma colônia em placa mesmo após 1 semana de observação.

A avaliação do fenótipo de esporulação das colônias obtidas revelou que os transformantes exibiam um expressivo atraso na formação dos endósporos se comparados ao RZ2MS9 selvagem (Figura 46). Em contrapartida a linhagem RZ2MS9::pCas também exibiu esse comportamento de atraso na esporulação independente da transformação com o plasmídeo contendo o DNA guia para os genes de esporulação. Nesse ponto considerou-se que o fenótipo quanto a esporulação do RZ2MS9 contendo o plasmídeo pCas não é uma característica confiável já que muito provavelmente adivinha de algum efeito do plasmídeo pCas sobre o ciclo celular da bactéria. Ao mesmo tempo esse efeito não foi observado na linhagem RZ2MS9::pCas9 esporulando igual ao RZ2MS9 selvagem. Isso demonstra que a dupla transformação de alguma forma conseguiu alterar o ciclo celular da bactéria por um efeito do pCRISPR. Apesar disso os resultados de sequenciamento obtidos (Figura 47) não mostram nenhuma deleção ou mutação na região alvo e as tentativas de amplificação dos plasmídeos pCas9 e pCRISPR nos transformantes e no RZ2MS9::pCas9 acabaram falhando. Não sendo possível confirmar a presença dos plasmídeos nos transformantes, apesar destes apresentarem um fenótipo para esporulação diferente do RZ2MS9 selvagem e do RZ2MS9::pCas9, e não sendo possível confirmar a transformação do RZ2MS9::pCas9 com o pCas9, apesar deste apresentar resistência ao cloranfenicol. Nessa perspectiva como o plasmídeo pCas9 é considerado o plasmídeo de baixa cópia e o RZ2MS9::pCas9 apresenta resistência a cloranfenicol que o selvagem não apresenta considerou-se que a não amplificação por PCR tenha se dado em função dessa baixa cópia e da maior dificuldade de lise das células de bactérias Gram positivas para o funcionamento da PCR de colônia. Entretanto como não foi observada nenhuma mutação no gene *kinA*, alvo dessa tentativa de nocaute, a 1ª tentativa de nocaute foi considerada como falha.

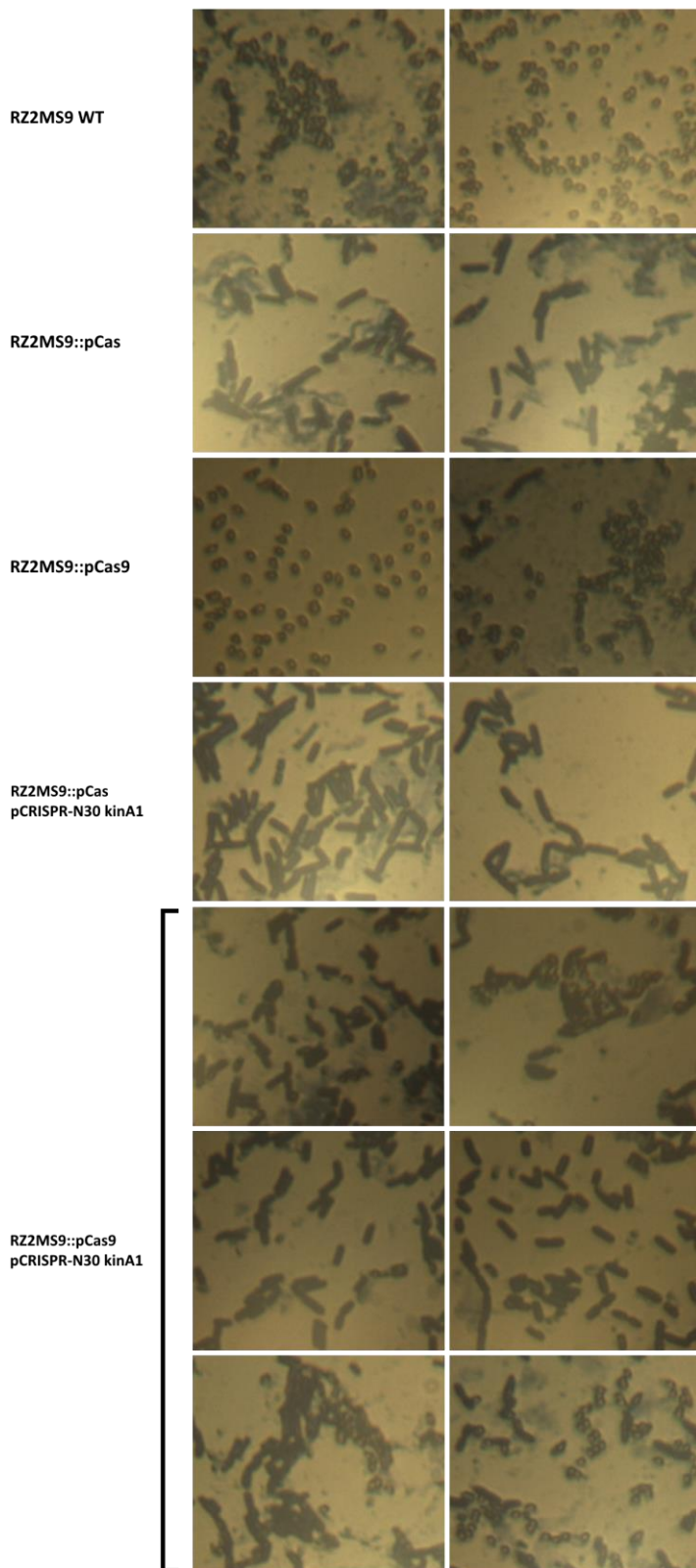


Figura 46. Observação do RZ2MS9 corado com azul de comesse em microscópio ótico para avaliação da presença de células vegetativas (bastonetes azuis) e endósporos (células arredondadas com somente a parede corada em azul) nos transformantes.

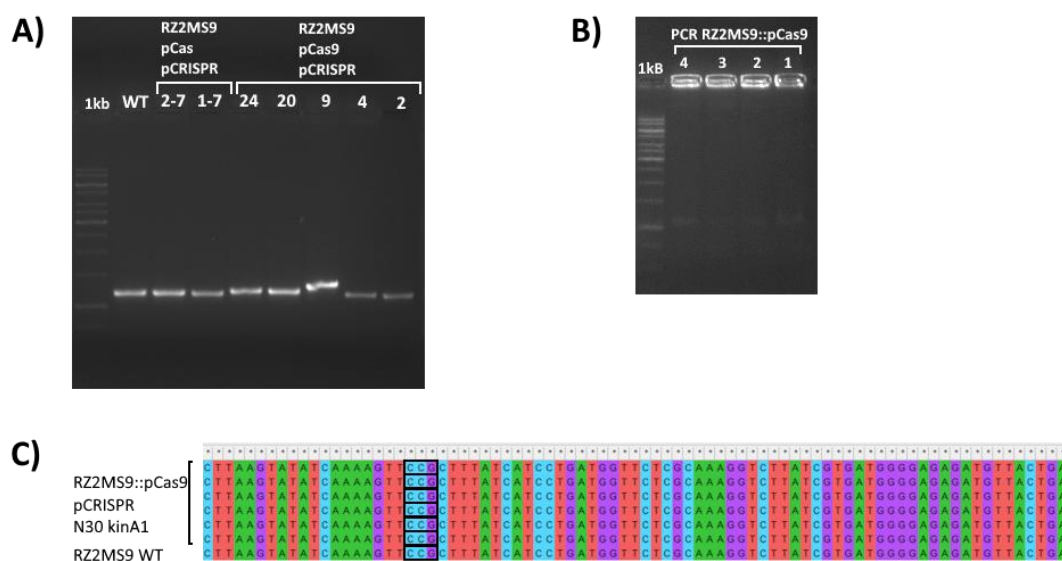


Figura 47. Resultados da 1^o tentativa de nocaute do RZ2MS9. A) Gel de eletroforese da PCR de amplificação de *kinA*. B) Gel de eletroforese da PCR para detecção do plasmídeo pCas9 no RZ2MS9::pCas9. C) Resultado do sequenciamento dos transformante evidenciando na não existência de mutação no alvo, sendo destacado com o retângulo a posição da sequência PAM alvo dessa tentativa de nocaute.

Na segunda tentativa de nocaute novamente não foi observado crescimento de colônia para as placas com antibióticos, dessa vez independente se da dupla transformação do selvagem ou da transformação do RZ2MS9::pCas9 com o pCRISPR. Em função disso foi realizada uma estratégia dupla, primeiro de isolamento de colônias resistentes aos antibióticos da placa controle sem antibiótico e segundo de lavagem das placas com antibiótico e plaqueamento da solução em placas sem antibiótico para recuperação de células que ainda estivessem vivas na placa, mas que não estivessem conseguindo crescer nesta. Em ambos os casos foram obtidas algumas colônias isoladas que foram novamente repicadas para placas com antibiótico para confirmação das resistências.

Entretanto apesar de terem sido obtidas colônias resistentes para ambos os antibióticos os resultados do sequenciamento revelaram a ausência de deleção ou mutação na região alvo do nocaute. Em função disso a 2^o tentativa de nocaute também foi considerada como não eficiente e não foi possível observar nenhum efeito em função da adição de tetraciclina nos meios, e conseqüentemente da ação do promotor *tet* dos plasmídeos. Adicionalmente novamente também não foi possível confirmar a presença dos plasmídeos pCas9 e pCRISPR nos transformantes através da PCR de colônia (Figura 48).

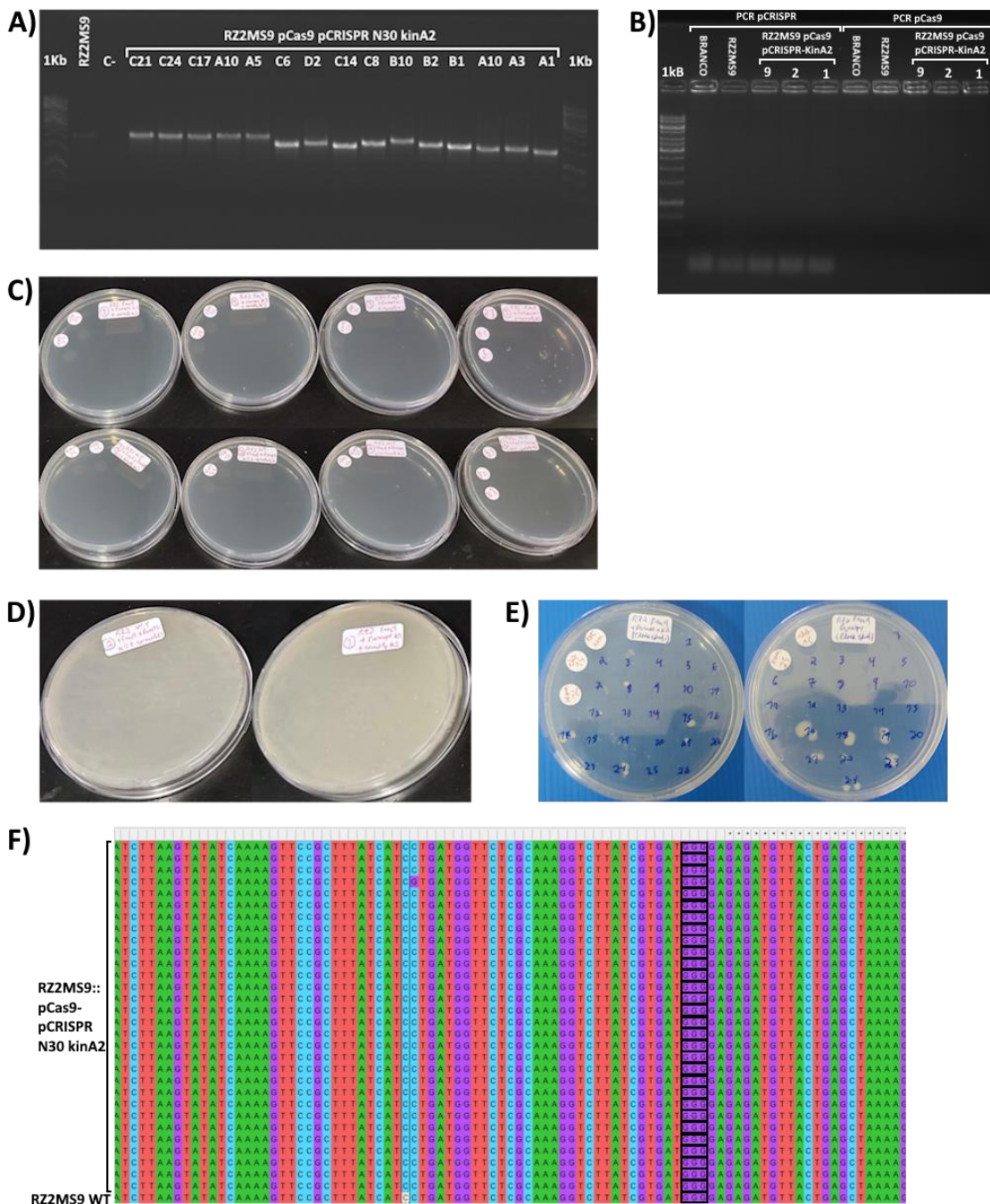


Figura 48. Resultados da 2ª tentativa de nocaute do RZ2MS9. A) Gel de eletroforese da amplificação de *kin4*. B) Gel de eletroforese da tentativa de amplificação dos plasmídeos pCas9 e pCRISPR nos transformantes para detecção dos mesmos. C) Placas com antibiótico do primeiro plaqueamento da transformação, sendo evidenciado o não crescimento de colônias. D) Placa controle sem antibiótico da transformação. E) Placas de seleção das colônias resistentes aos antibióticos. F) Resultado do sequenciamento evidenciando a ausência de mutação, sendo destacado com as caixas em preto a sequência PAM alvo.

Assim como na segunda tentativa, novamente não foram observadas colônias nas placas com antibiótico do primeiro plaqueamento, sendo necessária a realização de lavagem destas para a recuperação de colônias que depois foram confirmadas quanto à resistência aos antibióticos. Algumas das placas com antibiótico da transformação foram deixadas a 28°C por 2 semanas a fim de se verificar se poderia haver algum crescimento posterior, entretanto não foi observada nenhuma colônia nessas placas. Somado a isso também não foram encontradas nenhuma alteração nas regiões alvo pelo sequenciamento, novamente mostrando uma não ação de corte da Cas9 apesar da bactéria apresentar

a resistência aos antibióticos dos plasmídeos utilizados na transformação e que contem a maquinaria do sistema CRISPR-Cas9. Novamente em função da ausência de alterações na região alvo do nocaute a 3^o tentativa de nocaute foi considerada não eficiente (Figura 49).

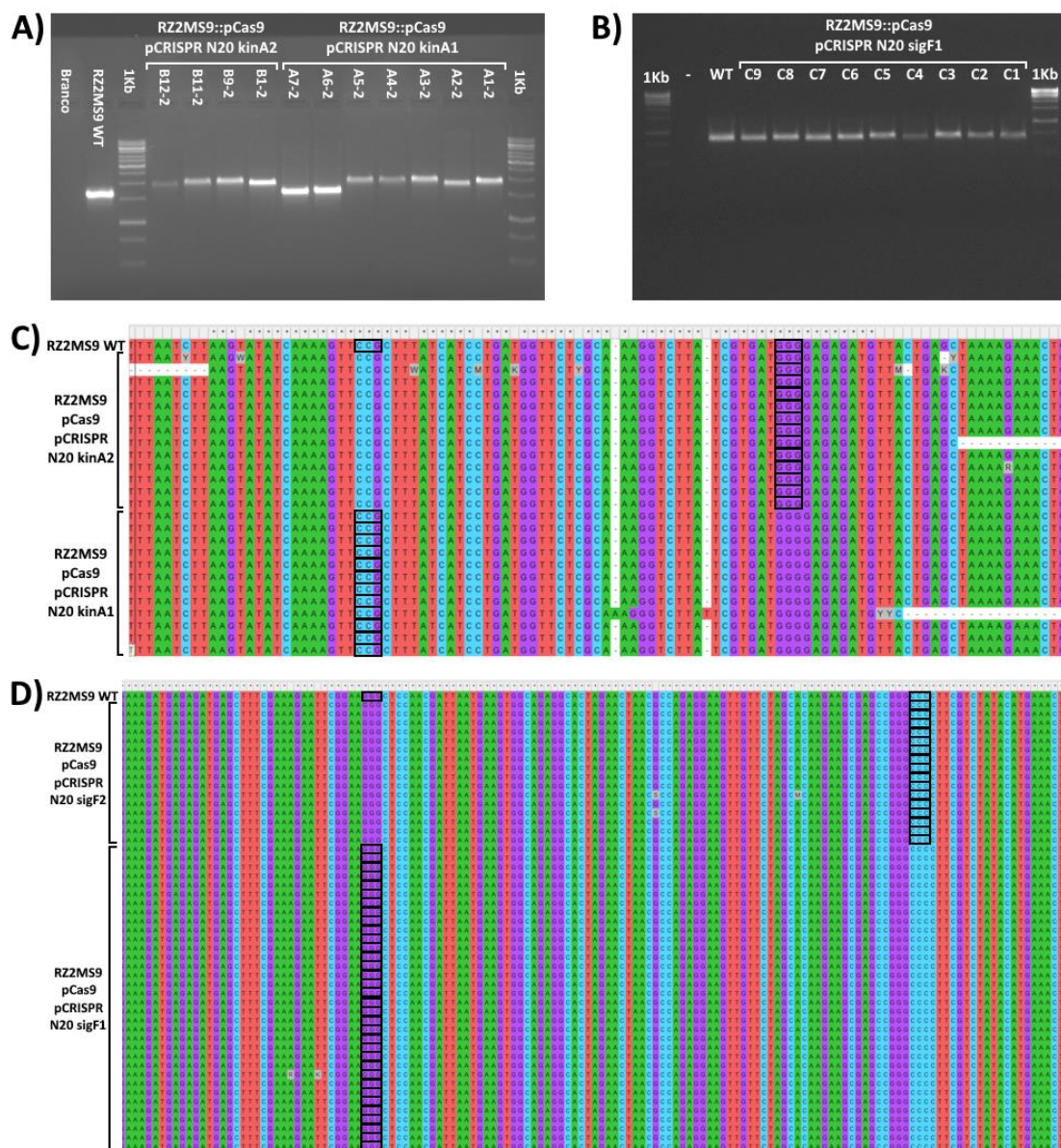


Figura 49. Resultados da 3^o tentativa de nocaute do RZ2MS9: A) Gel de eletroforese da amplificação de *kinA*. B) Gel de eletroforese da amplificação de *sigF*. C) Resultado do sequenciamento dos transformantes para os N₂₀ kinA1 e kinA2, sendo evidenciado com os retângulos pretos as sequências PAM alvos do nocaute. D) Resultado do sequenciamento dos transformantes para os N₂₀ sigF1 e sigF2, sendo evidenciado com os retângulos pretos as sequências PAM alvos do nocaute.

Durante a quarta tentativa de nocaute não foi observado o crescimento de colônias nas placas dentro das 24 h estipuladas. Assim, foi estendido o tempo de observação até o aparecimento das primeiras colônias, após 72h de crescimento. Entretanto nenhuma das colônias obtidas apresentava alterações na região alvo no nocaute pelo sequenciamento (Figura 50). Novamente em função desses resultados a 4^o tentativa de nocaute foi considerada não eficiente. Também não foi observado nenhum ganho consistente na recuperação de transformantes com a adição dos cassetes de DNAs doadores a transformação, sendo que para alguns dos alvos testados houve uma redução no número

de colônias recuperadas com a adição dos cassetes na transformação (Figura 50). Ao mesmo tempo essa contagem de colônias mostra o crescimento destas na transformação controle (onde não se adicionou DNA) evidenciando o problema de escape do RZ2MS9 em espectinomicina e reforçando a necessidade do tempo limite para avaliação das colônias crescidas e placa.

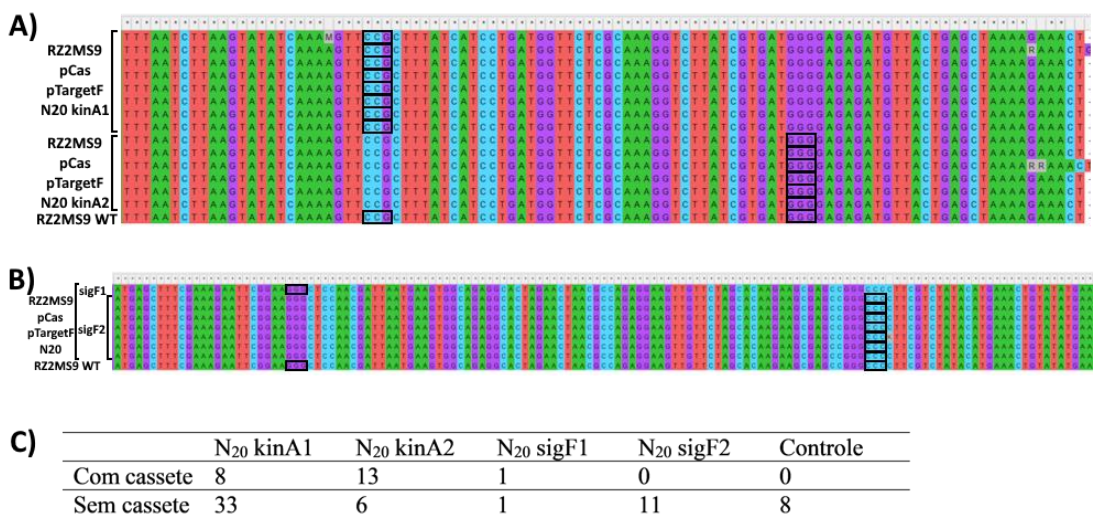


Figura 50. Resultados do sequenciamento da 4^o tentativa de nocaute. A) Resultado do sequenciamento dos transformantes para os N₂₀ kinA1 e kinA2, sendo evidenciado com os retângulos pretos as sequências PAM alvos do nocaute. B) Resultado do sequenciamento dos transformantes para os N₂₀ sigF1 e sigF2, sendo evidenciado com os retângulos pretos as sequências PAM alvos do nocaute. C) quantidade de colônias recuperadas na transformação para cada alvo do nocaute.

Durante a 5^o tentativa de nocaute observou-se novamente uma baixa recuperação de colônias as placas após 24 h de crescimento (apenas 1 colônia do transformante para o N₂₀ kinA1). As demais colônias foram obtidas do plaqueamento da seleção em meio líquido, não tendo sido recuperado ao final nenhuma colônia para a transformação contendo o N₂₀ sigF2.

Adicionalmente também se voltou a realizar a análise de fenótipo dos transformantes quanto à esporulação (Figura 51). Novamente, observou-se um efeito bastante pronunciado do plasmídeo pCas de atrasar a esporulação da linhagem RZ2MS9 sendo observados grandes aglomerados de células vegetativas e endósporos, enquanto que na linhagem selvagem as células se encontram soltas, em grande maioria esporuladas, com a presença de algumas células vegetativas ocasionais. Já os transformantes pCas pTargetF parecem apresentar um atraso ainda maior na esporulação apresentando uma aparente menor quantidade de endósporos nos aglomerados de células observados. Entretanto ao se analisar os transformantes contendo o N₂₀ para o gene *sigF* não se observa o fenótipo característico de duplo septo para as mutações nesse gene.

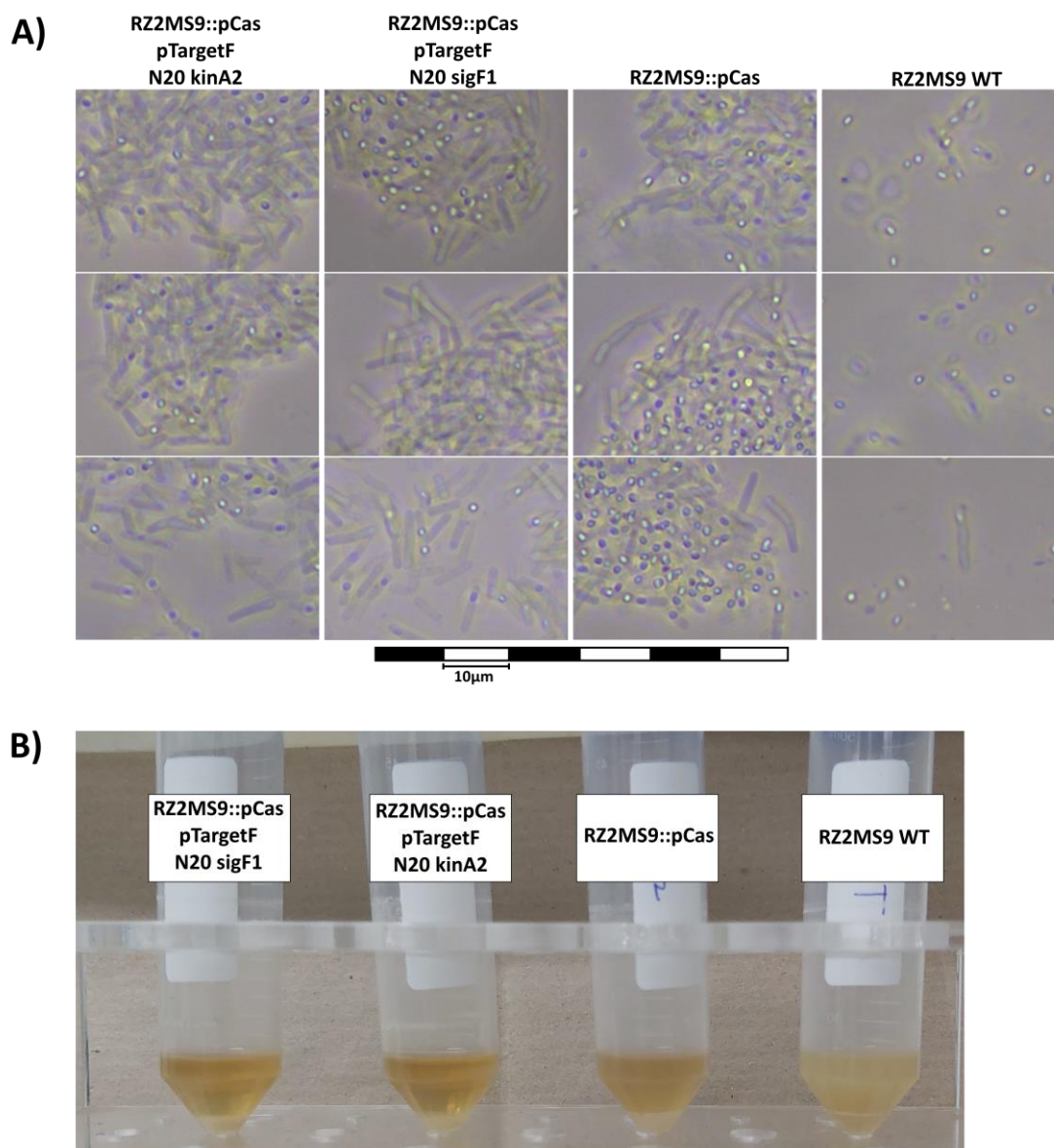


Figura 51. Resultado da avaliação do fenótipo de esporulação para os transformantes da 5ª tentativa de nocaute dos genes de esporulação. A) Observação das células no microscópio de contraste de fase, nota-se um pronunciado atraso na formação de endósporos nas linhagens contendo o plasmídeo pCas, que parece ficar ainda mais pronunciada quando também transformadas com o plasmídeo pTargetF. B) Crescimento das linhagens para a avaliação da esporulação, nota-se uma pronunciada precipitação de células nas linhagens pCas, que parece se intensificar com a presença do pTargetF.

Uma análise quantitativa é necessária para uma confirmação do efeito da transformação com o plasmídeo pTargetF contendo os N₂₀ na aparente intensificação do atraso da esporulação. Entretanto a não observação do fenótipo característico do nocaute para o gene *sigF* levanta novamente um alerta do efeito observado não estar relacionado aos nocautes pretendidos. Esse fato foi confirmado com o resultado do sequenciamento, onde novamente não foi observada nenhuma modificação na região alvo para os nocautes nos transformantes obtidos (Figura 52). Novamente a tentativa de nocaute foi considerada como não eficiente. .

Diferentemente das tentativas de transformação com os plasmídeos pCas9 e pCRISPR foi possível confirmar a presença do plasmídeo pCas9 na linhagem RZ2MS9::pCas por PCR, entretanto não foi possível detectar o plasmídeo pTargetF por PCR nos transformantes. Adicionalmente a isso foi observado um crescimento do controle negativo da

transformação (que não recebeu DNA) no meio líquido contendo a espectinomicina para a seleção dos transformantes. Essas células foram posteriormente repicadas múltiplas vezes tanto em meio líquido quanto em meio sólido contendo 600 µg/ml de espectinomicina onde se confirmou a persistência da resistência aos antibióticos. Entretanto uma observação no microscópio de contraste de fase (Figura 53) revelou que estas apresentavam grandes deformidades celulares levantando a hipótese de problemas na transformação com o plasmídeo pTargetF.

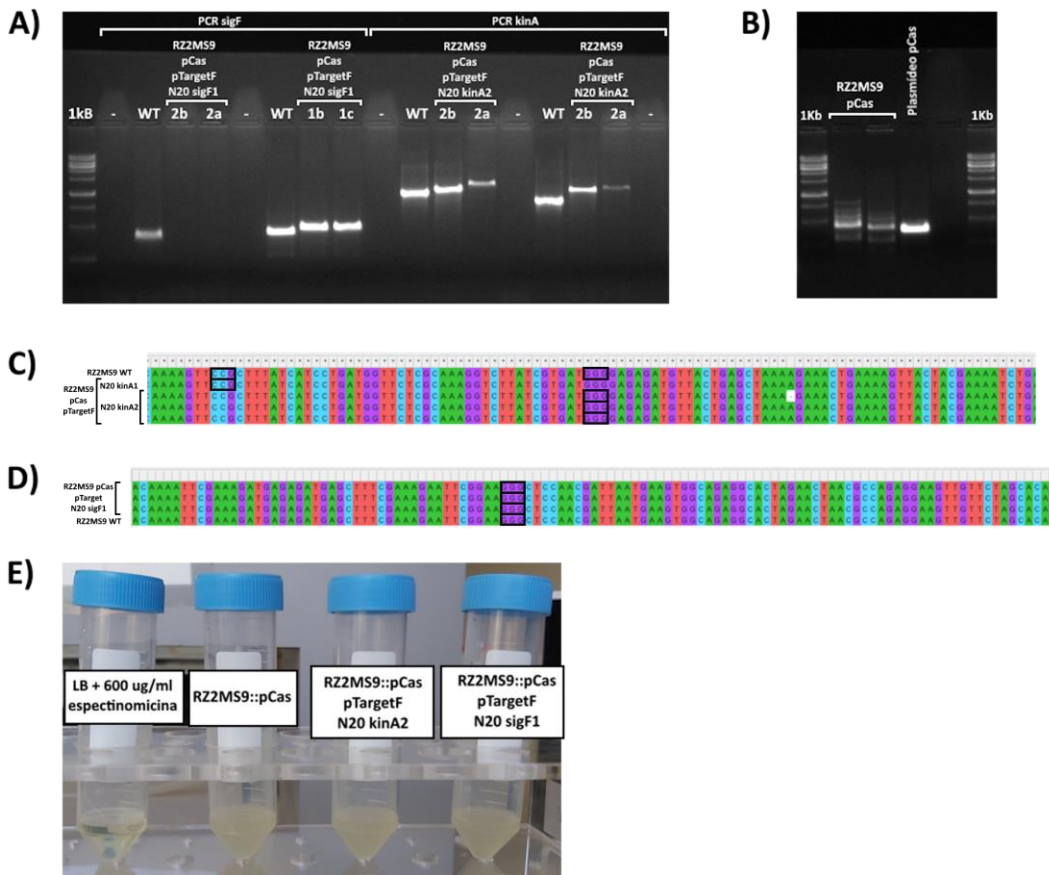


Figura 52. Resultados da 5ª tentativa de nocaut dos genes de esporulação. A) Gel de eletroforese da amplificação de *kinA* e de *sigF*. B) Gel de eletroforese para detecção do plasmídeo pCas na linhagem RZ2MS9::pCas. C) Resultado do sequenciamento dos transformantes para os N₂₀ kinA1 e kinA2, sendo evidenciado com os retângulos pretos as sequencias PAM alvos do nocaut. D) Resultado do sequenciamento dos transformantes para os N₂₀ sigF1, sendo evidenciado com os retângulos pretos as sequencias PAM alvos do nocaut. E) Crescimento dos transformantes em meio líquido contendo 600 µg/ml de espectinomicina logo após a transformação onde nota-se também o crescimento no controle negativo que não recebeu o plasmídeo pTargetF contendo o gene de resistência para espectinomicina.

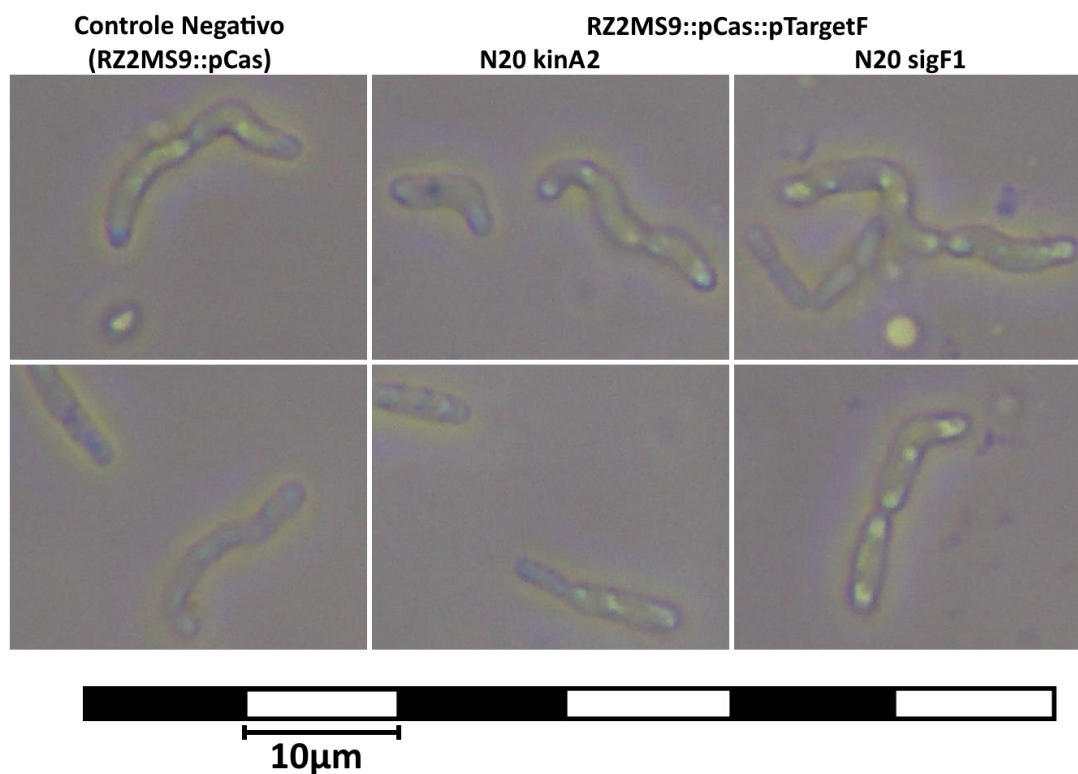


Figura 53. Deformidade das células dos transformantes crescidos em meio líquido contendo 600 µg/ml de espectinomicina após a transformação para a 5ª tentativa de nocaute.

4.3.6.1. Avaliação dos plasmídeos pCas e pTargetF utilizados nas transformações com o RZ2MS9

Não foi possível confirmar a sequência dos plasmídeos pCas clonados, com todas os fragmentos enviados para PCR oriundos do RZ2MS9::pCas apresentando sequências diferentes do plasmídeo original. Ao mesmo os resultados das curvas de cromatograma dos sequenciamentos do pCas também mostraram um grande ruído nos resultados desse sequenciamento, tornando-os pouco confiáveis e novamente impossibilitando que a integridade do plasmídeo pCas carregado pelo RZ2MS9::pCas seja confirmada (figura 54).

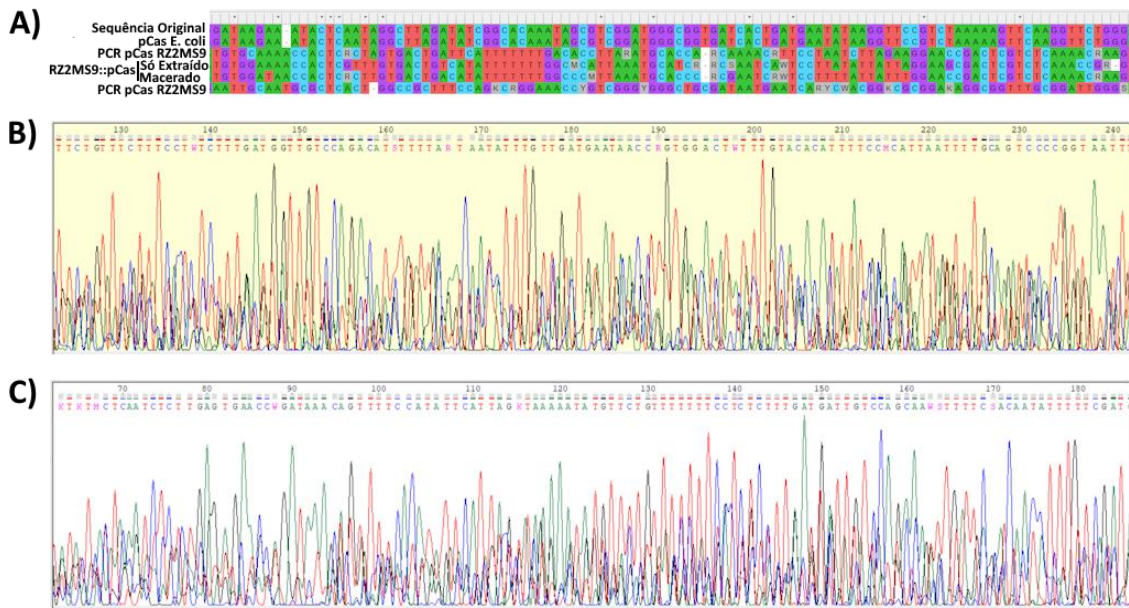


Figura 54. Resultados do sequenciamento do plasmídeo pCas. A) trecho do alinhamento das sequências dos diversos fragmentos do pCas sequenciados, onde evidencia-se que somente o fragmento oriundo do plasmídeo extraído de *E. coli* apresentava a sequência igual a original. B) Trecho do cromatograma do sequenciamento do fragmento do plasmídeo pCas oriundo da extração do RZ2MS9::pCas com o uso de maceração em nitrogênio líquido, ficando evidenciado o pronunciado ruído no resultado do sequenciamento. C) Trecho do cromatograma do sequenciamento do fragmento do plasmídeo pCas oriundo da extração do RZ2MS9::pCas sem o uso de maceração em nitrogênio líquido, ficando evidenciado o pronunciado ruído no resultado do sequenciamento

Adicionalmente no teste de transformação dos plasmídeos pTargetF no RZ2MS9 selvagem foi possível confirmar a presença do plasmídeo nos transformantes através de PCR de colônia feita com as colônias obtidas na placa de transformação (Figura 55). Entretanto após o repique dessas colônias para novas placas (mantendo as concentrações de antibióticos) não foi mais possível a detecção desses plasmídeos por PCR. A purificação desses amplicons da primeira PCR foi sequenciada e os resultados confirmaram novamente que os plasmídeos clonados de fato eram os pTargetF usados na transformação e que sua sequência estava íntegra, incluindo a presença dos N₂₀₅ de interesse. Concomitantemente a isso novamente observou-se nessa transformação o crescimento do controle negativo (onde não houve adição de DNA na transformação) no meio LB suplementado com 600 µg/ml de espectinomicina.

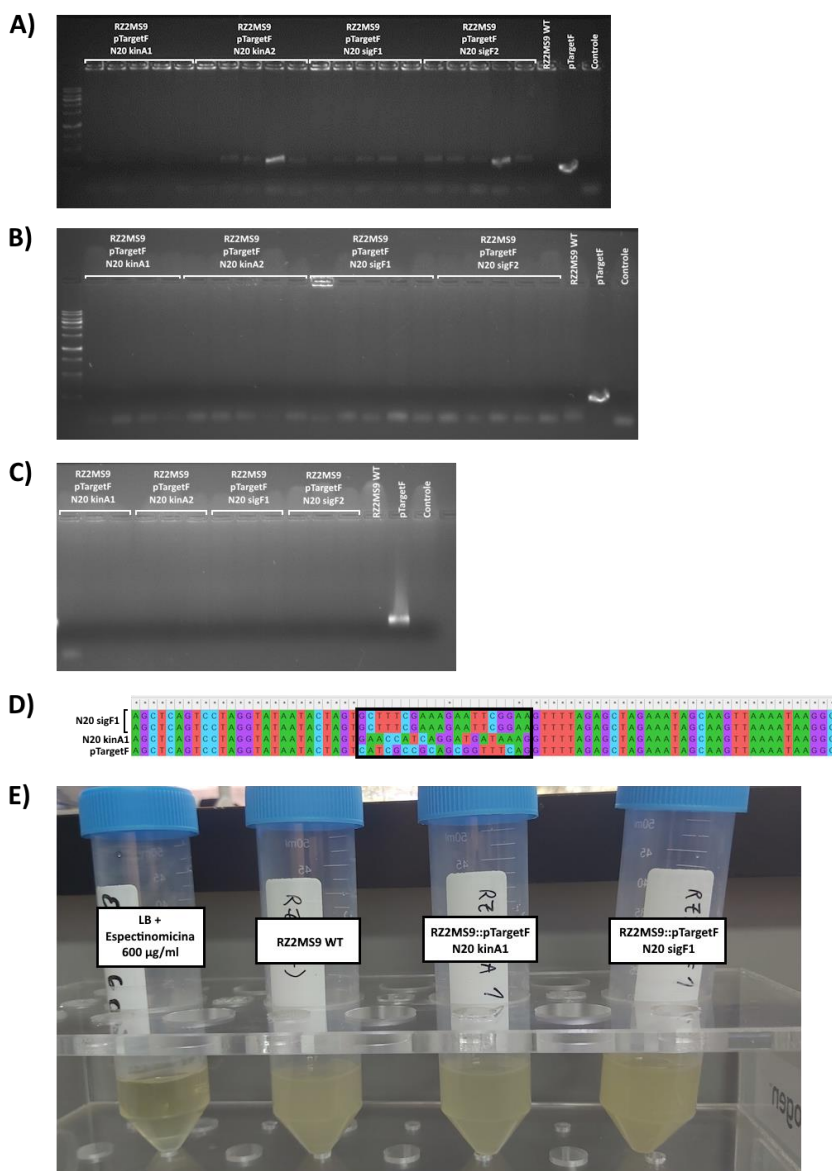


Figura 55. Resultados da transformação do RZ2MS9 selvagem com os plasmídeos pTargetF. A) Gel de eletroforese da 1^o tentativa de amplificação dos plasmídeos pTargetF clonados nas colônias das placas da transformação. B) Gel de eletroforese da 2^o tentativa de amplificação dos plasmídeos pTargetF clonados nas colônias das placas do 1^o repique após a transformação. C) Gel de eletroforese da 3^o tentativa de amplificação dos plasmídeos pTargetF clonados nas colônias das placas do 2^o repique após a transformação. D) Resultado do sequenciamento dos amplicons da 1^o tentativa de amplificação dos pTargetF dos transformantes. E) Crescimento dos transformantes em meio líquido contendo 600 µg/ml de espectinomicina logo após a transformação onde nota-se também o crescimento no controle negativo que não recebeu o plasmídeo pTargetF contendo o gene de resistência para espectinomicina.

4.3.7. Buscas complementares *in silico* por genes de resistência a antibióticos no genoma do RZ2MS9

As buscas realizadas pela Ferramenta BLAST para genes de resistência a espectinomicina não retornaram nenhum resultado, não sendo encontrados sequências similares aos dos genes *smR* e *aadA* no genoma do RZ2MS9. No genoma da linhagem RZ2MS9 foram encontrados 2 genes de resistência a cloranfenicol (tabela 40), mas não foram

encontrados genes relacionados a espectinomicina. Em contrapartida a busca na anotação do genoma revelou a presença de pelo menos 9 genes de relacionados a bombas para efluxo de antibióticos nessa bactéria (tabela 40).

Tabela 40. Lista de genes encontrados na busca in silico por genes de resistência a antibióticos na linhagem RZ2MS9 de *Bacillus*.

GenBank	A.A.	Nome
WP_070757389.1	216	MULTISPECIES: type A chloramphenicol O-acetyltransferase
WP_070756656.1	208	chloramphenicol phosphotransferase
WP_000263262.1	107	MULTISPECIES: multidrug efflux SMR transporter
WP_000539667.1	104	MULTISPECIES: multidrug efflux SMR transporter
WP_070757088.1	404	multidrug efflux MFS transporter
WP_000660200.1	476	MULTISPECIES: multidrug efflux MFS transporter
WP_070757937.1	312	multidrug resistance efflux transporter family protein
WP_070756840.1	399	multidrug efflux MFS transporter
WP_000312339.1	110	MULTISPECIES: multidrug efflux SMR transporter
WP_000312623.1	104	MULTISPECIES: multidrug efflux SMR transporter
WP_001201630.1	321	MULTISPECIES: multidrug resistance efflux transporter family protein

A.A. – Número de resíduos de aminoácidos da proteína traduzida.

4.4. Discussão

O nocaute de genes por meio da técnica de CRISPR-Cas9 é amplamente referenciado como sendo um método bastante eficiente para a realização desse processo, principalmente se comparado as metodologias anteriormente disponíveis (SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021; BURBY; SIMMONS, 2017; YI et al., 2018; ZHOU et al., 2019; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016). Em diversos desses trabalhos é comum relatos de eficiência de mutação na ordem de 80% (BURBY; SIMMONS, 2017; ZHOU et al., 2019; YI et al., 2018). Entretanto, no presente estudo não foi observado nenhuma mutação nas regiões de interesse nas dezenas de transformantes avaliados nas 5 tentativas de nocaute executadas. Essa ineficiência se torna ainda mais atípica quando se considera que nas duas últimas tentativas foram utilizados praticamente os mesmos métodos e plasmídeos usados no nocaute bem sucedido do RZ2MS9 para o gene *ipdC* (FIGUEREDO et al., 2023). Nessa perspectiva a presente discussão propõe em analisar os resultados dessas tentativas de nocaute a fim de se traçar as possíveis causas por trás dessa ineficiência no processo de nocaute utilizando a técnica de CRISPR-cas9.

Um primeiro ponto a se levantar em relação a impossibilidade de nocaute de determinado gene está relacionado com a essencialidade desse gene. Genes essenciais não podem ser nocauteados dado que a interrupção do seu funcionamento inevitavelmente leva a morte da célula. Entretanto, como já mencionado na revisão a respeito de trabalhos nocauteando genes de esporulação existem muitos trabalhos que reportam a realização de nocautes bem sucedidos nos genes alvo por meio de diferentes técnicas, incluindo a de CRISPR-cas9 (Apêndice A). Os genes *kinA* e *sigF* foram escolhidos justamente em função desses trabalhos por serem genes na qual foram repostadas as menores interferências no restante do metabolismo celular. (YI et al., 2018) obtiveram mutantes do gene *sigF* em isolados de *B. subtilis* e *B. mycoides* como uma prova de conceito para o uso da edição por CRISPR em isolados de *Bacillus* não modelos. Os autores reportaram a ocorrência de vários falsos positivos nos transformantes de *B. mycoides* recuperados na placa de transformação (que já apresentavam significativa redução no tamanho das colônias em função do efeito dos antibióticos), mas que foram rapidamente eliminados já no primeiro repique pela ação dos antibióticos na placa, evento

esse que não foi observado nos transformantes de *B. subtilis*. Apesar dessa situação descrita os autores ainda reportaram que a eficiência de mutação em *B. mycoides* foi de pelo menos 77%, chegando a 100% em *B. subtilis*.

Já Lim e Choi (2019) reportaram a impossibilidade de nocaute dos genes *sigE*, *sigF* e *spo0A* em *B. subtilis*, mas somente porque o plasmídeo construído para o nocaute por CRISPR utiliza promotores dependentes de σ^E e, portanto, qualquer nocaute que altere a expressão desse fator sigma (como o de *sigF*, *spo0A* e do próprio *sigE*) altera o correto funcionamento do plasmídeo. Dessa forma, considera-se como muito pouco provável que a ineficiência dos nocautes tenha se dado em função da essencialidade dos genes alvos para a linhagem RZ2MS9. Por mais que seja reportadas alterações na eficiência do nocaute de genes de esporulação entre diferentes isolados de *Bacillus* não se encontrou artigos apontando a completa impossibilidade da realização desse nocaute e os artigos que mencionam a eficiência desse processo de nocaute frequentemente mencionam altas eficiências (acima de 70%).

Ainda em relação aos genes alvos também é reportado que a eficiência de mutação pode variar drasticamente em função do sítio PAM escolhido como alvo. Westbrook, Moo-Young e Chou (2016) reportaram variações de 23% até 91% nas eficiências de mutação do gene *amyE* de *B. subtilis* em função dos diferentes sítios PAM escolhidos para a tentativa de nocaute. Os mesmos autores também reportam diferenças de eficiência entre genes de um mesmo isolado, com alguns genes sendo significativamente mais fáceis de se obter mutantes. Apesar de não ser possível confirmar no presente estudo como os sítios PAM escolhidos possam estar prejudicando (ou não) o nocaute aponta-se para o grande volume de transformantes avaliados (totalizando mais de uma centena) para os 4 diferentes alvos de nocaute (2 por gene). Apesar de alguns sítios PAM poderem naturalmente apresentar eficiência de nocaute muito baixa considera-se pouco provável que essa ineficiência por si só seja a causa da não obtenção de mutantes. Mesmo que as eficiências possam ser baixas as dezenas de transformantes avaliados em diferentes alvos correspondem a uma amostra grande o bastante para que mesmo eventos de mutação com baixa probabilidade possa ser observados. Considerando que uma vez que o mutante seja encontrado as tentativas do nocaute se seque a probabilidade de se encontrar o mutante é complemento da probabilidade de este ainda não ter sido encontrado. Dessa forma a probabilidade de ocorrência de um mutante pode ser estimada de acordo com a fórmula abaixo onde:

$$Po = 1 - ((1 - Pe)^n)$$

Po = Probabilidade de ocorrência

Pe = Probabilidade do evento de mutação (Eficiência de mutação)

n = Numero de avaliações

Mesmo considerando a baixa eficiência de 23% reportada por Westbrook, Moo-Young e Chou (2016), dado os mais de 100 transformantes avaliados a probabilidade de encontro do mutante seria de 99,9999%. Reduzindo essa eficiência para 10% essa probabilidade ainda se manteria em 99,9973% e reduzindo para 5% ainda seria de 99,4079%. Para que a probabilidade de ocorrência do mutante seja inferior a 50% a eficiência de mutação tem de ser inferior a 0,7%, considerando um número de avaliações de pelo menos 100 transformantes. Nessa perspectiva também se acaba considerando como muito pouco provável que a eficiência dos sítios PAM possa ser o motivo por trás da não obtenção dos mutantes nocauteados para os genes de esporulação.

Nesse ponto passou-se a descartar a hipótese de que a baixa eficiência do nocaute CRISPR possa estar relacionada aos genes alvos do nocaute, sendo voltada a atenção para os plasmídeos utilizados nas tentativas dos mesmos. Durante as 5 tentativas de maneira geral foram utilizadas 2 duplas de plasmídeos pCas9-pCRISPR e pCas9-pTargetF, sendo que o primeiro par apresenta um sistema de edição CRISPR muito próximo ao presente naturalmente

em *Streptococcus pyogenes*, com os crRNAs precisando ser processados por uma RNase III guiada pelo tracrRNA e posteriormente fusionado ao tracrRNA para poderem guiar a Cas9 para o local alvo da mutação pretendida (Figura 56). Não foram encontrados trabalhos abordando como todo esse processo de montagem pode influenciar na eficiência da maquinaria CRISPR, entretanto algumas revisões cegam a reportar que nas construções mais recentes de plasmídeos CRISPR tem se optado pelo fusão dos crRNA e tracrRNA em um sgrRNA sintético capaz de guiar a Cas9 de forma eficiente e sem a necessidade de pré processamento (ALTENBUCHNER, 2016; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016). Essa segunda estratégia de montagem do RNA guia da Cas9 está presente no par de plasmídeos pCas-pTargetF, sendo essa diferença na montagem dos RNAs guias da Cas9 ilustrada na figura 56. Os próprios autores do artigo que descrevem a construção do par pCas9-pCRISPR chegam a mencionar a adoção de uma sequência N₃₀, ao invés do típico N₂₀, em função da perda de bases do crRNA ao ser processado em *E. coli* (JIANG et al., 2013). Sendo um sistema primeiramente desenhado para *E. coli* é esperado que possam haver incompatibilidades no seu funcionamento quando aplicado em um grupo de bactérias taxonomicamente distante como os *Bacillus*. No entanto também não é possível encontrar evidências que corroborem ou não a hipótese de ineficiência do par pCas9-pCRISPR na edição do RZ2MS9 dado que a troca dos N₃₀s por N₂₀s não representou nenhuma alteração nos resultados observados, bem como a troca dos plasmídeos pelo par pCas-pTargetF. Como a troca do par pCas9-pCRISPR pelo pCas-pTargetF não resultou em nenhuma alteração significativa nos resultados das tentativas de nocaute também se considera que esse processamento do RNA ocorrido no primeiro par não é o principal fator por trás da não obtenção de mutantes nas 5 tentativas realizadas.

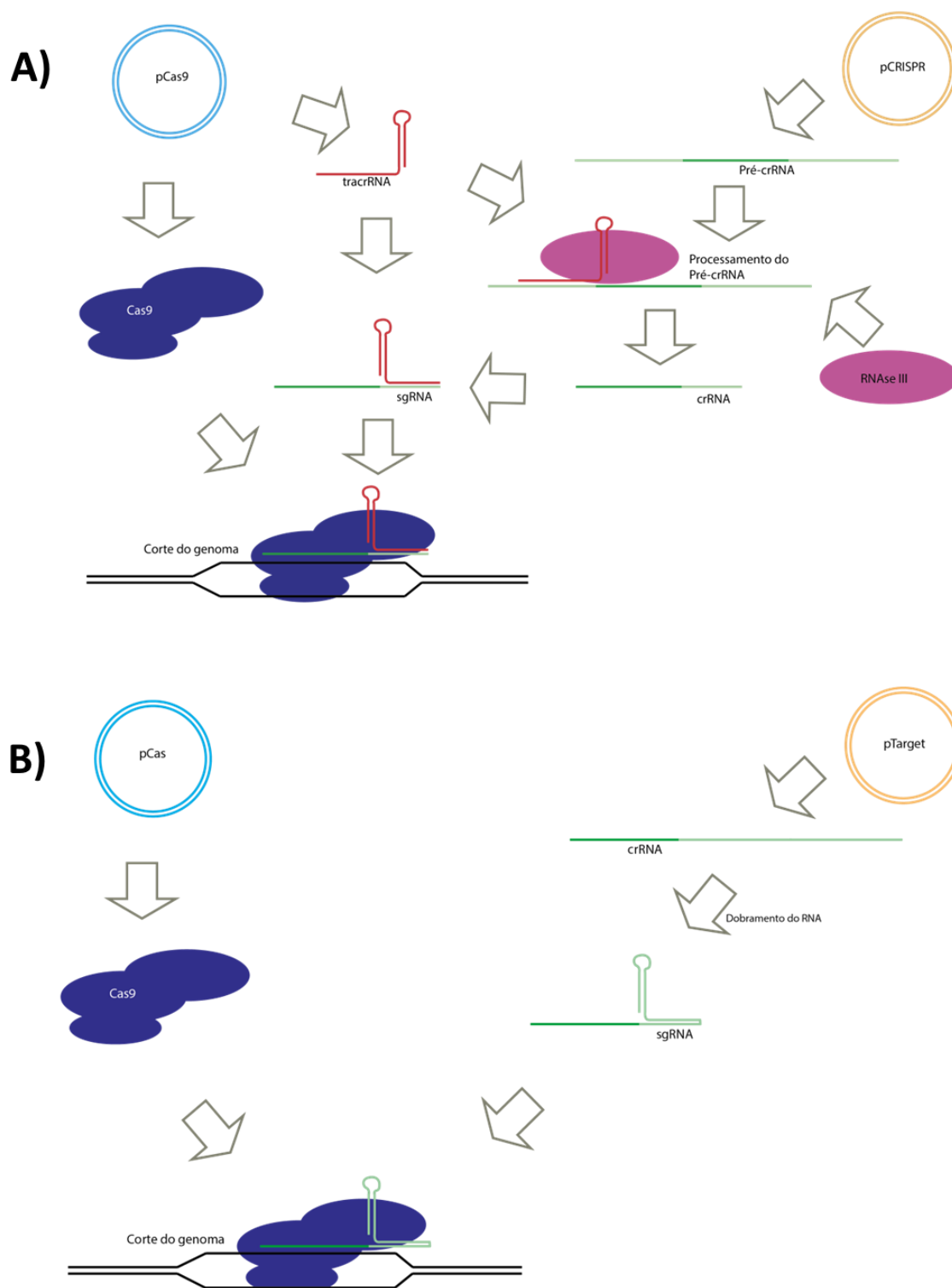


Figura 56. Processo de montagem dos RNAs guias da Cas9 nos dois pares de plasmídeos testados. A) Montagem do RNA guia no par pCas9-pCRISPR. A) Montagem do RNA guia no par pCas-pTargetF.

Em relação ao par pCas-pTargetF se acaba tendo o agravante da já obtenção de um mutante do RZ2MS9 utilizando esse par de plasmídeos CRISPR (FIGUEREDO et al., 2023). Uma possível causa para o mal funcionamento desse par de plasmídeos é a presença de um gRNA presente no plasmídeo pCas com alvo na região pMB1 do plasmídeo

pTargetF. Esse gRNA é considerado como não sendo expresso pelos autores originais, entretanto (LI et al., 2021) reporta que em algumas linhagens de *E. coli* pode haver um vazamento dessa expressão o que por consequência leva a clivagem dos plasmídeos pTargetF na célula e inviabiliza o processo de mutação induzida por CRISPR. Tal condição do par pCas-pTargetF se apresenta como uma boa hipótese para explicar ao menos parcialmente a ineficiência dos nocautes, entretanto a aparente perda dos plasmídeos pTargetF transformados no RZ2MS9 selvagem ao longo dos repiques também aponta que esse possível vazamento da expressão do gRNA com alvo no pTargetF pode não ser uma das únicas causas dos eventos observados.

Nessa perspectiva essa provável perda do pTargetF ao longo dos repiques adiciona um fator temporal aos fenômenos observados. Com a não manutenção dos plasmídeos nas células mesmo mantendo-se a pressão de seleção com o uso de antibióticos para o crescimento dos transformantes. Juntamente com o agravante da observação de ganho de resistência aos antibióticos mesmo nas colônias recuperadas no controle negativo das transformações. No caso da resistência a espectinomicina destaca-se a já alta resistência nativa o RZ2MS9 (aguentando naturalmente até 500 µg/ml do antibiótico em meio líquido) bem como o crescimento de colônias, mesmo que poucas, em placas com concentrações de até 800 µg/ml de espectinomicina. Não sendo encontrados no genoma do RZ2MS9 genes para resistência a espectinomicina, mas sendo encontrado pelo menos 9 genes relacionados a bombas para efluxo de antibióticos.

Tais bombas de efluxo são comumente referenciadas como um mecanismo comum para a ocorrência de múltiplas resistências em bactérias ao bombear ativamente compostos antimicrobianos para fora do citoplasma (BAY; ROMMENS; TURNER, 2008; KUMAR et al., 2020). Além disso, estas também são descritas como sendo o principal mecanismo por traz da resistência adaptativa das bactérias aos antibióticos, permitindo aumentos temporários e reversíveis de resistência sem que haja mutações no genoma da célula (MOTTA; CLUZEL; ALDANA, 2015). Tais informações parecem fornecer uma explicação sólida por traz do comportamento do RZ2MS9 frente a antibióticos, principalmente considerando que nas observações de microscopia observou-se uma predominância de células deformadas no crescimento com espectinomicina, indicando que o antibiótico ainda estava apresentando algum efeito sobre as células apesar de não as estar matando. O que a princípio corrobora com a hipótese de que este não estaria sendo degradado pela bactéria, mas sim que estava se utilizando de algum outro mecanismo de resistência.

Apesar de estar mais evidente com a espectinomicina também foram observados problemas com o uso do antibiótico cloranfenicol. Nesse caso não foi observado problemas de escape de células resistentes, com o RZ2MS9 selvagem sempre apresentando bastante sensibilidade ao antibiótico, mas com a instabilidade dos transformantes resistentes onde este frequentemente apresentava instabilidade e falhas de crescimento no antibiótico (figura 57). Sendo observado algumas vezes a morte desse *Bacillus* quando inoculado em meio líquido com o antibiótico bem como paradas repentinas no crescimento das células, que retomavam o crescimento normal após algumas horas estacionado (dados não mostrados). De forma quase oposta ao observado com a espectinomicina foram encontrados genes de resistência a cloranfenicol na anotação do genoma do RZ2MS9 apesar do problema nesse caso ser justamente a sensibilidade da bactéria aos antibióticos mesmo após transformada com plasmídeos que conferem resistência ao mesmo.

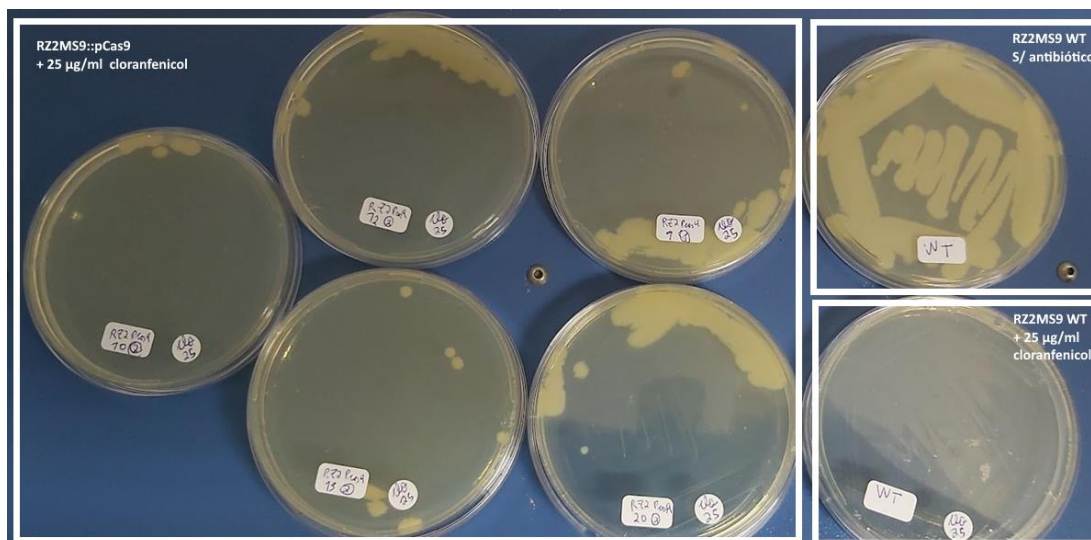


Figura 57. Crescimento do RZ2MS9::pCas9 em placas contendo cloranfenicol

Tais problemas com antibióticos no RZ2MS9 podem representar sérios desafios na transformação da bactéria, principalmente em função da aparente capacidade de resistência adaptativa que esse *Bacillus* apresenta. Dificultando seriamente o processo de seleção dos transformantes crescidos em placa bem como a manutenção dos plasmídeos nas células transformadas, dado que a pressão de seleção do antibiótico é bastante reduzida com a adaptação da bactéria ao crescimento na presença do mesmo. Ao mesmo tempo os comportamentos quase opostos observados com os antibióticos espectinomomicina e cloranfenicol bem como a detecção do plasmídeo pTargetF em grande parte dos transformantes avaliados na transformação teste do selvagem com esse plasmídeo também sugerem a existência de mais fatores governando o fenômeno observado.

De maneira geral a resistência adaptativa aos antibióticos se faz presente através do aumento gradual da concentração dos mesmos no meio de crescimento da bactéria (MOTTA; CLUZEL; ALDANA, 2015). Nesse sentido, a manutenção do plasmídeo contendo o gene de resistência pode fornecer uma grande vantagem as células transformadas frente à inoculação abrupta em meio com altas dosagens de antibiótico. À medida que os mecanismos de resistência adaptativa da bactéria vão sendo ativados essa pressão de seleção para manutenção dos plasmídeos com os genes de resistência poderia acabar se reduzindo ao ponto de reduzir drasticamente as vantagens adaptativas da manutenção do mesmo. Essa hipótese poderia fornecer uma explicação para a presença do pTargetF em grande parte dos transformantes avaliados na transformação bem como a posterior impossibilidade de detecção desse plasmídeo. Entretanto, a mesma não fornece uma explicação completa para a instabilidade de crescimento dos transformantes com o plasmídeo pCas9 em cloranfenicol.

Outro ponto relevante é que os genes de resistência presentes nos plasmídeos fornecem mecanismos diretos de degradação do antibiótico no meio de crescimento, sendo necessário algum outro processo adicional para explicar a rápida perda dos mesmos já após o primeiro repique pós transformação. O nocaute por CRISPR não depende da manutenção dos plasmídeos na célula precisando haver apenas um evento de clivagem do DNA para a realização do mesmo de forma que a manutenção, mesmo que temporária, do pTargetF nas células até o dia seguinte ao plaqueamento da transformação já forneceria uma janela de tempo grande o suficiente para expressão da maquinaria completa para o nocaute do gene alvo.

Nessa perspectiva voltamos a atenção para os plasmídeos em si. Todos os sequenciamentos realizados revelaram que os plasmídeos usados na transformação do RZ2MS9 estavam corretamente montados sendo assim

descartada a hipótese do fornecimento de plasmídeos defeituosos durante a transformação. Entretanto dos 4 plasmídeos utilizados apenas um (pCas) foi consistentemente detectado no transformante mesmo após vários repiques. Ao mesmo tempo todas as tentativas de sequenciamento do pCas presente no RZ2MS9::pCas produziram resultados de baixa qualidade, com grande ocorrência de ruído e com sequencias de nucleotídeos bastante distintas das presentes no plasmídeo original.

Concomitantemente a isso grande parte dos trabalhos realizando nocautes CRISPR em *Bacillus* analisados utilizam plasmídeos com duas origens de replicação, uma para *Bacillus* e outra para *E. coli* (BURBY; SIMMONS, 2017; ALTENBUCHNER, 2016; YI et al., 2018; ALTENBUCHNER, 2016; ZHOU et al., 2019; PÉREZ-ARELLANO; ZÚÑIGA; PÉREZ-MARTÍNEZ, 2001). Todos os plasmídeos utilizados nesse trabalho foram originalmente desenvolvidos para uso em *E. coli* apresentando origens de replicação do tipo ColE1/pUC (pTargetF e pCRISPR), pSC101 (pCas) e p15A (pCas9). Westbrook, Moo-Young e Chou (2016) utilizaram os plasmídeos pCas9 e pCRISPR para a montagem de novos plasmídeos para edição CRISPR em *Bacillus*, sendo ao final utilizados plasmídeos com origem de replicação ColE1. Entretanto, os autores também reportam grandes dificuldades de transformação dos plasmídeos em *B. subtilis*, sendo necessária a toca de múltiplos promotores e outros elementos dos plasmídeos para que estes tivessem boa capacidade de multiplicação tanto em *B. subtilis* quanto em *E. coli*.

Em relação aos promotores usados nos plasmídeos utilizados no presente trabalho não foram encontradas muitas informações a respeito do funcionamento deles em *Bacillus*. Para o J23119 (presente no plasmídeo pTargetF) Liu et al. (2017) mencionam que este não funcionou eficientemente em *Staphylococcus aureus*, mas menciona o funcionamento do mesmo em *Clostridium*. Funcionamento também observado por Zhang et al. (2022) em diferentes isolados do gênero *Clostridium*, tendo uma expressão mais baixa do que a em *E. coli*, mas ainda apresentando uma boa expressão. Já Zhou et al. (2019) reportaram mudanças significativas na eficiência de edição por CRISPR em *B. licheniformis* com a troca de promotores da Cas9, entretanto neste trabalho a menor eficiência encontrada ainda foi de 71,6%. Independentemente, o sucesso na obtenção do mutante *ipdC* do RZ2MS9 utilizando os plasmídeos pCas e pTargetF demonstra que a expressão da maquinaria CRISPR nos mesmos é pelo menos a mínimo necessária para a ocorrência de nocautes sendo assim considerado como pouco provável o efeito dos promotores na não obtenção de mutantes.

Voltando as origens de replicação dos plasmídeos Kreft, Bernhard e Goebel (1978) apontam que plasmídeos com origem de replicação do tipo ColE1/pUC são instáveis em *B. subtilis*. Já Sullivan, Yasbin e Young (1984) reportam sucesso na clonagem de plasmídeos com origem de replicação ColE1/pUC em *B. subtilis*, mas somente após várias modificações nos mesmos. Os mesmos autores também reportam grandes variações na taxa de replicação em função de cada plasmídeo (mesmo com a mesma origem de replicação) sendo que dos 3 plasmídeos com origem do tipo ColE1/pUC avaliados um não apresentava problemas de replicação, um permanecia em 70% a 90% das células filhas e um terceiro permanecia em menos de 1% das células filhas. Meijer (1995) realizou uma classificação das origens de replicação de plasmídeos com base em suas características, como dependência de proteínas específicas para a duplicação, afinidade com a DnaA e estrutura do sitio de replicação. Nessa classificação a origem pSC101 é classificada como sendo do tipo A (sendo uma origem tanto para plasmídeos de gram positivas quanto de gram negativas) e a ColE1/pUC como sendo uma origem do tipo B (somente para plasmídeos de Gram negativas). Ao mesmo tempo os autores também reportam problemas na transformação de *B. subtilis* com um plasmídeo com origem de replicação do tipo pSC101. Já para a origem tipo p15A não foram encontradas informações do uso de plasmídeos com essa origem em *Bacillus*. Duarte e Monteiro (2021) classificaram a mesma como sendo somente para replicação de bactérias Gram negativas, também utilizando a estratégia das duas origens de replicação na construção de um plasmídeo que se replique

tanto em *Lactococcus* quanto em *E. coli*. Essa mesma linha de raciocínio foi adotada por Pérez-Arellano, Zúñiga e Pérez-Martínez (2001) para construção de plasmídeos para uso em bactérias lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacilli* e *Bacillus*) e que consiga ser replicado em *E. coli*, utilizando as origens pAMBeta1 e pWV01 para replicação nas bactérias lácticas e p15A, pWV01 e ColE1 para replicação em *E. coli*.

Nesse sentido as instabilidades de comportamento com a replicação de plasmídeos com a origem ColE1/pUC em *Bacillus* reportadas por Sullivan, Yasbin e Young (1984) bem como os problemas de transformação reportados por Meijer (1995) ao transformar um *B. subtilis* com um plasmídeo com origem pSC101 demonstram que apesar do tipo de origem de replicação ser um fator relevante para a manutenção dos plasmídeos transformados na bactéria esta não é um fator determinante. A única das origens de replicação classificadas tanto para Gram positivas quanto para Gram negativas (pSC101) também está relacionada ao único plasmídeo cuja permanência no RZ2MS9 foi possível de ser atestada por PCR (pCas). De tal modo especula-se essa ineficiência na replicação dos plasmídeos junto com os problemas de resistência adaptativa do RZ2MS9 aos antibióticos possam ser dois fatores relevantes na ineficiência dos nocautes tentados. À medida que a bactéria vai ganhando resistência e a presença dos plasmídeos de resistência deixa de ser um fator definidor da sobrevivência das células a baixa eficiência de replicação dos plasmídeos nas células faz com que aos poucos a presença deste vá se reduzindo nas células filhas ao ponto de não ser mais detectável. Processo esse que pode ter sido ainda mais acelerado no par pCas-pTargetF em função do RNA guia com alvo no pTargetF. Ao mesmo tempo a escassez de informação recente de como essas origens de replicação se comportam nos diferentes gêneros bacterianos, bem como o uso destas para plasmídeos utilizados de maneira genérica em uma ampla gama de microrganismos (não somente *E. coli*) são pontos relevantes e que também devem ser levados em consideração.

Adicionalmente, também se ressalta o papel dos cassetes de DNA doadores na eficiência desse processo de nocaute. Zhou et al. (2019) reportam a necessidade de fornecimento de um cassete de DNA doador para nocaute CRISPR em *B. licheniformis*, apontando a ineficiência dos mecanismos de reparo não homólogo de DNA no isolado estudado. Já Westbrook, Moo-Young e Chou (2016) reporta que para *B. subtilis* o comprimento de homologia dos cassetes de DNA doador deve ter entre 500 pb. a 1000 pb. para uma alta eficiência de nocaute (acima de 90%). Essa eficiência diminuiu para pouco mais de 40% com um comprimento de homologia de 300 pb. não sendo obtidos mutantes com o uso de cassetes com comprimento de homologia de 100pb. Somado a isso Sachla, Alfonso e Helmann (2021) e Westbrook, Moo-Young e Chou (2016) reportam que o fornecimento dos cassetes de DNAs doadores clonados em plasmídeos na transformação, em vez do fornecimento deste como produtos de PCR, aumenta as eficiências de nocaute. Sendo este procedimento observado em vários trabalhos de nocaute CRISPR em *Bacillus* (SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021; WESTBROOK; MOO-YOUNG; CHOU, 2016; PRICE et al., 2019; SACHLA; ALFONSO; HELMANN, 2021).

No presente trabalho os cassetes foram fornecidos como produtos de PCR e tinham comprimento de homologia variável entre 200 pb. a 1055 pb. o que pode ter ajudado a contribuir ainda mais com a ineficiência do nocaute. Sendo altamente recomendável a montagem de novos cassetes e a clonagem deles em plasmídeos para a execução de novas tentativas de nocaute no RZ2MS9.

Ao mesmo tempo a transformação com múltiplos plasmídeos gera grandes desafios, principalmente em relação às marcas de seleção disponíveis, especialmente levando em conta a capacidade do RZ2MS9 de se adaptar aos antibióticos. Essas limitações em relação à disponibilidade de marcas de seleção para a transformação é um dos principais fatores argumentados a favor da montagem de plasmídeos tudo em um (cas9 e gRNA no mesmo plasmídeo), sendo que a opção por um plasmídeo CRISPR tudo em um foi encontrada em muitos dos trabalhos de edição CRISPR

em *Bacillus* encontrados (YI et al., 2018; ALTENBUCHNER, 2016; ZHOU et al., 2019; BURBY; SIMMONS, 2017; ALTENBUCHNER, 2016). De maneira geral estratégias de nocaute CRISPR utilizando dois plasmídeos (como as utilizadas no presente trabalho) costumam ser descritas como mais eficientes além de permitirem uma maior flexibilidade no emprego da maquinaria do sistema CRISPR-Cas9 (DIALLO et al., 2020; LIM et al., 2019; ALVERO; MOR, 2021). Entretanto o uso de dois plasmídeos também aumenta a complexidade do processo requerendo dois marcadores de seleção, duas transformações e em alguns casos os plasmídeos podem apresentar incompatibilidade entre si ou alguma outra instabilidade no isolado alvo no nocaute que acabe inviabilizando o processo (DIALLO et al., 2020; LIM et al., 2019; ALVERO; MOR, 2021).

No presente trabalho chegou a ser montado um plasmídeo CRISPR tudo em um, no caso o plasmídeo pCas9 carregando o N₃₀ sigF2. Entretanto a baixa eficiência de edição do plasmídeo pCas9 acabou fazendo com que essa opção fosse descartada. Sendo que de maneira geral a facilidade de edição dos plasmídeos acabou sendo muitas vezes o critério mandante na escolha dos mesmos para as tentativas de nocaute. A escolha do par pCas9-pCRISPR em função do sistema de clonagem utilizando enzimas de restrição do tipo IIS (Que cortam em uma região distinta do sítio de reconhecimento, permitindo a remoção destes durante a clonagem) de fato se mostrou mais prático e rápido para inserção dos protoespaçadores nos plasmídeos do que o sistema de clonagem convencional anteriormente utilizado no pTargetF, permitindo até um pré-seleção confiável dos plasmídeos através da digestão dos mesmos com *BsaI*. Ao mesmo tempo, apesar de produzir muitos falsos positivos, a clonagem por *gap repair* também representou maiores praticidades em relação aos métodos de clonagem convencionais. Dessa forma a montagem dos plasmídeos para edição por CRISPR-Cas9 não chegou a representar um desafio nesse trabalho, mas sim o funcionamento dos mesmos após a sua transformação no RZ2MS9.

Considerando isso algumas propostas podem ser feitas para futuras tentativas de edição CRISPR no RZ2MS9. A primeira seria o uso de plasmídeos com origem de replicações e promotores mais adequados para *Bacillus*, sendo que por mais que a expressão da maquinaria CRISPR-Cas9 não precise ser contínua para a realização do nocaute o uso de plasmídeos e promotores mais adequados para o gênero acaba conferindo algum aumento a eficiência dos nocautes pretendidos de acordo com a literatura já citada. Um segundo ponto seria a adoção de um plasmídeo tudo em um, reduzindo a necessidade de transformações, o que pode mitigar dois dos problemas encontrados nesse trabalho, a resistência adaptativa do RZ2MS aos antibióticos e a perda gradativa dos plasmídeos ao longo do tempo de repique. No caso da manutenção pela opção do uso de sistema de dois plasmídeos se propõe um terceiro ponto da transformação simultânea da bactéria com os dois plasmídeos, ou pelo mesmo de forma sucessiva, de fôrma a encurtar os processos de transformação e reduzir a probabilidade de perda dos plasmídeos. Sendo que nesse terceiro ponto também se recomenda o uso de plasmídeos que dispensem o processo de montagem do RNA guia da cas9, possivelmente evitando assim os problemas de ineficiência do nocaute observados nas tentativas de dupla transformação com o par pCas9-pCRISPR.

Adicionalmente também se aponta para avaliação prévia de como os plasmídeos escolhidos interferem no processo alvo, evitando os problemas com fenótipos falsos positivos encontrados neste trabalho. Especificamente no caso do plasmídeo pCas foi observado um forte efeito deste retardando a esporulação do RZ2MS9, não tendo sido encontrado nenhuma informação na literatura que possa explicar os possíveis motivos por traz dessa ocorrência. Tal modificação do fenótipo representa um desafio não somente para o processo de seleção (inviabilizando-o) mas também para o uso de um possível mutante obtido utilizando esse plasmídeo, requerendo uma etapa a mais de cura do plasmídeo para uma melhor avaliação dos efeitos da mutação. Adicionalmente o efeito de repressão da esporulação nos transformantes RZ2MS9::pCas9-pCRISPR e o aprofundamento da repressão nos transformantes RZ2MS9::pCas-

pTargetF também levantam questionamentos de como essa maquinaria CRISPR pode estar interferindo no metabolismo da bactéria, mesmo não realizando o nocaute. A não observação do fenótipo característico de formação duplo septo ao se alterar a expressão de *sigF* nos transformantes onde esse gene era o alvo no nocaute parece indicar que o processo de repressão observado pode não ter se dado por um direcionamento da maquinaria CRISPR aos genes alvo, mas sim por alguma outra alteração no ciclo celular. Ao mesmo tempo não foram encontrados na literatura a descrição de outros fenômenos parecidos que possam embasar uma hipótese para o ocorrido. Nesse ponto também se recomenda o uso de plasmídeos com sistema de cura para as futuras tentativas de edição CRISPR do RZ2MS9.

Por fim destaca-se que por mais que a técnica de CRISPR-Cas9 possa ter representado uma revolução na área de manipulação genética de organismos um cuidado de adequação da maquinaria CRISPR utilizada ao hospedeiro alvo pode se fazer necessário. Por mais que a maquinaria CRISPR não precise ser continuamente expressa de forma eficiente para a realização do nocaute os pequenos fatores de ineficiência podem acabar se somando e inviabilizando completamente a realização do mesmo, como é hipotetizado para o presente caso. Onde a confluência de fatores como a baixa compatibilidade dos plasmídeos utilizados com o hospedeiro, capacidade de resistência adaptativa do RZ2MS9 a antibióticos, produção de RNAs guias com alvo nos próprios plasmídeos (no caso do par pCas-pTargetF) e o uso de cassetes de DNA curtos e possivelmente de baixa qualidade provavelmente se somaram para inviabilizar completamente as tentativas de nocaute realizadas.

Referências

- ALMEIDA, Jaqueline Raquel de *et al.* *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **Environmental Microbiology Reports**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 812-821, 25 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.13004>.
- ALOO, B.N.; MAKUMBA, B.A.; MBEGA, E.R.. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 219, p. 26-39, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>.
- ALTENBUCHNER, Josef. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 17, p. 5421-5427, set. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01453-16>.
- ALVERO, Ayesha B.; MOR, Gil G. (ed.). **Detection of Cell Death Mechanisms**. New York: Springer Nature, 2021. 239 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1162-3>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- BATISTA, Bruna Durante *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 206, p. 33-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- BATISTA, Bruna Durante *et al.* The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 203, n. 7, p. 3869-3882, 19 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02361-z>.
- BAY, Denice C.; ROMMENS, Kenton L.; TURNER, Raymond J.. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 1778, n. 9, p. 1814-1838, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.015>.

- BURBY, Peter; SIMMONS, Lyle. CRISPR/Cas9 Editing of the *Bacillus subtilis* Genome. **Bio-Protocol**, [S.L.], v. 7, n. 8, 2017. Bio-Protocol, LLC. <http://dx.doi.org/10.21769/bioprotoc.2272>.
- CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C.. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S.L.], v. 58, n. 5, p. 235-263, 9 maio 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/em.22087>.
- CHEN, Zhuo *et al.* *Bacillus subtilis* Histidine Kinase KinC Activates Biofilm Formation by Controlling Heterogeneity of Single-Cell Responses. **Mbio**, [S.L.], v. 13, n. 1, 22 fev. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01694-21>.
- DIALLO, Mamou *et al.* Adaptation and application of a two-plasmid inducible CRISPR-Cas9 system in *Clostridium beijerinckii*. **Methods**, [S.L.], v. 172, p. 51-60, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.022>.
- DUARTE, Sofia O.D.; MONTEIRO, Gabriel A.. Plasmid Replicons for the Production of Pharmaceutical-Grade pDNA, Proteins and Antigens by *Lactococcus lactis* Cell Factories. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 1379, 30 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22031379>.
- DUBNAU, Eugenie J. *et al.* A protein complex supports the production of Spo0A-P and plays additional roles for biofilms and the K-state in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 606-624, 2 jun. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13411>.
- ESWARAMOORTHY, Prahathees *et al.* The Threshold Level of the Sensor Histidine Kinase KinA Governs Entry into Sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 192, n. 15, p. 3870-3882, ago. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00466-10>.
- FIGUEREDO, Everthon Fernandes *et al.* The key role of indole-3-acetic acid biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 in promoting maize growth revealed by the *ipdC* gene knockout mediated by the CRISPR-Cas9 system. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 266, p. 127218, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127218>.
- FIGUEREDO, Everthon Fernandes. **Nocaute do gene ipdC no Bacillus sp. (RZ2MS9) com a técnica de CRISPRCas9 e influência sobre a biossíntese do AIA dependente do L-triptofano**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2019.tde-22012019-175701>. Acesso em: 4 dez. 2023.
- FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. Aguilar. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 987-994, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832004000600007>.
- GRAU, Roberto R. *et al.* A Duo of Potassium-Responsive Histidine Kinases Govern the Multicellular Destiny of *Bacillus subtilis*. **Mbio**, [S.L.], v. 6, n. 4, set. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00581-15>.
- HIGGINS, Douglas; DWORKIN, Jonathan. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 131-148, jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>.
- HOLLINGSHEAD, Susan; VAPNEK, Daniel. Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. **Plasmid**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 17-30, jan. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0147-619x\(85\)90052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0147-619x(85)90052-6).

- HOON, Michiel J.L. de; EICHENBERGER, Patrick; VITKUP, Dennis. Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. **Current Biology**, [S.L.], v. 20, n. 17, p. R735-R745, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.031>.
- HUANG, Qiubin *et al.* SpoVG is an important regulator of sporulation and affects biofilm formation by regulating Spo0A transcription in *Bacillus cereus* 0–9. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 21, n. 1, 8 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-021-02239-6>.
- JACOBUS, Ana Paula; GROSS, Jeferson. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. e0119221, 16 mar. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119221>.
- JIANG, Min *et al.* Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 535-542, nov. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02148.x>.
- JIANG, Wenyan *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 233-239, 29 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2508>.
- JIANG, Yu *et al.* Multigene Editing in the *Escherichia coli* Genome via the CRISPR-Cas9 System. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 81, n. 7, p. 2506-2514, abr. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.04023-14>.
- KREFT, J.; BERNHARD, K.; GOEBEL, W.. Recombinant plasmids capable of replication in *B. subtilis* and *E. coli*. **Molecular And General Genetics Mgg**, [S.L.], v. 162, n. 1, p. 59-67, jan. 1978. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00333851>.
- KUMAR, Sanath *et al.* Functional and Structural Roles of the Major Facilitator Superfamily Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 266, 16 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8020266>.
- LECCA, Paola *et al.* Time Series Analysis of the *Bacillus subtilis* Sporulation Network Reveals Low Dimensional Chaotic Dynamics. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, 7 nov. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01760>.
- LI, Hong. Structural Principles of CRISPR RNA Processing. **Structure**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 13-20, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2014.10.006>.
- LI, Q I *et al.* A modified pCas/pTargetF system for CRISPR-Cas9-assisted genome editing in *Escherichia coli*. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 620-627, 1 mar. 2021. China Science Publishing & Media Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmab036>.
- LIM, Hayeon *et al.* Programmed gRNA Removal System for CRISPR-Cas9-Mediated Multi-Round Genome Editing in *Bacillus subtilis*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, 21 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01140>.
- LIM, Hayeon; CHOI, Soo-Keun. Programmed gRNA Removal System for CRISPR-Cas9-Mediated Multi-Round Genome Editing in *Bacillus subtilis*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, 21 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01140>.
- LIU, Qi *et al.* CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Staphylococcus aureus*. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [S.L.], v. 49, n. 9, p. 764-770, 1 set. 2017. China Science Publishing & Media Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmx074>.

- LIU, Weipeng *et al.* Sensor kinase *KinB* and its pathway-associated key factors sense the signal of nutrition starvation in sporulation of *Bacillus subtilis*. **Microbiologyopen**, [S.L.], v. 7, n. 3, 3 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.566>.
- MARTINS, Paulo Geovani Silva. **Prospecção de proteínas e genes de isolados de *Bacillus thuringiensis* associados ao desenvolvimento do controle biológico de praga em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2016. 170 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17918>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- MEESKE, Alexander J. *et al.* High-Throughput Genetic Screens Identify a Large and Diverse Collection of New Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. **Plos Biology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. e1002341, 6 jan. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002341>.
- MEIJER, Wilhelmus Johannes Jozef. **Replication and maintenance of plasmids in *Bacillus subtilis***. [S.I.]: University Of Groningen, 1995. 221 p. Disponível em: <https://research.rug.nl/en/publications/replication-and-maintenance-of-plasmids-in-bacillus-subtilis>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- MIROUZE, Nicolas; PREPIAK, Peter; DUBNAU, David. Fluctuations in *spo0A* Transcription Control Rare Developmental Transitions in *Bacillus subtilis*. **Plos Genetics**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. e1002048, 28 abr. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002048>.
- MOTTA, Santiago Sandoval; CLUZEL, Philippe; ALDANA, Maximino. Adaptive Resistance in Bacteria Requires Epigenetic Inheritance, Genetic Noise, and Cost of Efflux Pumps. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. e0118464, 17 mar. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118464>.
- PÉREZ-ARELLANO, Isabel; ZÑIGA, Manuel; PÉREZ-MARTÍNEZ, Gaspar. Construction of Compatible Wide-Host-Range Shuttle Vectors for Lactic Acid Bacteria and *Escherichia coli*. **Plasmid**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 106-116, set. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/plas.2001.1531>.
- PRICE, Marcus A. *et al.* CRISPR-Cas9 In Situ engineering of subtilisin E in *Bacillus subtilis*. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. e0210121, 7 jan. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0210121>.
- SACHLA, Ankita J.; ALFONSO, Alexander J.; HELMANN, John D.. A Simplified Method for CRISPR-Cas9 Engineering of *Bacillus subtilis*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 9, n. 2, 31 out. 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00754-21>.
- SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W.. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. [S.I.]: Cold Spring Harbor Laboratory Pr., 2006. 2344 p.
- SCHURTER, Walter; GEISER, Martin; MATHÉ, Danièle. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned delta-endotoxin gene. **Molecular And General Genetics Mgg**, [S.L.], v. 218, n. 1, p. 177-181, jul. 1989. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00330581>.
- SHEMESH, Moshe; CHAI, Yunrong. A Combination of Glycerol and Manganese Promotes Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* via Histidine Kinase KinD Signaling. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 195, n. 12, p. 2747-2754, 15 jun. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00028-13>.
- SHI, Lei *et al.* Evolutionary Analysis of the *Bacillus subtilis* Genome Reveals New Genes Involved in Sporulation. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 1667-1678, 15 fev. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msaa035>.

- SULLIVAN, Mark A.; YASBIN, Ronald E.; YOUNG, Frank E.. New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. **Gene**, [S.L.], v. 29, n. 1-2, p. 21-26, jul. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90161-6](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(84)90161-6).
- TAN, Irene S.; RAMAMURTHI, Kumaran S.. Spore formation in *Bacillus subtilis*. **Environmental Microbiology Reports**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 212-225, 17 dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12130>.
- TOJO, Shigeo; HIROOKA, Kazutake; FUJITA, Yasutaro. Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, Necessary for Sporulation Initiation, Is under Positive Stringent Transcription Control. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 195, n. 8, p. 1656-1665, 15 abr. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.02131-12>.
- WANG, Miaomiao *et al.* Single-gene regulated non-spore-forming *Bacillus subtilis*: construction, transcriptome responses, and applications for producing enzymes and surfactin. **Metabolic Engineering**, [S.L.], v. 62, p. 235-248, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.008>.
- WESTBROOK, Adam W.; MOO-YOUNG, Murray; CHOU, C. Perry. Development of a CRISPR-Cas9 Tool Kit for Comprehensive Engineering of *Bacillus subtilis*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 16, p. 4876-4895, 15 ago. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01159-16>.
- WIGLEY, Dale B.. Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of *recBCD*, *addAB* and *adnAB*. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 9-13, 3 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2917>.
- XU, Sunde *et al.* The *spo0A-sinI-sinR* Regulatory Circuit Plays an Essential Role in Biofilm Formation, Nematicidal Activities, and Plant Protection in *Bacillus cereus* AR156. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S.L.], v. 30, n. 8, p. 603-619, ago. 2017. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-02-17-0042-r>.
- YAN, Fang *et al.* The *comER* Gene Plays an Important Role in Biofilm Formation and Sporulation in both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, 28 jun. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01025>.
- YI, Haidong *et al.* AcrFinder: genome mining anti-crispr operons in prokaryotes and their viruses. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 48, n. W1, p. W358-W365, 13 maio 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa351>.
- YI, Yanglei *et al.* Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 20, n. 12, p. 4245-4260, 26 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14305>.
- ZHANG, Jinfang *et al.* Multiple Modular Engineering of *Bacillus Amyloliquefaciens* Cell Factories for Enhanced Production of Alkaline Proteases From *B. Clausii*. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 10, 14 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.866066>.
- ZHANG, Kang; DUAN, Xuguo; WU, Jing. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, 16 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27943>.
- ZHANG, Yanchao *et al.* Heterologous Gene Regulation in Clostridia: rationally designed gene regulation for industrial and medical applications. **Acs Synthetic Biology**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 3817-3828, 20 out. 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssynbio.2c00401>.

ZHOU, Cuixia *et al.* Development and application of a CRISPR/Cas9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 122, p. 329-337, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.170>.

ZHOU, Cuixia *et al.* Optimization of alkaline protease production by rational deletion of sporulation related genes in *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 18, n. 1, 25 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1174-1>.

Apêndices

APÊNDICE A.

Apêndice 1: Lista de trabalhos avaliando o nocaute de genes relacionados a esporulação em *Bacillus*

Estudo	Genes avaliados	Organismos estudados	Técnica de Nocaute
(WANG et al., 2020)	<i>spo0A</i> , <i>spoIIIE</i> e <i>spoIVB</i>	<i>B. subtilis</i> TS1726 e <i>B. subtilis</i> 168	Recombinação homóloga
(MEESKE et al., 2016)	<i>citB</i> , <i>spoIIIE</i> , <i>oppA</i> , <i>skjF</i> , <i>spoIIE</i> , <i>spoIVCA</i> , <i>spoIVA</i> , <i>spoVD</i> , <i>oppB</i> , <i>addA</i> , <i>spoVB</i> , <i>oppC</i> , <i>clpC</i> , <i>asnO</i> , <i>pckA</i> , <i>pgcA</i> , <i>ugtP</i> , <i>sigE</i> , <i>spoIVB</i> , <i>kinA</i> , <i>rjyB</i> , <i>dnaK</i> , <i>spoIIAE</i> , <i>yqfD</i> , <i>yjbJ</i> , <i>aspB</i> , <i>spoIIP</i> , <i>bkdR</i> , <i>dacB</i> , <i>sucC</i> , <i>gapB</i> , <i>araR</i> , <i>addB</i> , <i>resB</i> , <i>sucD</i> , <i>citZ</i> , <i>lspA</i> , <i>oppF</i> , <i>yabQ</i> , <i>mdb</i> , <i>spoIIIJ</i> , <i>gsaB</i> , <i>ruvB</i> , <i>yerB</i> , <i>yqbT</i> , <i>spoIVFB</i> , <i>ywmB</i> , <i>icd</i> , <i>ecsB</i> ,	<i>B. subtilis</i> 168 e <i>B. subtilis</i> PY79	Inserção de transposon
(ZHANG; DUAN; WU, 2016)	<i>stfC</i> , <i>spoIIAC</i> , <i>nprE</i> , <i>aprE</i> e <i>amyE</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051a	CRISPR-Cas9
(HUANG et al., 2021)	<i>spoVG</i> , <i>abrB</i> , <i>sinI</i> , <i>sinR</i> e <i>spo0A</i>	<i>B. cereus</i> 0–9	Recombinação homóloga
(SHI et al., 2020)	<i>Spo0E</i> , <i>yscB</i> , <i>ygaB</i> , <i>yqkC</i> , <i>yixC</i> , <i>yvcB</i> , <i>yjcQ</i> , <i>ykeZB</i> , <i>yppM</i> , <i>yueH</i> , <i>ygzC</i> , <i>yqkB</i> , <i>yizD</i> , <i>yrzL</i> , <i>yusN</i> , <i>yphF</i> , <i>yybN</i> , <i>ybdN</i> , <i>ybjQ</i> , <i>yusG</i> , <i>yutD</i> , <i>yutG</i> , <i>ydeJ</i> , <i>yfiA</i> , <i>yitR</i> , <i>yjaU</i> , <i>ykeZS</i> , <i>ylqD</i> , <i>yoaF</i> , <i>yoeD</i> , <i>ypoC</i> , <i>yppF</i> , <i>yqgU</i> , <i>ytzL</i> , <i>yugN</i> , <i>yutC</i> , <i>ywmF</i> e <i>ymsA</i>	<i>B. subtilis</i> BS33	Recombinação homóloga
(CHEN et al., 2022)	<i>kinA</i> , <i>kinB</i> , <i>kinC</i> , <i>kinD</i> e <i>sda</i>	<i>B. subtilis</i> 3A38	Recombinação homóloga
(ESWARAMOORTHY et al., 2010)	<i>sigH</i> , <i>kinA</i> , <i>spo0A</i> , <i>amyE</i> , <i>thrC</i> , <i>kinB</i> , <i>abrB</i> , <i>erm</i> , <i>thrC</i> ,	<i>B. subtilis</i> PY79	Recombinação homóloga
(LIU et al., 2018)	<i>kinB</i> , <i>kinA</i> e <i>kbaA</i>	<i>B. subtilis</i> 168	Recombinação homóloga
(MIROUZE; PREPIAK; DUBNAU, 2011)	<i>yjbM</i> , <i>ywaC</i> , <i>codY</i> e <i>sigH</i>	<i>B. subtilis</i> BD630	Recombinação homóloga
(XU et al., 2017)	<i>Spo0A</i> , <i>sinI</i> e <i>sinR</i>	<i>B. subtilis</i> 3610 e <i>B. cereus</i> AR156	Recombinação homóloga
(YAN et al., 2016)	<i>Spo0A</i> , <i>yqeK</i> , <i>sinR</i> , <i>comER</i> e <i>sda</i>	<i>B. subtilis</i> 3610	Recombinação homóloga

(SHEMESH; CHAI, 2013)	<i>kinA, kinB, kinC, kinD, kinE, spo0F, spo0B, spo0A e abrB</i>	<i>B. subtilis</i> NCIB3610	Recombinação homóloga
(ZHANG et al., 2022)	<i>Upp, eps, spo0A, sigE, sigF, nprE, aprE, epr, mpr, vpr, bpr e aprX</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC11018	Recombinação homóloga
(ZHOU et al., 2019)	<i>spo0A, sigF e sigE</i>	<i>B. licheniformis</i> 2709	CRISPR-Cas9
(DUBNAU et al., 2016)	<i>ylbF, ymcA, yaaT, spo0F e rny</i>	<i>B. subtilis</i> 168	Recombinação homóloga
(TOJO; HIROOKA; FUJITA, 2013)	<i>codY, kinA, kinB, spo0H, spo0A, aprE e abrB,</i>	<i>B. subtilis</i> 168	Recombinação homóloga
(GRAU et al., 2015)	<i>spo0A, kinA, kinB, kinC, kinD, kinE, sigF, sinR, hag, eps e spo0F</i>	<i>B. subtilis</i> NCIB3610	Recombinação homóloga
(LIU et al., 2018)	<i>kinA, kinB, kbaA e kapB</i>	<i>B. subtilis</i> 168	Recombinação homóloga
(SAMBROOK; RUSSELL, 2006)	<i>sigF</i>	<i>B. coagulans</i> DSM 1	Recombinação homóloga
(YI et al., 2018)	<i>sigF</i>	<i>B. subtilis</i> HS3 e <i>B. mycoides</i> EC18	CRISPR-Cas9

APÊNDICE B. Sequência do Cassete SigF D1

5'-

CACGAGCTAAAAGCGTTAATTCAAAAAAGTCAAGATGGAGATCAACAAGCGAGAGATACAATCGTT
CAAAGTAATATGCGCCTCGTTTGGTCGGTTG **GGATCC** CGATGGAGATCCAATCACTATTTTAGATCA
AATTGCAGATCAATCTGAAGCGAAATGGTTCGATAAAAATTGCTTTAAAAGAAGCGATTAGAGAACTA

-3'

Em roxo foi destacado um sitio de corte de *Bam*HI adicionado como marca para seleção dos mutantes.

APÊNDICE C.

Lista de primers

Primer	Função	Sequência (5'-3')
KinA_F_1	Amplificação do gene <i>kinA</i>	TCTAGACGTTTGCGAAACCA
KinA_R_1	Amplificação do gene <i>kinA</i>	TGGATTGCAAGATGAGATGAA
KinA_F_2	Amplificação do gene <i>kinA</i>	TCCTGCATTCACTTTGCAAA
KinA_R_2	Amplificação do gene <i>kinA</i>	TGGATTGCAAGATGAGATGAA
SigF_F_1	Amplificação do gene <i>sigF</i>	AACCTCAGTTAAAGGACCACGA
SigF_R_1	Amplificação do gene <i>sigF</i>	TGTACTTGCGAAATGCCTATG
SigF_F_2	Amplificação do gene <i>sigF</i>	GTAATATGCGCCTCGTTTGG
SigF_R_2	Amplificação do gene <i>sigF</i>	AACCATTTTCGTTTCAGATTGA
KinA O UP F	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	TAGGAGCCCATATTTCTGAGC-3'
KinA O UP R	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	TTTGCATCGCTTCGCGTATA CACCAGTAAAGACGA
KinA O DOWN F	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	CTGGTGTATACGCGAAGCG ATGCAAAATGGCGGAAA
KinA O DOWN R	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	CATTAATCCTAGTCCCTGTGCC
KinA O 2 UP F	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	GGAGCCCATATTTCTGAGCA
KinA O 2 UP R	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	TGCGAGCTTCTCATCTGATT TTTCAAGTGGCTTCA
KinA O 2 DOWN F	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	TTGAAAAATCAGATGAGAA GCTCGCAGTAGTCG
KinA O 2 DOWN R	Montagem do cassete para o nocaute de <i>kinA</i>	CGCCATAAATTGACTCGTGA
SigF O-2 UP F	Montagem do cassete para o nocaute de <i>sigF</i>	GGGAAAAGACACGCAATCAT
SigF O-2 UP R	Montagem do cassete para o nocaute de <i>sigF</i>	CGCTTCAGATTGATCGCTTGT TGATCTCCATCTT
SigF O-2 DOWN F	Montagem do cassete para o nocaute de <i>sigF</i>	GATCAACAAGCGATCAATCT GAAGCGAAATGGTT
SigF O-2 DOWN R	Montagem do cassete para o nocaute de <i>sigF</i>	GCCTATGCGCTCTGCTACTT
1330F	Amplificação do pTargetF para clonagem dos N ₂₀ por <i>Gap Repair</i>	CATAAGTTCCTATTCGGAAGT TCCGCGAACGCGTAAAGGA
1330R	Amplificação do pTargetF para clonagem dos N ₂₀ por <i>Gap Repair</i>	CTTCGGAATAGGAACTTATG AGCTCAGCCAATCGACTGGC
pTF N20 Kina1-F	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ Kina1 por <i>Gap Repair</i>	GAACCATCAGGATGATAAA GGTTTTAGAGCTAGAAATAG
pTF N20 Kina1-R	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ Kina1 por <i>Gap Repair</i>	CTTATCATCCTGATGGTT CACTAGTATTATACCTAGG
pTF N20 Kina2-F	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ Kina2 por <i>Gap Repair</i>	CGCAAAGGTCTTATCGTGAT GTTTTAGAGCTAGAAATAG
pTF N20 Kina2-R	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ Kina2 por <i>Gap Repair</i>	ATCACGATAAGACCTTTGC GACTAGTATTATACCTAGG
pTF N20 SigF1-F	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ SigF1 por <i>Gap Repair</i>	GCTTTCGAAAGAATTCGGA AGTTTTAGAGCTAGAAATAG
pTF N20 SigF1-R	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ SigF1 por <i>Gap Repair</i>	TTCCGAATTCTTTCGAAAG CACTAGTATTATACCTAGG

pTF N20 SigF2-F	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ SigF2 por <i>Gap Repair</i>	AGTTTCATGTATAGACGAAG GTTTTAGAGCTAGAAATAG
pTF N20 SigF2-R	Amplificação do pTargetF para clonagem do N ₂₀ SigF2 por <i>Gap Repair</i>	CTTCGTCTATACATGAAAC TACTAGTATTATACCTAGG
pTargetN20 Forward	Amplificação da porção do pTargetF contendo a inserção do N ₂₀ para avaliação da montagem do plasmídeo por <i>Gap Repair</i>	TACCGCCTTTGAGTGAGCTG
pTargetN20 Reverse	Amplificação da porção do pTargetF contendo a inserção do N ₂₀ para avaliação da montagem do plasmídeo por <i>Gap Repair</i>	CGCTTCCCTCATGACATTGC
pCRISPRdt2-F	Amplificação da porção do pCRISPR contendo a inserção do N ₂₀ /N ₃₀ para avaliação da montagem do plasmídeo	GCGTTCACCGACAAACAACA
pCRISPRdt2-R	Amplificação da porção do pCRISPR contendo a inserção do N ₂₀ /N ₃₀ para avaliação da montagem do plasmídeo	GGGCTTCCCAACCTTACCAG
Pcas9dt-F	Amplificação da porção do pCas9 contendo a inserção do N ₂₀ /N ₃₀ para avaliação da montagem do plasmídeo	GCGTAGAGGATCCACAGGAC
Pcas9dt-R	Amplificação da porção do pCas9 contendo a inserção do N ₂₀ /N ₃₀ para avaliação da montagem do plasmídeo	TTGACGAATCCTTGGAGCTCC
N30 KinA 1-1	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ KinA1 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAACACCTTTGCGAGAACCA TCAGGATGATAAAGG
N30 KinA 1-2	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ KinA1 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAAAC CTTTATCATCCTGATG GTTCTCGCAAAGGT
N30 KinA 2-1	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ KinA2 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAACTGATGGTTCTCGCAAAG GTCTTATCGTGATG
N30 KinA 2-2	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ KinA2 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAAACATCACGATAAGACCTT TGCGAGAACCATCA
N30 SigF 1-1	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ SigF1 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAACTGAGAGATGAGCTTTCG AAAGAATTGGAAG
N30 SigF 1-2	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ SigF1 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAAACCTCCGAATTCTTTGAA AGCTCATCTCTCA
N30 SigF 2-1	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ SigF2 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAACTTTCATATACAGTTTCATG TATAGACGAAGG
N30 SigF 2-2	Oligo para clonagem do protoespaçador N ₃₀ SigF2 nos plasmídeos pCas9-pCRISPR	AAAACCTTCGTCTATACATGAA ACTGTATATGAAA
pCasF	Detecção do plasmídeo pCas	CGGTGCCACTTTTTCAAGTT
pCasR	Detecção do plasmídeo pCas	GTTTGAGACGAGTCGCTTCC
pTargetAssy1 Forward	Primer para sequenciamento do plasmídeo pTargetF	GGCAGCGCAATGACATTCTT
pTargetAssy2 Forward	Primer para sequenciamento do plasmídeo pTargetF	GCCGGATCAAGAGCTACCAA

APÊNDICE D. Combinações utilizadas para as tentativas de nocaute

Tentativa de nocaute	Combinações realizadas		
	Células Utilizadas	Material Genético para transformação	Antibióticos para Seleção
1° tentativa	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N30 kinA1 (300 ng) Cassete kinA-1 (600 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pCRISPR-N30 kinA1 (300 ng) Cassete kinA-1 (600 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9	pCas9 (30 ng) pCRISPR-N30 kinA1 (300 ng) Cassete kinA-1 (600 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
2° tentativa	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N ₃₀ kinA2 (400 ng) Cassete kinA-2 (700ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N ₃₀ kinA2 (400 ng) Cassete kinA-2 (700ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml) Tetraciclina (2 µg/ml)
	RZ2MS9	pCas9 (30 ng) pCRISPR-N ₃₀ kinA2 (400 ng) Cassete kinA-2 (700ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9	pCas9 (30 ng) pCRISPR-N ₃₀ kinA2 (400 ng) Cassete kinA-2 (700ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml) Tetraciclina (2 µg/ml)
3° tentativa	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N ₂₀ kinA1 (300 ng) Cassete kinA-4 (1000 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N ₂₀ kinA2 (300 ng) Cassete kinA-4 (1000 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N ₂₀ sigF1 (300 ng) Cassete SigF D1 (1000 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas9	pCRISPR-N ₂₀ sigF2 (300 ng) Cassete SigF D1 (1000 ng)	Canamicina (50 µg/ml) Cloranfenicol (25 µg/ml)
4° tentativa	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ kinA1 (300 ng) Cassete kinA-4 (600 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ kinA2 (300 ng) Cassete kinA-4 (600 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ sigF1 (300 ng) Cassete SigF D1 (600 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ sigF2 (300 ng) Cassete SigF D1 (600 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ kinA1 (300 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ kinA2 (300 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ sigF1 (300 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ sigF2 (300 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (500 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
5° tentativa	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ kinA1 (300 ng) Cassete kinA-4 (1000 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (600 µg/ml) Arabnose (1.501 µg/ml)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ kinA2 (300 ng) Cassete kinA-4 (1000 ng)	Canamicina (100 µg/ml) Espectinomicina (600 µg/ml)

			Arabnose (1.501 $\mu\text{g/ml}$)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ sigF1 (300 ng) Cassete SigF-4 (1000 ng)	Canamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) Espectinomicina (600 $\mu\text{g/ml}$) Arabnose (1.501 $\mu\text{g/ml}$)
	RZ2MS9::pCas	pTargetF -N ₂₀ sigF2 (300 ng) Cassete SigF-4 (1000 ng)	Canamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) Espectinomicina (600 $\mu\text{g/ml}$) Arabnose (1.501 $\mu\text{g/ml}$)
Teste de	RZ2MS9	pTargetF -N ₂₀ kinA1 (100 ng)	Espectinomicina (600 $\mu\text{g/ml}$)
Transformação	RZ2MS9	pTargetF -N ₂₀ kinA2 (100 ng)	Espectinomicina (600 $\mu\text{g/ml}$)
do pTargetF	RZ2MS9	pTargetF -N ₂₀ sigF1 (100 ng)	Espectinomicina (600 $\mu\text{g/ml}$)
	RZ2MS9	pTargetF -N ₂₀ sigF2 (100 ng)	Espectinomicina (600 $\mu\text{g/ml}$)

5. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados encontrados no Capítulo 1 não demonstraram grandes variações no efeito da linhagem RZ2MS9 em milho em função da aplicação no sulco ou na semente. Indicando que a ação como promotora de crescimento de plantas dessa linhagem parece independe do modo de aplicação. Sendo também novamente confirmada a principal ação da linhagem RZ2MS9 como sendo a modificadora da arquitetura radicular do milho. Em contrapartida os resultados do ensaio de efeito da adubação fosfatada demonstraram a interação entre o efeito da bactéria e a adubação com fósforo. Bem como a interação dos inóculos aplicados (RZ2MS9 e BiomaPhos®) com outros microrganismos do solo de plantio, podendo ocasionalmente promover o ataque de patógenos. Sendo necessários mais estudos para a melhor compreensão do fenômeno observado.

Já em relação ao Capítulo 2 os resultados mostraram que para a linhagem RZ2MS9 em milho a aplicação de endósporos é um método menos eficiente do que a aplicação de células vegetativas, sendo também observado que os exsudatos radiculares de milho podem inclusive atuar inibindo a germinação dos endósporos. Tais resultados demonstraram a importância de estudos relacionados a melhor forma de formulação dos bioinsumos, pois há consenso das vantagens da aplicação de microrganismos esporulantes como inoculantes agrícolas, mas ainda são necessários mais estudos para avaliação se o que foi observado neste trabalho é comum a outras linhagens ou uma peculiaridade específica da linhagem RZ2MS9. Ao mesmo tempo também se destaca a grande diversidade genética das proteínas relacionadas a esporulação em *Bacillus*, mas que devido a grande concentração dos estudos ao redor de *B. subtilis* faz com que haja informações escassas para compreensão de como as dinâmicas de germinação e esporulação dos *Bacillus* afetam sua atividade no ambiente. Somado a isso também se aponta a necessidade de uma abordagem crítica em relação as metodologias atuais para observação dos fenômenos de germinação e esporulação, com as limitações desses métodos podendo gerar resultados pouco confiáveis em abordagens mais simplistas.

Já no Capítulo 3 não foi possível a obtenção de mutantes para os genes de esporulação. Bem como não foi possível também a completa confirmação das causas por trás dessa não ocorrência dos nocautes. A hipótese mais provável levantada nesse trabalho é a de confluência de múltiplos fatores culminando na completa perda de eficiência do processo de nocaute tentado. Com os principais fatores hipotetizados sendo a baixa compatibilidade dos plasmídeos utilizados com o *B. thuringiensis* RZ2MS9, ganho adaptativo de resistência a antibióticos pela bactéria (sendo provavelmente a junção desses dois fatores os responsáveis pela perda ou modificação dos plasmídeos clonados ao longo dos repiques), ocorrência de self-targeting no par pCas-pTarget^F e baixa qualidade dos cassetes utilizados.

Por fim este estudo demonstrou a importância de se estudar como o processo de esporulação dos *Bacillus* pode influenciar nas suas atividades como promotor de crescimento de plantas. Mais estudos são necessários para melhor entender a extensão do impacto da habilidade de esporulação nas ações da linhagem RZ2MS9 e se os resultados observados nessa linhagem de *Bacillus* podem ser extrapolados para as demais.