

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

**Caracterização *in vitro* e *in silico* do potencial de uma  
comunidade bacteriana sintética para biocontrole de patógenos de  
milho**

**Patrícia Perina de Oliveira**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
para obtenção de título de Bacharel em Ciências  
Biológicas. Orientadora: Maria Carolina Quecine Verdi

**Piracicaba - SP**

**2023**

## Agradecimentos

Agradeço à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por ter sido local de grandes descobertas e realizações. Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, que me ensinou tanto desde meu primeiro semestre na graduação e despertou minha paixão pela Genética e pela Biologia Molecular, e agradeço à Jéssica Aparecida Ferrarezi por tudo que me ensinou nesses meses trabalhando juntas, me ensinando a importância não apenas da ética de trabalho, mas também da parceria e do mundo da Bioinformática, além da paciência em me explicar novas metodologias. Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos “Professor João Lúcio de Azevedo”, que abriram as portas para a realização da minha pesquisa, em especial a colega Me. Gladys Angélica Apaza Castillo que me ajudou com a montagem do genoma do presente trabalho, e o técnico de laboratório José Antonio da Silva, pela ajuda e ensinamentos.

Sou imensamente grata pela oportunidade de realizar o sonho de me formar Bióloga, especialmente pela Universidade de São Paulo, instituição que formou a minha maior inspiração: meu pai Joaquim Gilberto de Oliveira. Sou grata à minha mãe, Cesira Cristina Perina de Oliveira, por sempre acreditar e enxergar em mim realizações que eu mesma tenho dificuldade de ver. Sou grata aos meus irmãos, Ana Carolina e Guilherme, pelo apoio imenso em todos os anos de graduação. Sou grata ao meu companheiro, Pedro Henrique, por toda a paciência, carinho e gentileza nesses 5 anos juntos, obrigada por compartilhar os momentos bons e ruins comigo, mesmo quando estávamos distantes.

Aos amigos que fiz nestes anos de graduação Anne, Amanda, Lucas, Matheus e Gabriel, obrigada por terem vivido tudo isto comigo, cada risada, jantar, aula, trabalhos, e principalmente os anos de pandemia não teriam sido possíveis sem vocês. E sou grata à minha grande amiga Giulia, que me acompanha desde os anos da Linguística, não há distância neste mundo que possa separar as nossas vidas.

*“Não sou nada.*

*Nunca serei nada.*

*Não posso querer ser nada.*

*À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”*

*Fernando Pessoa*

## Sumário

RESUMO .....	6
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	7
1.1. Rizosfera e comunidade sintética .....	7
1.2. Controle biológico e antibiose .....	9
1.3. Anotação <i>in silico</i> de características de promoção vegetal e metabólitos secundários bacterianos de interesse biotecnológico .....	10
2. OBJETIVOS .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Material biológico .....	12
3.2. Ensaio de antibiose entre RPCPs do consórcio e patógenos do milho .....	14
3.3. Análise estatística.....	15
3.4. Extração de DNA, sequenciamento e montagem do genoma da RPCP <i>Arthrobacter</i> sp. CNM05.....	16
3.5. Análise filogenética e anotação <i>in silico</i> dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Teste de antibiose .....	18
4.2. Sequenciamento, montagem do genoma e taxonomia da linhagem <i>Arthrobacter</i> sp. CNM05 .....	22
4.3. Análise filogenética e anotação <i>in silico</i> dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários.....	23
5. Discussão .....	28
6. REFERÊNCIAS .....	33
Material suplementar.....	44

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO IN SILICO E IN VITRO DO POTENCIAL DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA SINTÉTICA PARA BIOCONTROLE DE PATÓGENOS DE MILHO

As interações benéficas entre plantas e bactérias exercem importantes papéis nos processos fisiológicos das plantas, resultando na promoção do crescimento vegetal por mecanismos diretos e indiretos. Dentre as bactérias benéficas às plantas, destaca-se o papel das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), que estão presentes na porção de solo intimamente associada às raízes de plantas denominada rizosfera. As RPCPs podem ter ação antimicrobiana, promovendo o crescimento vegetal de maneira indireta através do controle de doenças. Por isso, as RPCPs têm sido estudadas visando a obtenção de inoculantes que possam substituir agroquímicos para nutrição e defesa vegetal, tornando assim o cultivo mais sustentável. Sabe-se que a utilização das RPCPs em consórcios bacterianos sintéticos pode proporcionar efeito aumentado na promoção de crescimento vegetal. Para viabilizar esta solução biotecnológica, é necessário compreender a nível genético a ação destas bactérias no biocontrole de patógenos. Com isso, será possível desenvolver maneiras de otimizar a complexa interação das RPCPs com a planta e a sinergia com as comunidades microbianas que a habitam. Para isto, neste trabalho buscamos caracterizar *in vitro* o potencial de uma comunidade bacteriana sintética previamente definida visando o biocontrole de fitopatógenos, e realizamos uma análise *in silico* a partir do *draft* do genoma da linhagem *Arthrobacter* sp. CNM05, uma rizobactéria isolada da rizosfera do milho, cujos resultados de controle biológico foram um dos mais promissores, atingindo inibição de 24% de *F. verticillioides* e 35% de *S. sclerotiorum*. Os mecanismos genéticos encontrados neste genoma estão associados à promoção do crescimento da planta e à produção de metabólitos secundários com potencial para o controle biológico, como os sideróforos e os antimicrobianos toxoflavina e ácido fenazina-1-carboxílico. Além destes, dentre os principais mecanismos encontrados na CNM05 está a biofertilização, responsável pela disponibilização de diversos nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo e potássio. Os resultados obtidos contribuíram para uma melhor compreensão do amplo papel das RPCPs como potenciais agentes de biocontrole de fitopatógenos na aplicação de comunidades bacterianas sintéticas no campo.

**Palavras-chave:** Bactérias promotoras de crescimento de plantas; Comunidades sintéticas; Controle biológico; Metabólitos secundários.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1. Rizosfera e comunidade sintética

O volume de solo associado às raízes das plantas possui alta concentração de microrganismos e elevada atividade microbiana, devido à presença dos exsudatos e outros compostos secretados pelas raízes. Este volume de solo é chamado de rizosfera e se divide em três porções: a raiz, o solo e os microrganismos (Lynch & Leij, 2012). Alguns microrganismos da rizosfera podem ser neutros, deletérios ou benéficos em relação à saúde das plantas (Lynch & Leij, 2012). Dentre os microrganismos benéficos, é possível encontrar as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), que são capazes de estimular o crescimento das plantas, aumentar a produtividade, reduzir a susceptibilidade ao ataque de patógenos, além de atenuar os efeitos de estresses bióticos e abióticos, melhorando o *fitness* das plantas no geral (Vacheron et al., 2013; Welbaum et al., 2010).

A utilização de RPCPs como biofertilizantes e bioestimuladores na produção de grandes culturas é uma opção viável e sustentável (Bhardwaj et al., 2014), uma vez que estes organismos promovem o crescimento vegetal e um aumento no vigor da planta, tendo assim grande impacto na agricultura global (Compant et al., 2010; Khan et al., 2022; Welbaum et al., 2010). Em especial diante do cenário de crescente demanda de maiores produtividades sem aumento de áreas cultiváveis e com redução do uso de agroquímicos, cujos impactos negativos ao ambiente e a saúde humana já vem longamente sendo discutidos (FAO, 2020).

Quando utilizadas em condições de campo, muitas RPCPs não conseguem se equiparar aos resultados de promoção de crescimento vegetal obtidos em ambientes controlados. Isto pode ocorrer por diversos fatores, como problemas na aplicação das RPCP no campo e até inviabilidade dos inoculantes de competir com a microbiota já presente no solo (Nelson, 2004). Porém, outra razão da discrepança é a baixa performance das RPCPs em condições naturais de solo e rizosfera quando aplicadas isoladamente (Van Veen et al., 1997)

Os consórcios bacterianos sintéticos (CBS) são comunidades bacterianas compostas por diversas linhagens ou espécies conhecidas, desenvolvidas de forma a realizar atividades bem definidas (Behera et al., 2021). Os organismos dos CBS devem ser passíveis de cultivo *in vitro*, havendo a possibilidade de se reproduzir este consórcio (Del Frari & Ferreira, 2021). O uso de CBS para inoculação de plantas é uma alternativa visando aumentar o potencial da aplicação de inoculantes que apresentam diversos benefícios em comparação à aplicação isolada de RPCP (Khan et al., 2022). Entretanto, o preparo destes consórcios depende da compatibilidade destes organismos de forma a apresentarem sinergia entre si, resultando em uma nutrição melhorada para a planta, promovendo assim o crescimento e o desenvolvimento desta em ambientes mais variáveis (Complant et al., 2010).

O CBS utilizado neste trabalho de pesquisa foi desenvolvido a partir de estudos metagenômicos de solos nativos com cultivo de milho (*Zea mays L.*), visando a sinergia com a linhagem *Azospirillum brasilense* Ab-V5, permitindo uma melhoria no desempenho desta comunidade como promotora do crescimento de plantas, com foco em milho (Ferrarezi et al., 2023). Os estudos foram fundamentados em análises de solos nativos e irradiados, em diferentes diluições, após aplicação de *A. brasilense* Ab-V5 e plantio de milho, as linhagens foram selecionadas com base nos táxons que possuíram correlação positiva à ação do *A. brasilense*, conforme demonstrado nas análises de metataxonômica (Ferrarezi et al., 2023). Compõem este CBS as seguintes linhagens: *Achromobacter* sp. BR961; *Kocuria* sp. BR11049; *Herbaspirillum seropedicae* BR11178; *Methylobacterium* sp. BR11882; *Achromobacter* sp. BR13423; *Stenotrophomonas* sp. BR13885; *Sphingomonas* sp. BR13914; *Pseudoacidovorax* sp. BR13934; *Pseudoxanthomonas* sp. BR14205; *Sphingobium* sp. BR14640; *Arthrobacter* sp. CNM05; *Siphonobacter* sp. CNM19.

Foram conduzidos estudos sobre as linhagens selecionadas com o intuito de avaliar seu potencial no controle de fitopatógenos, visando potencializar a sinergia benéfica entre a comunidade microbiana e as plantas. Esta sinergia se comprovou em estudos realizados pelo grupo de pesquisa, nos quais foi evidenciada a promoção do crescimento de plantas pelo CBS, através de mecanismos diretos, com a secreção de fitormônios e disponibilização de nutrientes para a planta (Ferrarezi et al., 2023). Dentre as linhagens analisadas, destacou-se a *Arthrobacter* sp. CNM05 devido ao seu potencial de controle biológico. Em decorrência desse

destaque, a linhagem foi submetida para sequenciamento e foi realizada uma análise para investigar os genes relacionados à promoção do crescimento das plantas.

### **1.2. Controle biológico e antibiose**

As atividades benéficas das RPCPs para as plantas podem ser classificadas em diretas e indiretas. As primeiras se referem à promoção do crescimento das plantas através da biossíntese de fitormônios e a disponibilização de nutrientes, enquanto os mecanismos indiretos de promoção do crescimento vegetal se referem à indução de resistência a condições deletérias e a ação antagonista a microrganismos fitopatógenos. A ação de antibiose está diretamente associada à síntese de metabólitos secundários (SM) (Bach et al., 2016; Demain & Fang, 2000; Vacheron et al., 2013).

A antibiose consiste na produção natural de um agente antimicrobiano por um microrganismo, tendo um impacto no desenvolvimento e sobrevivência de outro microrganismo (Compant et al., 2005). Estes agentes antimicrobianos são usualmente os SM, como quitinases, ácido cianídrico, proteases, celulases, entre outros (Quecine et al., 2016; Sharrar et al., 2020). Estes metabólitos resultam numa vantagem de fitness e de competitividade de um microrganismo sobre outro (Bach et al., 2016; Compant et al., 2005).

Os SM dos microrganismos são compostos auxiliares biosintetizados através de metabólitos primários. Estes compostos não são necessários ao crescimento normal da célula, mas beneficiam o organismo de diversas maneiras, como através da aquisição de nutrientes, comunicação e inibição de outros organismos (Demain & Fang, 2000; Gross & Loper, 2009; Sharrar et al., 2020)

Os microrganismos fitopatógenos são um problema crônico para a produção de alimentos e para a estabilidade dos ecossistemas no mundo todo. O controle químico tem sido amplamente utilizado por produtores no mundo todo para combater os efeitos negativos dos fitopatógenos (Carvalho, 2017). Entretanto, o uso contínuo e crescente destes químicos frequentemente resulta em resistências dos patógenos, causando problemas para o ecossistema terrestre e aquático, além de encarecer a produção (de Weger et al., 1995; Gerhardson, 2002). Neste sentido, a busca por métodos alternativos que sejam menos

agressivos ao ambiente para controle de doenças tem aumentado nos últimos anos (Complant et al., 2005).

Neste cenário, RPCP que apresentam mecanismos de antibiose contra fitopatógenos podem ter um papel crucial no futuro das produções agrícolas. Estas bactérias têm sido muito estudadas atualmente como potenciais agentes de controle biológico de fitopatógenos, o que permitiria uma redução no uso de agroquímicos nas plantações (Bach et al., 2016; de Weger et al., 1995; Gerhardson, 2002; Whipps, 2001). Para compreendermos o potencial no controle biológico de cada bactéria e do CBS como um todo, foram realizados testes de antagonismo entre as linhagens bacterianas e dois fitopatógenos de alto interesse econômico, os fungos *Fusarium verticillioides* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

A espécie *F. verticillioides* é de grande importância para o cultivo de milho (*Zea mays* L.), causando sintomas em todos os estágios de desenvolvimento da planta, levando a perda de sementes, morte de plântulas, podridão da raiz e da espiga, e danos a grãos armazenados (Blacutt et al., 2018; Cavagliari et al., 2004). A espécie *S. sclerotiorum* é um dos principais fitopatógenos de soja (*Glycine max* L.) e outras culturas, causando podridão do caule e das raízes, murcha, amarelecimento e seca das folhas também se hospeda em plantas daninhas e possui uma estrutura de resistência no solo, chamada esclerócio, que permite a permanência do fungo em campo por um longo período, dificultando o manejo da doença e até mesmo resistindo à ação de antifúngicos sintéticos (de Faria et al., 2022; Purdy, 1979).

### **1.3. Anotação *in silico* de características de promoção vegetal e metabólitos secundários bacterianos de interesse biotecnológico**

A investigação sobre CBSs para a promoção do crescimento vegetal necessita de uma abordagem multifacetada, associando análises experimentais *in vitro* e *in silico* para uma compreensão abrangente e satisfatória da relação sinérgica entre as linhagens selecionadas (Behera et al., 2021; Khan et al., 2022; Mori et al., 2016). Ensaios de antibiose revelam interações microbianas fundamentais, identificando bactérias que produzem compostos antibióticos e influenciam a dinâmica da comunidade (Bach et al., 2016; Bonaterra et al., 2022). Esses resultados experimentais são complementados por análises *in silico*, que, por exemplo, podem predizer genes envolvidos na produção de metabólitos secundários e

fornecer entendimento sobre as interações genéticas das bactérias com as plantas, ou com outros organismos presentes na rizosfera (Khan et al., 2022; Mori et al., 2016; Whipps, 2001).

Para otimizar o desempenho das RPCPs em condições de campo, é crucial compreender os mecanismos genéticos da interação destas com os patógenos, com a planta e com a comunidade microbiana que a habita(Mori et al., 2016). O entendimento sobre os diferentes modos de ação das RPCPs permite que sejam elaboradas estratégias de associação destes microrganismos visando complementaridade em CBSs, melhorando assim o potencial desta ferramenta biotecnológica no controle biológico (Whipps, 2001).

Os mecanismos de associação das bactérias com as plantas podem ser entendidos a partir de estudos genômicos, visando compreender e predizer o potencial destes microrganismos quando em associação às plantas na promoção do crescimento vegetal. Os mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal podem ser estudados, principalmente, pelos genes associados à biofertilização, estímulo do crescimento radicular e controle de estresses da planta (Compant et al., 2010; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Vacheron et al., 2013). Os mecanismos indiretos envolvem os genes relacionados ao controle biológico, como os genes associados a antibiose, a síntese de antimicrobianos, a indução de resistências sistêmicas e a melhoria na competição por nutrientes (Bach et al., 2016; Compant et al., 2010; Lugtenberg & Kamilova, 2009). Alguns destes mecanismos estão relacionados com a produção de SM produzidos por *clusters* de genes bionssíntéticos (BCG). Estes agrupamentos de genes funcionam para a construção de moléculas complexas, em especial as peptídeo não-ribossomais sintetas (NRPS) e as policetídeo sintases (PKS), que são os principais grupos responsáveis pela codificação dos antibióticos e antifúngicos mais conhecidos e utilizados atualmente (Sharrar et al., 2020).

Compreender o papel dos genes responsáveis por processos relacionados a biofertilização, controle biológico e síntese dos metabólitos secundários é de suma importância para alcançar os efeitos desejados na aplicação das RPCPs, especialmente no manejo biológico de doenças de plantas. Para tanto, no presente trabalho foram realizadas análises *in vitro* de antibiose entre RPCPs constituintes de uma CBS contra patógenos selecionados. Além disso, visando compreender os mecanismos genéticos que governam as

interações antagônicas entre RPCP e fungos fitopatogênicos, e as interações benéficas entre RPCPs-planta foi realizada uma busca *in silico* de genes relacionados à biofertilização, ao biocontrole e à biossíntese de SM nos genomas das linhagens que apresentaram potencial *in vitro* para a antibiose.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de controle biológico de fitopatógenos por RPCPs provenientes de um CBS previamente estabelecido no grupo de pesquisa.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliação do potencial de RPCPs de um CBS previamente desenvolvido para a promoção de crescimento de milho para o controle biológico de *Fusarium verticillioides* e *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Sequenciamento e montagem do genoma de pelo menos uma RPCP de maior potencial no controle de fitopatógenos;
- Anotação *in silico* dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários da linhagem mais promissora.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Material biológico

As linhagens bacterianas utilizadas no consórcio foram previamente selecionadas com base em análise de dados metagenômicos que possibilitaram identificar relações sinérgicas entre membros de uma comunidade nativa de solo cultivado com milho (*Zea mays* L.) e a RPCP *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (Ferrarezi et al., 2023). Estas linhagens foram isoladas de diferentes plantas hospedeiras e algumas foram cedidas pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comunidade bacteriana sintética selecionada para análise do potencial de biocontrole de patógenos.

Linhagem	Identificação taxonômica	Isolada de	Isolada em
<b>BR 961</b>	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Leucaena</i> sp.	Mato Grosso do Sul
<b>BR 11049</b>	<i>Kocuria</i> sp.	<i>Triticum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 11178</b>	<i>Herbaspirillum seropediae</i>	<i>Zea mays</i>	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 11882</b>	<i>Methylobacterium</i> sp.	<i>Brachiaria decumbens</i>	Goiás - Santo Antônio de Goiás
<b>BR 13423</b>	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 13885</b>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 13914</b>	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 13934</b>	<i>Pseudacidovorax</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 14205</b>	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	<i>Saccharum sinense</i>	Rio de Janeiro - Seropédica
<b>BR 14640</b>	<i>Sphingobium</i> sp.	<i>Brachiaria humidicola</i>	Mato Grosso do Sul – Campo Grande
<b>CNM05</b>	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Zea mays</i>	São Paulo - Piracicaba
<b>CNM19</b>	<i>Siphonobacter</i> sp.	<i>Zea mays</i>	São Paulo - Piracicaba

Nota: Linhagens com iniciais “BR” foram cedidas pela EMBRAPA; linhagens com iniciais CNM foram isoladas de solo cultivado com milho no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”.

Este consórcio bacteriano foi avaliado quanto à sua capacidade de inibição do crescimento de dois patógenos de milho: *Fusarium verticillioides* e *Sclerotinia sclerotiorum*, obtidos da coleção de fungos do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”. As linhagens dos patógenos utilizadas no teste foram crescidas em meio PDA

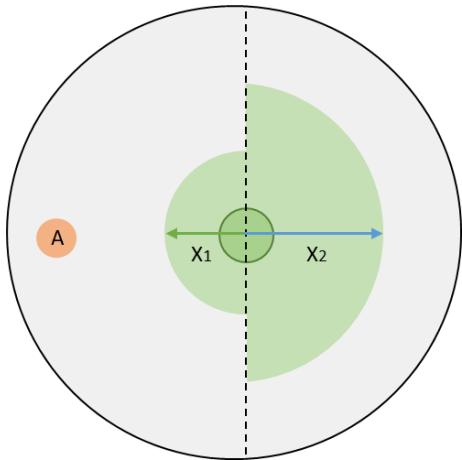
(*potato dextrose agar*; dextrose 20 g, infusão de batatas (200 g) 4 g, ágar bacteriológico 15 g, água destilada 1000 mL), verificadas quanto à pureza e incubadas por 5 dias a 28°C em *Biological Oxygen Demand (BOD)*.

As linhagens bacterianas foram repicadas individualmente em meio LB (Luria Bertani) sólido (triptona 10 g, extrato de levedra 5 g, NaCl 5 g, ágar bacteriológico 15 g, água destilada 1000 ml). Após a verificação da pureza das linhagens, estas foram crescidas em meio LB líquido, e o ajuste da OD<sub>600nm</sub> dos inóculos bacterianos foi realizado em solução PBS (*Phosphate-buffered saline*; NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g, água destilada 1000 mL).

O CSB foi feito a partir da inoculação das 12 bactérias selecionadas em 5 mL meio LB líquido, por 24 horas a 28° sob agitação constante (150 rpm), após este período 2 mL de cada bactéria foi ajustado a OD<sub>600nm</sub> = 0,1 (aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL) e transferido para um tubo estéril, e homogeneizado.

### **3.2. Ensaio de antibiose entre RPCPs do consórcio e patógenos do milho**

O ensaio foi realizado em triplicata, considerando cada placa de Petri como uma repetição. Em cada placa de Petri com meio PDA, foi aplicada uma gotícula de 20 µL de solução bacteriana ajustada para OD<sub>600nm</sub> = 0,1 (aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL) com PBS em uma extremidade, e no centro de cada placa foi inoculado o patógeno em discos de 1 cm de diâmetro.



**Figura 1.** Plaqueamento do ensaio de antibiose. (A) a bactéria inoculada, e no centro da placa o patógeno. ( $X_1$ ) representa o crescimento radial com a inibição e ( $X_2$ ) o crescimento radial sem inibição.

O índice de inibição do patógeno foi calculado a partir das medidas de crescimento radial do fungo em direção a colônia bacteriana ( $x_1$ ) versus o crescimento radial no sentido perpendicular à colônia bacteriana ( $x_2$ ), de acordo com a fórmula:  $(1 - (x_1/x_2)) \times 100$ , adaptado de Quecine et al (2016). O tempo de avaliação variou conforme o tempo de crescimento das diferentes espécies de fungo nas placas de controle, nas quais não houve inoculação de bactéria na extremidade da placa.

### 3.3. Análise estatística

Os resultados dos ensaios de antibiose foram analisados estatisticamente através do teste de Scott Knott, realizado no software R versão 4.1.0 (R Core Team, 2021) com o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014), comparando as médias de inibição de cada linhagem de modo a separar as linhagens em dois grupos homogêneos, minimizando a soma dos quadrados dentro do grupo, e maximizando-a entre os grupos, de maneira que não fiquem sobrepostos (Scott & Knott, 1974). Assim, médias agrupadas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.4. Extração de DNA, sequenciamento e montagem do genoma da RPCP *Arthrobacter* sp. CNM05**

A linhagem *Arthrobacter* sp. CNM05, cujos resultados foram mais promissores contra ambos os fitopatógenos, foi selecionada para o sequenciamento de genoma. Esta linhagem foi cultivada em 50 mL de meio LB líquido sob agitação constante (150 rpm) por 24 horas a 28 °C. Após o crescimento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g e o sobrenadante descartado. Amostras de DNA foram extraídas do pellet bacteriano utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®) seguindo as recomendações do fabricante. A amostra de DNA extraída foi analisada em gel de agarose (1%) e a concentração determinada em espectrofotômetro BioDrop µLITE (Biochrom).

O sequenciamento foi realizado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Embrapa Soja (INCT-Embrapa Soja). As bibliotecas de DNA foram preparadas com Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, EUA) e sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq (leituras pareadas de 2 x 250 pb com Illumina v3 Reagent Kit), seguindo as diretrizes do fabricante.

Os dados brutos (5.104.694 *reads*) foram avaliados quanto a qualidade utilizando o software FastQC v0.11.8/MultiQC v1.11 (Ewels et al., 2016). Sequências com adaptadores e pontuação de qualidade Phred < 20 foram removidas com Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014), e os pares de leituras restantes (3.730.510 *reads*) foram utilizados para a montagem do genoma no SPAdes v3.15.3 (Prjibelski et al., 2020), considerando as opções --isolate e --cov-cutoff "auto". Para verificar a pureza do sequenciamento, foi realizada uma rápida anotação taxonômica de *contigs* usando BlobTools v1.0.1 (Laetsch & Blaxter, 2017), e a montagem de esqueletos e fechamento de lacunas com as ferramentas Platanus v1.2.4 (Kajitani et al., 2014). A montagem final foi refinada usando Pilon v1.24 (Walker et al., 2014), e *scaffolds* com menos de 1000 nt foram excluídos com Pullseq v1.0.2 ([github.com/bcthomass/pullseq](https://github.com/bcthomass/pullseq)). Por fim, os softwares CheckM v1.0.18 (Parks et al., 2015) e Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs v5 (BUSCO v5) por meio do servidor gVolante2 (Nishimura et al., 2017) foram utilizados para avaliar a qualidade do genoma com ajuste para o conjunto de ortólogos da ordem Micrococcales.

### **3.5. Análise filogenética e anotação *in silico* dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários**

A análise filogenética do *draft* do genoma montado foi submetido ao *Type (strain) Genome Server* (TYGS, <https://tygs.dsmz.de>) com base na sequência do gene 16S rRNA e do genoma completo (WGS) (Meier-Kolthoff et al., 2022; Meier-Kolthoff & Göker, 2019). As informações sobre nomenclatura, sinonímia e literatura associada são fornecidas pelo banco de dados irmão do TYGS, a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, <https://lpsn.dsmz.de>) (Meier-Kolthoff et al., 2022). A análise da plataforma TYGS é realizada em etapas: determinação da proximidade de linhagens relacionadas, comparação em pares de sequências genômica, inferência filogenética e agrupamento de espécies e subespécies com base nas linhagens tipo.

A determinação das linhagens relacionadas mais próximas foi realizada em duas etapas complementares. Inicialmente, foi feita a comparação entre o genoma completo e todos os genomas presentes no banco de dados da plataforma TYGS, resultando em um conjunto de dez linhagens intimamente relacionadas. Adicionalmente, outras dez linhagens proximamente relacionadas foram determinadas pela sequência do gene 16S rRNA. Essa sequência foi extraída do genoma inserido usando o RNAmmer (Lagesen et al., 2007), e posteriormente comparada (BLASTed) (Camacho et al., 2009) com a sequência do gene 16S rRNA de cada uma das linhagens atualmente disponíveis no banco de dados TYGS. Este resultado foi utilizado para encontrar as 50 melhores linhagens correspondentes para o genoma inserido e, posteriormente, calcular distâncias precisas usando a abordagem de *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) sob o algoritmo '*coverage*' e a fórmula de distância d5 (Meier-Kolthoff et al., 2013). Essas distâncias foram usadas para determinar as 10 linhagens tipo mais próximas da linhagem inserida.

Foi realizada uma inferência filogenômica a partir de comparação em pares usando o GBDP, as distâncias intergenômicas precisas inferidas sob o algoritmo '*trimming*' e a fórmula de distância d5 (Meier-Kolthoff et al., 2013). Foram calculadas 100 réplicas de distância cada.

Os valores de hibridização DNA-DNA digital (dDDH) e intervalos de confiança foram calculados usando as configurações recomendadas do GGDC 3.0 (Meier-Kolthoff et al., 2013, 2022). As distâncias intergenômicas resultantes foram utilizadas para inferir uma árvore de evolução mínima equilibrada com suportes de ramos através do FASTME 2.1.6.1, incluindo o pós-processamento SPR (Lefort et al., 2015). O suporte de ramos foi inferido a partir de 100 réplicas *pseudo-bootstrap* cada. As árvores foram enraizadas no ponto médio (Farris, 1972) e visualizadas com o PhyD3 (Kreft et al., 2017).

O agrupamento de espécies com base na linhagem-tipo, utilizando um raio de 70% de dDDH ao redor de cada uma das linhagens tipo, foi realizado conforme descrito anteriormente (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Os grupos resultantes estão apresentados na Tabela Suplementar 1. O agrupamento de subespécies foi realizado utilizando um limiar de 79% de dDDH, conforme introduzido anteriormente (Meier-Kolthoff et al., 2014).

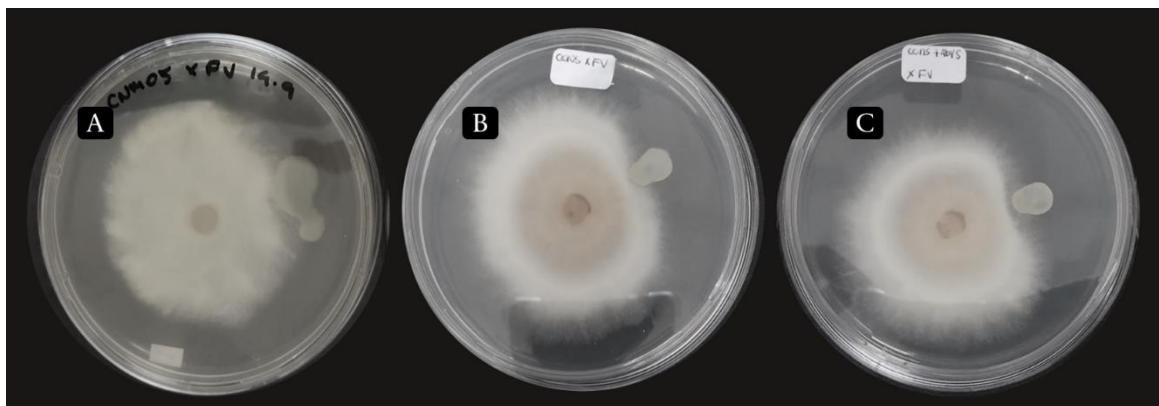
O genoma bacteriano foi predito e anotado com a ferramenta Prokka (Seemann, 2014). A ferramenta PGPT-Pred (Prediction of Plant Growth-Promoting Traits; Ashrafi et al., 2022; Patz et al., 2021), disponível na plataforma PLaBAsE (PLant-associated BActeria web resource; plabase.informatik.uni-tuebingen.de/pb/plabase.php; Patz et al., 2021), foi utilizada para anotação dos genes relacionados às vias de promoção de crescimento vegetal, e os *clusters* de genes de biossíntese de metabólitos secundários (smBCG) foram preditos pela ferramenta antiSMASH (Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell; antismash.secondarymetabolites.org/; Blin et al., 2021).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Teste de antibiose

Em geral, o teste de antibiose demonstrou que as linhagens apresentaram melhores resultados quando em consórcio do que isoladas, tendo apenas alguns casos demonstrando resultados mais promissores quando isoladas. Das linhagens testadas, *Arthrobacter* sp. CNM05 foi a mais expressiva no controle dos patógenos *F. verticillioides* e *S. sclerotiorum*. No

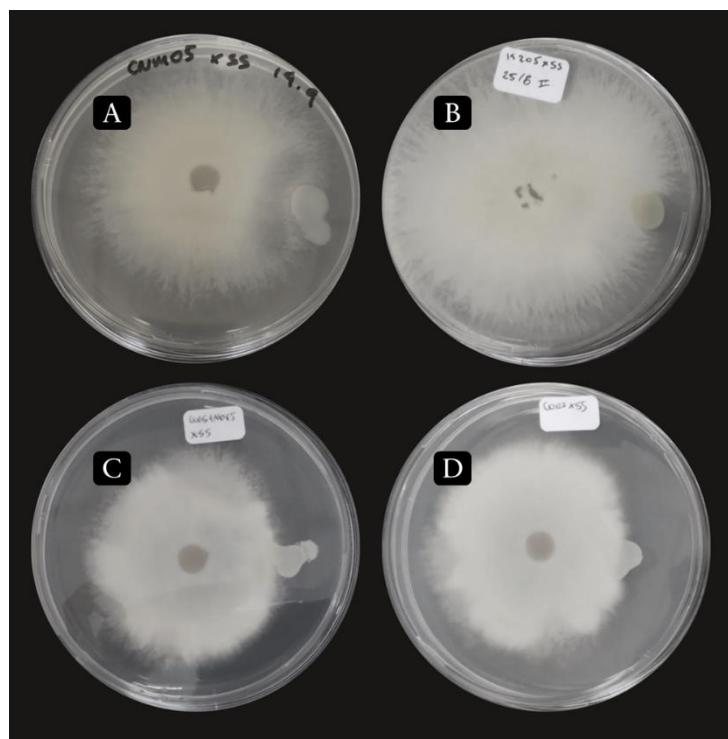
entanto, nenhuma bactéria demonstrou taxa de inibição de crescimento do patógeno maior do que 50%.



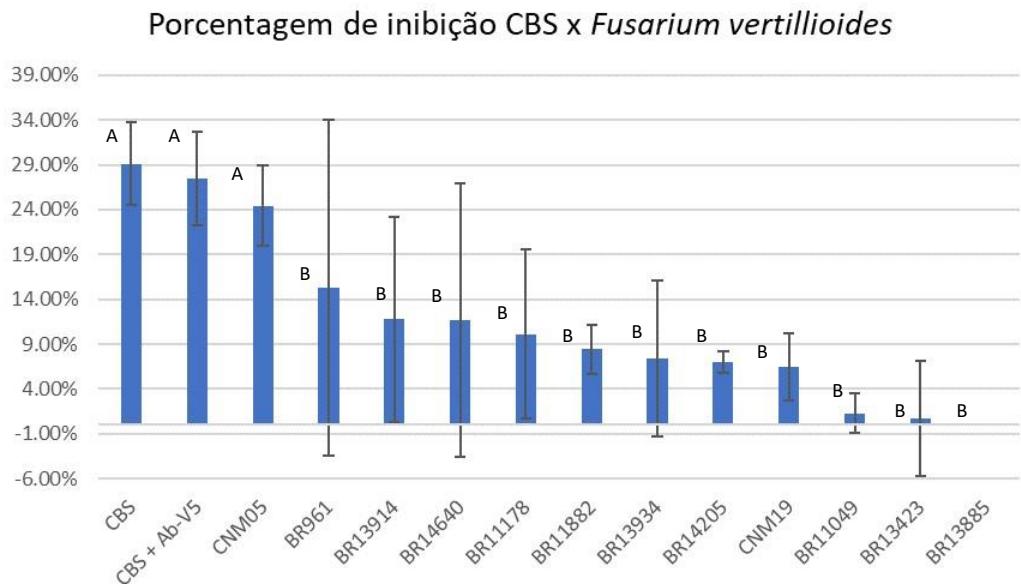
**Figura 2.** Ensaio de antibioticidade com *Fusarium verticillioides*: A – *Arthrobacter* sp. CNM05; B - Consórcio bacteriano sintético (CBS); C- CBS + *Azospirillum brasiliense* Ab-V5.

A análise de antibioticidade das linhagens do CBS contra o patógeno *F. verticillioides* evidenciou o potencial de biocontrole deste pelas bactérias em consórcio, tendo um controle de aproximadamente 30% do CBS sem Ab-V5 e 28% com a linhagem Ab-V5 (Gráfico 1). A linhagem *Arthrobacter* sp. linhagem CNM05 teve o maior nível de inibição dentre as linhagens isoladas, atingindo em torno de 25% de inibição, enquanto as outras linhagens atingiram inibição de 12% ou menos (Gráfico 1).

Um padrão similar foi encontrado nos resultados de inibição contra o patógeno *S. sclerotiorum*. As linhagens *Pseudoxanthomonas* sp. BR14205, *Arthrobacter* sp. CNM05 e *Siphonobacter* sp. CNM19 se apresentaram como as mais eficazes no controle do fitopatógeno, com taxas de inibição de 36%, 35% e 29%, respectivamente (Gráfico 2).



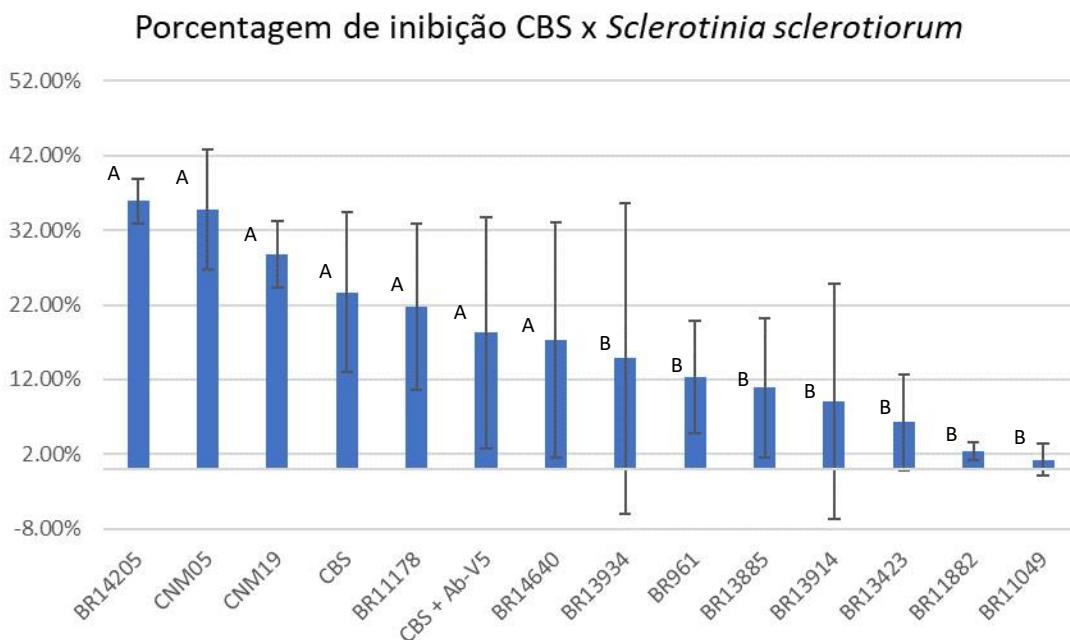
**Figura 3.** Ensaio de antibioticidade com *Sclerotinia sclerotiorum*: A – *Arthrobacter* sp. CNM05; B – *Pseudoxanthomonas* sp. BR14205; C- Consórcio bacteriano sintético (CBS); D - CBS + *Azospirillum brasilense* Ab-V5.



**Gráfico 1.** Porcentagem de inibição das linhagens constituintes de um consórcio bacteriano sintético (CBS) contra o fitopatogênico *Fusarium vertilliodes*. Porcentagens seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ). CBS – Consórcio Bacteriano

Sintético; CBS + Ab-V5 – CBS + *Azospirillum brasiliense* Ab-V5; CNM05 - *Arthrobacter* sp. CNM05; BR961 - *Achromobacter* sp. BR961; BR13914 - *Sphingomonas* sp. BR13914; BR14640 - *Sphingobium* sp. BR14640; BR11178 - *Herbaspirillum seropedicae* BR11178; BR11882 - *Methyllobacterium* sp. BR11882; BR13934 - *Pseudoacidovorax* sp. BR13934; BR14205 - *Pseudoxanthomonas* sp. BR14205; CNM19 - *Siphonobacter* sp. CNM19; BR11049 - *Kocuria* sp. BR11049; BR13424 - *Achromobacter* sp. BR13423; BR13885 - *Stenotrophomonas* sp. BR13885;

Após a realização do teste Scott-Knott ficou ainda mais evidente a maior susceptibilidade do fitopatógeno a ação das bactérias (Gráfico 2), visto que 5 linhagens se agruparam com o maior percentual de inibição (Gráfico 2), em comparação de apenas a *Arthrobacter* sp. CNM05 ter tido os melhores resultados contra o patógeno *Fusarium verticillioides*.



**Gráfico 2.** Porcentagem de inibição das linhagens constituintes de um consórcio bacteriano sintético (CBS) contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Porcentagens seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ). BR14205 - *Pseudoxanthomonas* sp. BR14205; CNM05 - *Arthrobacter* sp. CNM05; CNM19 - *Siphonobacter* sp. CNM19; CBS – Consórcio Bacteriano Sintético; BR11178 - *Herbaspirillum seropedicae* BR11178; CBS + Ab-V5 – CBS + *Azospirillum*

*brasiliense* Ab-V5; BR14640 - *Sphingobium* sp. BR14640; BR13934 - *Pseudoacidovorax* sp. BR13934; BR961 - *Achromobacter* sp. BR961; BR13885 - *Stenotrophomonas* sp. BR13885; BR13914 - *Sphingomonas* sp. BR13914; BR13424 - *Achromobacter* sp. BR13423; BR11882 - *Methylobacterium* sp. BR11882; BR11049 - *Kocuria* sp. BR11049;

#### **4.2. Sequenciamento, montagem do genoma e taxonomia da linhagem *Arthrobacter* sp.**

##### **CNM05**

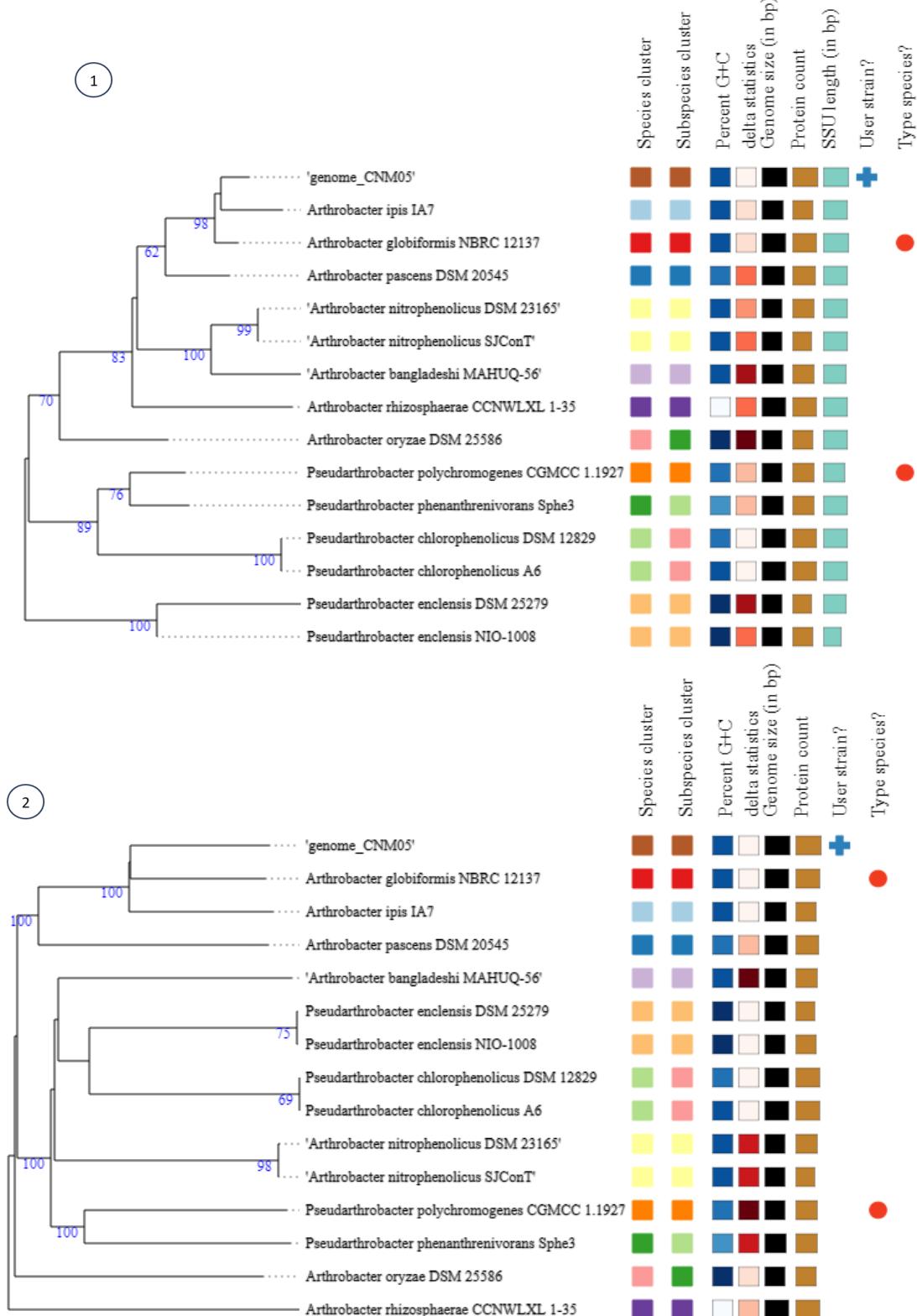
Tendo em vista os resultados promissores dos testes de antibiose in vitro contra os fitopatógenos *F. verticillioides* e *S. sclerotiorum*, a linhagem *Arthrobacter* sp. CNM05 foi selecionada para aprofundamento nos estudos genômicos. Para tanto, foi realizada extração do DNA, o sequenciamento e montagem do genoma desta linhagem. A montagem do genoma resultou em 57 scaffolds com tamanho total de 5.200.841 pares de bases, cobertura de 140 x, percentual G+C de 66,42%, N50 e L50 de 137.939 bp e 13, respectivamente. A avaliação de qualidade mostrou uma completude de 99,71% e contaminação de 0,64% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Métricas do genoma de *Arthrobacter* sp. CNM05.

Avaliação	Valor
Tamanho do genoma (bp)	5.200.841
Cobertura do genoma (x)	140
<i>Scaffolds</i>	57
Contigs	57
Maior contig (bp)	281.011
Conteúdo GC (%)	66,42
N50	137.939
L50	13
<b>Avaliação de qualidade</b>	
Completude (%)	99,71
Contaminação (%)	0,64
BUSCOs completos (nº de genes <i>core</i> detectados; %)	537; 100%
BUSCOs faltantes (nº de genes <i>core</i> detectados; %)	0; 0%

#### **4.3. Análise filogenética e anotação *in silico* dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários**

O *draft do genoma* de *Arthrobacter sp.* CNM05 foi submetido na plataforma TYGS para determinação filogenética e identificação a nível de espécie da linhagem CNM05. As comparações de hibridização DNA-DNA digitais (dDDH; Tabela suplementar 1) revelaram que a espécie *Arthrobacter globiformis* é a mais próxima da linhagem CNM05, com base nas árvores de máxima verossimilhança do genoma completo (Figura 4).



**Figura 4.** Árvores inferidas a partir de distâncias GBDP calculadas de: (1) sequências do gene 16S rRNA; (2) sequências do genoma completo.

O genoma de *Arthrobacter* sp. CNM05 foi predito e anotado com o programa Prokka (Tabela 3). Visando o aprofundamento da compreensão da interação CNM05-planta, foi realizada uma anotação *in silico* dos genes relacionados a promoção do crescimento de plantas (PGPT) presentes no genoma desta bactéria. Do genoma total, 14% dos PGPT estão relacionados com a biofertilização de plantas (Figura 7). Deste percentual, destacam-se os genes responsáveis por solubilização de fósforo (37%) e potássio (30%), aquisição de nitrogênio (14%) e de ferro (13%), assimilação de enxofre (5%) e fixação de dióxido de carbono (1%). Os genes relacionados ao controle de estresses bióticos representam 2% do genoma total. Destes, os principais genes estão relacionados a biossíntese de voláteis de resistência a estresses bióticos (60%), produção de fungicidas/antibióticos (22%), síntese de derivados de fenazina (14%) e outros genes relacionados à resistência de estresse biótico (4%). Os resultados da anotação do genoma pelo PGPT-Pred estão representados graficamente na Figura 7 até os níveis 3 e 4 da ontologia do PLaBAs, e representados conforme sua frequência no genoma nas Tabelas Suplementares 2 e 3.

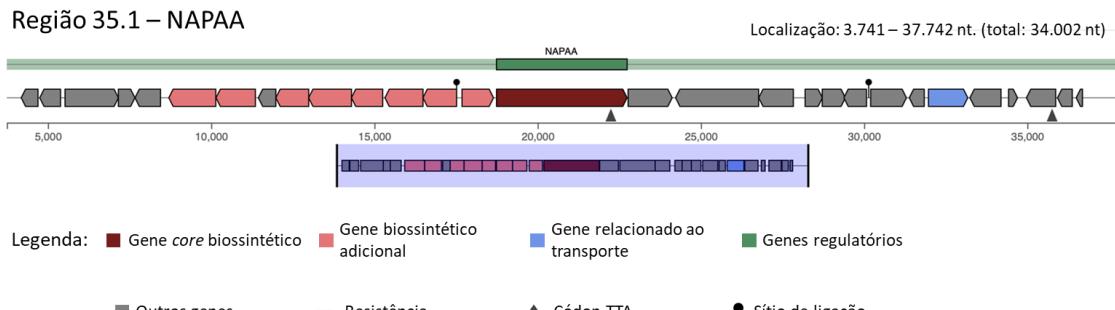
**Tabela 3.** Anotação do Prokka do genoma de *Arthrobacter* sp. CNM05.

Anotação Prokka	Contagem
Genes	4809
CDS	4729
mRNA	4809
tRNA	55
misc_RNA	24
tmRNA	1

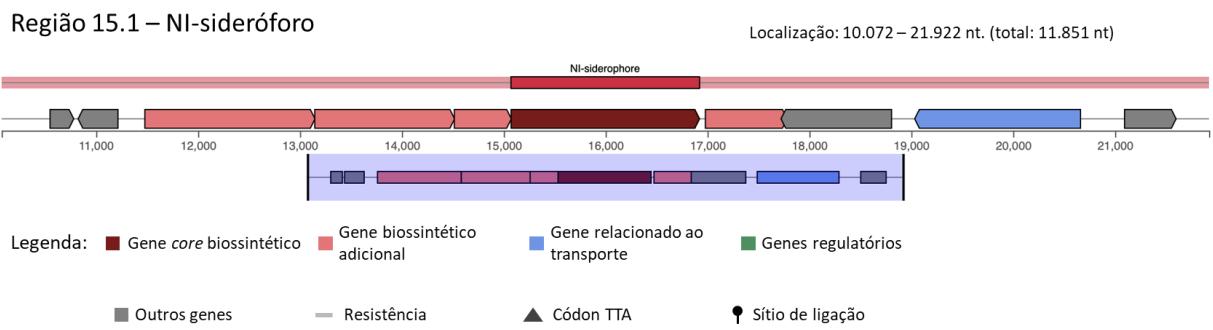
Nota: CDS - *coding DNA sequence*; mRNA – RNA mensageiro; tRNA – RNA transportador; misc\_RNA - *miscellaneous RNA*; tmRNA – RNA transferência-mensageiro;

Além desta predição, a exploração do genoma da linhagem CNM05 com a plataforma antiSMASH revelou a presença de smBCG que codificam poliaminoácidos não-alfa (NAPAA; Figura 5) e sideróforos independentes de sintetase de peptídeo não ribossômica (NI-sideróforo; Figura 6). O smBCG para NAPAA é constituído de 8 genes de biossíntese adicionais

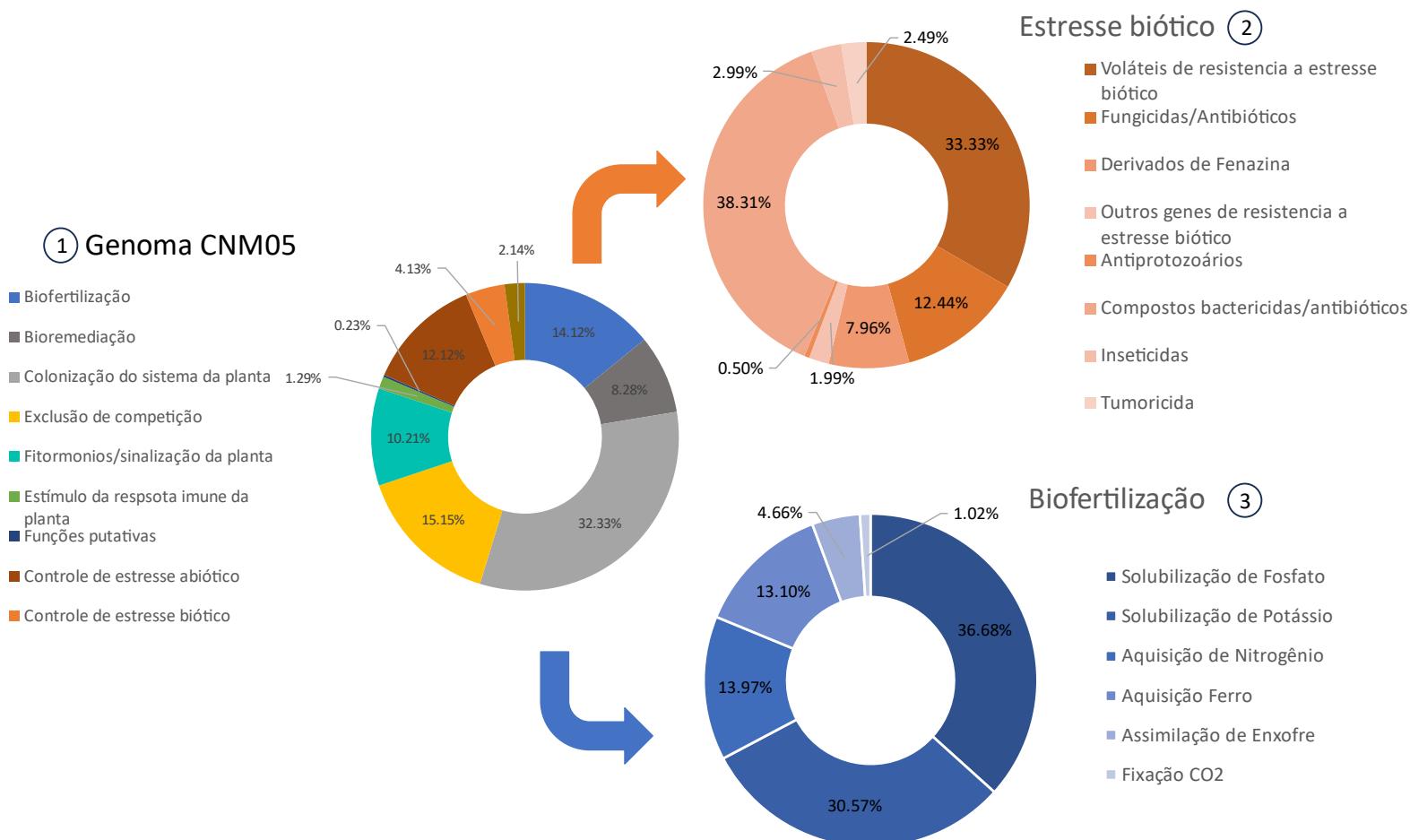
e um transportador (Tabela Suplementar 4), enquanto o *cluster* do NI-sideróforo é constituído por 5 genes de biossíntese e 1 transportador (Tabela Suplementar 5).



**Figura 5.** *Cluster* de genes biossintéticos de poliaminoácidos não-alfa (NAPAA).



**Figura 6.** *Cluster* de genes biossintéticos de sideróforo independente de sintetase de peptídeo não ribossômico (NI-sideróforo).



**Figura 7.** Anotação dos genes relacionados à promoção do crescimento de plantas pelo PGPT-Pred, do genoma de *Arthrobacter sp. CNM05*. (1) Anotação do genoma no nível 2 na ontologia do PLaBAsé; (2) Genes relacionados a controle de estresse biótico (3) Genes relacionados a biofertilização.

## 5. DISCUSSÃO

O uso de consórcios bacterianos representa uma estratégia inovadora na agricultura, pois diferentes espécies de bactérias colaboram sinergicamente para promover o controle biológico de patógenos no solo (Behera et al., 2021; Compant et al., 2010). Essa abordagem sustentável capitaliza a interação positiva entre microrganismos benéficos, visando fortalecer as defesas naturais das plantas e reduzir a necessidade de produtos químicos (Compant et al., 2010). A sinergia entre as diversas linhagens bacterianas no consórcio desempenha um papel crucial no controle biológico, proporcionando vários benefícios, dentre estes o antagonismo microbiano, estímulo do sistema imunológico da planta, produção de metabólitos antimicrobianos e até competição por recursos (Bach et al., 2016; Bonaterra et al., 2022).

O consórcio bacteriano analisado neste trabalho demonstrou potencial para o controle biológico dos fitopatógenos *Fusarium verticillioides* e *Sclerotinia sclerotiorum* nos experimentos *in vitro*, tendo resultados melhores do que grande parte das linhagens isoladas, pois diferentes bactérias podem ter funções complementares (Khan et al., 2022; Moretti et al., 2010; Mori et al., 2016). Porém a implementação bem-sucedida de consórcios bacterianos na agricultura requer uma compreensão aprofundada das interações entre as diferentes linhagens e destas com a planta, bem como das condições ambientais e do tipo de cultura (Khan et al., 2022; Panwar et al., 2014). Para tal compreensão é necessária uma abordagem integrada entre estudos *in vitro*, *in planta* e estudos *in silico*, como as análises genômicas (Behera et al., 2021; Smyth et al., 2011). Neste trabalho, a linhagem *Arthrobacter sp.* CNM05 demonstrou maior potencial de controle para ambos os patógenos e assim foi selecionada para uma análise mais aprofundada.

A linhagem *Arthrobacter sp.* CNM05 foi analisada quanto a sua taxonomia através da plataforma online TYGS, revelando uma proximidade com as espécies *Arthrobacter ipis* e *A. globiformis* com a análise de dDDH do gene 16S, respectivamente. Enquanto na análise de WGS foi encontrada proximidade com as mesmas espécies, porém tendo a *A. globiformis* como mais próxima. A avaliação comparativa das distâncias de dDDH quanto à similaridade do conteúdo de genes e das sequências de bases nucleotídicas (Tabela suplementar 1) nos levam a acreditar a linhagem *Arthrobacter sp.* CNM05 como pertencente a espécie *A.*

*globiformis*, porém ainda existe necessidade de maiores estudos para embasar tal classificação taxonômica.

A espécie *A. globiformis* é uma espécie bacteriana gram-positiva pertencente à família Micrococcaceae, sendo frequentemente encontrada em ambientes de solo com cultivo de gramíneas, como o milho (Sahoo et al., 2019). Esta bactéria possui em seu genoma mecanismos relacionados a biorremediação de solos contaminados, sendo capaz de degradar defensivos agrícolas sintéticos e metais pesados (Asatiani et al., 2018; Turnbull et al., 2001; X. Wang et al., 2023). Além de possuir genes de biossíntese de antibióticos como a estreptomicina, e genes relacionados a biofertilização, tendo assim grande potencial para a aplicação na agricultura (Prosser et al., 1962; Sahoo et al., 2019; Sharma et al., 2016).

A linhagem *Arthrobacter* sp. CNM05, isolada da rizosfera de milho, possui diferentes mecanismos de ação que permitem a sua utilização como RPCP, desde secreção de fitormônios até exclusão da competição por nutrientes (Chhetri et al., 2022; Katznelson & Sirois, 1961). A anotação do PGPT-Pred forneceu uma visão geral das características biológicas desta linhagem, categorizando os genes conforme as vias metabólicas nas quais estão envolvidos. O genoma predito continha genes principalmente envolvidos na colonização do sistema da planta, demonstrando assim seu papel como rizobactéria, além de outros mecanismos de ação de interesse que estão relacionados ao controle de estresses bióticos, controle biológico, e a biofertilização (Banerjee et al., 2010; Chhetri et al., 2022; Katznelson & Sirois, 1961; Munaganti et al., 2016; Prosser et al., 1962; Raymond et al., 2004; Sharma et al., 2016).

A biofertilização compreende processos metabólicos relacionados ao fósforo e potássio, captação de nitrogênio e ferro, assimilação de enxofre e fixação de dióxido de carbono. A presença de genes associados à assimilação de amônia, como os operons *glnABE*, *gltBD* (Goss et al., 2001; Johansson & Nordlund, 1996), assim como os relacionados à assimilação de ureia, *cluster ure* (Lardi & Pessi, 2018), e os genes envolvidos na denitrificação, *narBK*, *nasABR*, *nirBK* e *nosX* (Ogawa et al., 1995; Q. Wang et al., 2000), e na fixação de nitrogênio, *nifS* e *nifU* (Raymond et al., 2004), permitem inferir a importância dessa bactéria no ciclo do nitrogênio. Isso resulta na manutenção de uma quantidade significativa desse

nutriente no solo, em uma forma prontamente assimilável pelas plantas (Dos Santos et al., 2012; Lardi & Pessi, 2018).

Além disso, a linhagem *Arthrobacter* sp. CNM05 exibiu potencial genético no ciclo de outros nutrientes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Um conjunto de genes associados à solubilização de fósforo inorgânico (Pi) por meio do metabolismo de ácidos orgânicos como ácido acético, aconítico, butanoico, cítrico, fórmico, fumárico, glucónico, glicólico, glicoxílico, málico, oxalacético, propiônico, pirúvico, succínico, tartárico e valérico, foi encontrado no genoma de CNM05 (Yuan et al., 2015), juntamente de genes codificadores de transporte de Pi (*PstSCAB*), o regulon *pho* e o sistema de dois componentes PhoR-P (Santos-Beneit, 2015). Este genoma também abriga um complexo sistema de genes para disponibilização de potássio (Banerjee et al., 2010; Owen et al., 2015; Santos-Beneit, 2015). Entre estes, alguns se sobrepõem aos relacionados a fósforo, por serem responsáveis, também, pelo metabolismo de diversos ácidos orgânicos já citados. Complementarmente, foram encontrados dois sistemas complementares de transporte de K<sup>+</sup>, chamados Trk e Kdp, responsáveis pela manutenção da concentração de potássio altas na célula (Epstein, 1985).

Outra característica interessante do genoma analisado é a presença de genes responsáveis pela aquisição de ferro. Na análise com a plataforma antiSMASH, o smBCG relacionado a biossíntese de sideróforos NRPS-independente (NI-sideróforo) foi encontrado com 100% de similaridade. A produção de sideróforos envolve duas vias distintas: a via da sintetase de peptídeo não ribossômico (NRPS) e a da sintetase de sideróforo independente de NRPS (NI). As enzimas NI realizam a função ao adicionar um grupo adenil a um substrato de ácido carboxílico, geralmente citrato ou um derivado, seguido pela captura nucleofílica de uma amina ou álcool, resultando no deslocamento de um intermediário citrilo (Carroll & Moore, 2018). Foi possível encontrar também genes associados a bacillibactina, enterobactina, mirubactina e petrobactina. Estes são compostos antimicrobianos do tipo sideróforos, pois apresentam considerável atividade contrária a diversos patógenos através da complexação do ferro disponível no ambiente, tornando este nutriente menos disponível aos seus competidores (Chakraborty et al., 2022).

O controle de estresses bióticos envolve também outras vias metabólicas, como a síntese de voláteis de resistência a estresses, bactericidas e fungicidas, inseticidas, tumoricidas

e derivados de fenazina. As fenazinas naturais são metabólitos que possuem potencial como antibióticos, em especial o ácido fenazina-1-carboxílico (Costa et al., 2018; Mavrodi et al., 2012). Diversos genes relacionados à biossíntese deste composto foram encontrados no genoma da linhagem CNM05. Em particular, destaca-se o conjunto de genes *aroABEFKLQ*, envolvidos na via do ácido chiquímico, que desempenham um papel crucial na síntese do ácido fenazina-1-carbóxilico. Isto ocorre a partir do ácido chiquímico que é sintetizado em ácido corísmico, este sendo fundamental como precursor da piocianina, onde ocorre a formação do intermediário aminado 2-desoxi-2-aminoisocorismato (Pierson & Pierson, 2010). Duas unidades deste intermediário se unem para formar o ácido fenazina-1-carboxílico (J. Dong et al., 2022; Pierson & Pierson, 2010).

Os compostos voláteis bacterianos podem estimular a resistência sistêmica em plantas, podendo reduzir os sintomas ou até mesmo impedir a infecção por diferentes patógenos (Bitas et al., 2013). Um exemplo destes compostos é o butano-2,3-diol, cujo metabolismo é regulado na *Arthrobacter sp. CNM05* pelos genes *budABC* (Lu et al., 2016). Os genes relacionados aos antibióticos, em sua maioria, se apresentam tanto para o metabolismo de bactericidas como de fungicidas, como as toxoflavinas, que envolvem os genes *ribAD* e *toxF* em ambas as categorias (Fenwick et al., 2016). O genoma da linhagem CNM05 apresentou também um smBCG do tipo NAPAA (ácidos poliamino não-alfa, como a e-Polilisina, segundo plataforma antiSMASH) com similaridade de 31% ao cluster relacionado ao metabolismo de Arginina, aminoácido responsável por respostas a estresse bióticos e abióticos, por ser um precursor de diversas moléculas sinalizadoras, como o óxido nítrico (Tischner et al., 2007).

Além destes, existem também outros genes relacionados ao estímulo da resposta imune da planta que induzem a resistência sistêmica adquirida (SAR), permitindo assim mais resistência da planta a diferentes patógenos. Os clusters responsáveis pela SAR encontrados neste genoma foram os relacionados aos metabolismos de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), controlados pelos genes *thiCDEGLO* e *ribABDEFH*, respectivamente (Ahn et al., 2005; H. Dong & Beer, 2000; Vander Horn et al., 1993).

Fica evidente, portanto, que o CBS estudado neste trabalho possui potencial para utilização como controle biológico dos fitopatógenos *F. verticillioides* e *S. sclerotiorum*,

havendo uma ação sinérgica entre as bactérias do consórcio. Compreende-se que a linhagem *Arthrobacter sp.* CNM05 tem grande potencial biotecnológico, não só para o biocontrole, mas para ser utilizada como uma promotora do crescimento vegetal, tendo diversos mecanismos genéticos que permitem essa relação benéfica entre bactéria e planta.

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahn, I. P., Kim, S., & Lee, Y. H. (2005). Vitamin B1 Functions as an Activator of Plant Disease Resistance. *Plant Physiology*, 138(3), 1505. <https://doi.org/10.1104/PP.104.058693>
- Asatiani, N., Kartvelishvili, T., Sapojnikova, N., Abuladze, M., Asanishvili, L., & Osepashvili, M. (2018). Effect of the Simultaneous Action of Zinc and Chromium on Arthrobacter spp. *Water, Air, and Soil Pollution*, 229(12), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S11270-018-4046-0/METRICS>
- Ashrafi, S., Kuzmanović, N., Patz, S., Lohwasser, U., Bunk, B., Spröer, C., Lorenz, M., Elhady, A., Frühling, A., Neumann-Schaal, M., Verbarg, S., Becker, M., & Thünen, T. (2022). Two New Rhizobiales Species Isolated from Root Nodules of Common Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Show Different Plant Colonization Strategies . *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01099-22/ASSET/2953E858-54DE-423F-B9FA-04FA3B545F87/ASSETS/IMAGES/MEDIUM/SPECTRUM.01099-22-F005.GIF>
- Bach, E., Seger, G. D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 99, 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.APSoIL.2015.11.002>
- Banerjee, S. K., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by Arthrobacter sp. and Bacillus sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*.
- Behera, B., Das, T. K., Raj, R., Ghosh, S., Raza, M. B., & Sen, S. (2021). Microbial Consortia for Sustaining Productivity of Non-legume Crops: Prospects and Challenges. *Agricultural Research*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/S40003-020-00482-3/METRICS>
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>

- Bitas, V., Kim, H. S., Bennett, J. W., & Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: Diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 835–843. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0249-CR>
- Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M., & Glenn, A. E. (2018). *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxicogenic pathogen of maize. *Phytopathology*, 108(3), 312–326. [https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-06-17-0203-RVW\\_F2.JPG](https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-06-17-0203-RVW_F2.JPG)
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic acids research*, 49(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB335>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., & Montesinos, E. (2022). Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091759>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421/FIGURES/4>
- Carroll, C. S., & Moore, M. M. (2018). Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 53(4), 356–381. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1476449>
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/FES3.108>
- Cavaglieri, L., Passone, A., & Etcheverry, M. (2004). Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin

- B 1 production. *Research in Microbiology*, 155, 747–754.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.06.001>
- Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V. K., Joy, M., & Chakraborty, R. D. (2022). Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(1), 329–340.  
<https://doi.org/10.1007/S00253-021-11632-0/METRICS>
- Chhetri, G., Kim, I., Kang, M., So, Y., Kim, J., & Seo, T. (2022). An Isolated *Arthrobacter* sp. Enhances Rice (*Oryza sativa* L.) Plant Growth. *Microorganisms*, 10(6).  
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10061187/S1>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678.  
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2009.11.024>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951–4959.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Costa, K. C., Moskatel, L. S., Meirelles, L. A., & Newman, D. K. (2018). PhdA Catalyzes the First Step of Phenazine-1-Carboxylic Acid Degradation in *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of Bacteriology*, 200(10). <https://doi.org/10.1128/JB.00763-17>
- de Faria, A. F., Schulman, P., Meyer, M. C., Campos, H. D., Cruz-Magalhães, V., Godoy, C. V., Guimarães, R. A., da Silva, L. H. C. P., Goussain, M. M., Martins, M. C., Junior, J. N., Venancio, W. S., Fantin, L., Brustolin, R., de Souza Jaccoud Filho, D., Carneiro, L. C., Juliatti, F. C., & Medeiros, F. H. V. (2022). Seven years of white mold biocontrol product's performance efficacy on *Sclerotinia sclerotiorum* carpogenic germination in Brazil: A meta-analysis. *Biological Control*, 176, 105080.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.105080>
- de Weger, L. A., van der Bij, A. J., Dekkers, L. C., Simons, M., Wijffelman, C. A., & Lugtenberg, B. J. J. (1995). Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial

- pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, 17(4), 221–227. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.1995.TB00146.X>
- Del Frari, G., & Ferreira, R. B. (2021). Microbial Blends: Terminology Overview and Introduction of the Neologism “Skopobiota”. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1745. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.659592> BIBTEX
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 69, 1–39. [https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1) COVER
- Dong, H., & Beer, S. V. (2000). Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology*, 90(8), 801–811. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.801>
- Dong, J., He, B., Wang, R., Zuo, X., Zhan, R., Hu, L., Li, Y., & He, J. (2022). Characterization of the diastaphenazine/izumiphenazine C biosynthetic gene cluster from plant endophyte *Streptomyces diastaticus* W2. *Microbial Biotechnology*, 15(4), 1168–1177. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13909>
- Dos Santos, P. C., Fang, Z., Mason, S. W., Setubal, J. C., & Dixon, R. (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162> FIGURES/4
- Epstein, W. (1985). Chapter 9 The Kdp System: A Bacterial K<sup>+</sup> Transport ATPase. *Current Topics in Membranes and Transport*, 23(C), 153–175. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60155-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60155-0)
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW354>
- FAO. (2020). World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020. *World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020*. <https://doi.org/10.4060/CB1329EN>
- Farris, J. S. (1972). Estimating Phylogenetic Trees from Distance Matrices. <https://doi.org/10.1086/282802>, 106(951), 645–668. <https://doi.org/10.1086/282802>
- Fenwick, M. K., Philmus, B., Begley, T. P., & Ealick, S. E. (2016). Burkholderia glumae ToxA is a Dual Specificity Methyltransferase that Catalyzes the Last Two Steps of Toxoflavin

- Biosynthesis. *Biochemistry*, 55(19), 2748.  
<https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.6B00167>
- Ferrarezi, J. A., Defant, H., Souza, L. F., Azevedo, J. L., Hungria, M., & Quecine, M. C. (2023). Meta-omics integration approach reveals the effect of soil native microbiome diversity in the performance of inoculant *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1901. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1172839>
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., Nogueira, D. A., Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2014). ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics*, 5(19), 2952–2958. <https://doi.org/10.4236/AM.2014.519280>
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in biotechnology*, 20(8), 338–343. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02021-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02021-8)
- Goss, T. J., Perez-Matos, A., & Bender, R. A. (2001). Roles of glutamate synthase, gltBD, and gltF in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *Journal of bacteriology*, 183(22), 6607–6619. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6607-6619.2001>
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, 26(11), 1408–1446. <https://doi.org/10.1039/B817075B>
- Johansson, M., & Nordlund, S. (1996). Transcription of the glnB and glnA genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology*, 142(5), 1265–1272. [https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1265/CITE/REFWORKS](https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1265)
- Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, H., Toyoda, A., Ogura, Y., Okuno, M., Yabana, M., Harada, M., Nagayasu, E., Maruyama, H., Kohara, Y., Fujiyama, A., Hayashi, T., & Itoh, T. (2014). Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome research*, 24(8), 1384–1395. <https://doi.org/10.1101/GR.170720.113>
- Katznelson, H., & Sirois, J. C. (1961). Auxin production by species of arthrobacter. *Nature*, 191(4795), 1323. <https://doi.org/10.1038/1911323a0>
- Khan, M. Y., Nadeem, S. M., Sohaib, M., Waqas, M. R., Alotaibi, F., Ali, L., Zahir, Z. A., & Al-Barakah, F. N. I. (2022). Potential of plant growth promoting bacterial consortium for

- improving the growth and yield of wheat under saline conditions. *Frontiers in Microbiology*, 13, 3604. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.958522/BIBTEX>
- Kreft, L., Botzki, A., Coppens, F., Vandepoele, K., & Van Bel, M. (2017). PhyD3: a phylogenetic tree viewer with extended phyloXML support for functional genomics data visualization. *Bioinformatics*, 33(18), 2946–2947. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX324>
- Laetsch, D. R., & Blaxter, M. L. (2017). BlobTools: Interrogation of genome assemblies. *F1000Research* 2017 6:1287, 6, 1287. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12232.1>
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H. H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100–3108. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM160>
- Lardi, M., & Pessi, G. (2018). Functional Genomics Approaches to Studying Symbioses between Legumes and Nitrogen-Fixing Rhizobia. *High-Throughput*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/HT7020015>
- Lefort, V., Desper, R., & Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2798–2800. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSV150>
- Lu, X., Ji, G., Zong, H., & Zhuge, B. (2016). The role of budABC on 1,3-propanediol and 2,3-butanediol production from glycerol in *Klebsiella pneumoniae* CICIM B0057. *Bioengineered*, 7(6), 439. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1169355>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>, 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.62.081307.162918>
- Lynch, J. M., & Leij, F. de. (2012). Rhizosphere. *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0000403.PUB2>
- Mavrodi, D. V., Mavrodi, O. V., Parejko, J. A., Bonsall, R. F., Kwak, Y. S., Paulitz, T. C., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2012). Accumulation of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid in the Rhizosphere of Dryland Cereals. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 804. <https://doi.org/10.1128/AEM.06784-11>

- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60/TABLES/2>
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D801–D807. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB902>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L. A., Chertkov, O., Reddy, T. B. K., Pati, A., Ivanova, N. N., Markowitz, V., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Göker, M., & Klenk, H. P. (2014). Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic Sciences*, 9(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-2/FIGURES/9>
- Moretti, M., Grunau, A., Minerdi, D., Gehrig, P., Roschitzki, B., Eberl, L., Garibaldi, A., Gullino, M. L., & Riedel, K. (2010). A proteomics approach to study synergistic and antagonistic interactions of the fungal–bacterial consortium *Fusarium oxysporum* wild-type MSA 35. *PROTEOMICS*, 10(18), 3292–3320. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200900716>
- Mori, M., Ponce-de-León, M., Peretó, J., & Montero, F. (2016). Metabolic complementation in bacterial communities: Necessary conditions and optimality. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 220494. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01553/BIBTEX>
- Munaganti, R. K., Muvva, V., Konda, S., Naragani, K., Mangamuri, U. K., Dorigondla, K. R., & Akkewar, D. M. (2016). Antimicrobial profile of *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK\_09 isolated from Mango orchards. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47(4), 1030–1038. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2016.07.010>

- Nelson, L. M. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. *Crop Management*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-05-RV>
- Nishimura, O., Hara, Y., & Kuraku, S. (2017). gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(22), 3635–3637. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX445>
- Ogawa, K. I., Akagawa, E., Yamane, K., Sun, Z. W., LaCelle, M., Zuber, P., & Nakano, M. M. (1995). The nasB operon and nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177(5), 1409. <https://doi.org/10.1128/JB.177.5.1409-1413.1995>
- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41–54. <https://doi.org/10.1016/J.APSoIL.2014.09.012>
- Panwar, M., Tewari, R., & Nayyar, H. (2014). Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improves the performance of plants growing in stressed soils: An overview. *Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphosph Technology*, 257–285. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5\\_11/COVER](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_11/COVER)
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/GR.186072.114>
- Patz, S., Gautam, A., Becker, M., Ruppel, S., Rodríguez-Palenzuela, P., & Huson, DH. (2021). PLABase: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. *bioRxiv*, 2021.12.13.472471. <https://doi.org/10.1101/2021.12.13.472471>
- Pierson, L. S., & Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1659. <https://doi.org/10.1007/S00253-010-2509-3>

- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102. <https://doi.org/10.1002/CPBI.102>
- Prosser, C. L., McIndoo, N. E., Comp, J., Beard, N., Orlov, R. L., Finlayson, J., & Hoyle, L. (1962). Production of a Gibberellin-like Substance by Arthrobacter globiformis. *Nature* 1962 196:4858, 196(4858), 1012–1013. <https://doi.org/10.1038/1961012b0>
- Purdy, L. H. (1979). Sclerotinia sclerotiorum : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact . *Phytopathology*, 69(8), 875. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-69-875>
- Quecine, M. C., Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Shaffer, B. T., Henkels, M. D., Zabriskie, T. M., & Loper, J. E. (2016). An Interspecies Signaling System Mediated by Fusaric Acid Has Parallel Effects on Antifungal Metabolite Production by Pseudomonas protegens Strain Pf-5 and Antibiosis of Fusarium spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1372. <https://doi.org/10.1128/AEM.02574-15>
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541–554. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSH047>
- Sahoo, D., Devi, N. J., Ngashangva, N., Momota, P., Rojeena, Y., & Devi, S. I. (2019). Draft Genome Sequence of Arthrobacter globiformis mrc11, an Antimicrobial Agent Isolated from a Khangkhui Cave Deposit. *Microbiology Resource Announcements*, 8(11). <https://doi.org/10.1128/MRA.01620-18>
- Santos-Benit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00402>
- Scott, A. J., & Knott, M. (1974). A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 30(3), 507. <https://doi.org/10.2307/2529204>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153>
- Sharma, M., Mishra, V., Rau, N., & Sharma, R. S. (2016). Increased iron-stress resilience of maize through inoculation of siderophore-producing Arthrobacter globiformis from

- mine. *Journal of basic microbiology*, 56(7), 719–735.  
<https://doi.org/10.1002/JOBM.201500450>
- Sharrar, A. M., Crits-Christoph, A., Méheust, R., Diamond, S., Starr, E. P., & Banfield, J. F. (2020). Bacterial secondary metabolite biosynthetic potential in soil varies with phylum, depth, and vegetation type. *mBio*, 11(3), 1–17. [https://doi.org/10.1128/MBIO.00416-20-ST004.XLSX](https://doi.org/10.1128/MBIO.00416-20/SUPPL_FILE/MBIO.00416-20-ST004.XLSX)
- Smyth, E. M., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M. R., Dow, J. M., O'Gara, F., & Doohan, F. M. (2011). In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of applied microbiology*, 111(3), 683–692.  
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2011.05079.X>
- Tischner, R., Galli, M., Heimer, Y. M., Bielefeld, S., Okamoto, M., Mack, A., & Crawford, N. M. (2007). Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *The FEBS Journal*, 274(16), 4238–4245. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2007.05950.X>
- Turnbull, G. A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., & Morgan, J. A. W. (2001). Degradation of Substituted Phenylurea Herbicides by *Arthrobacter globiformis* Strain D47 and Characterization of a Plasmid-Associated Hydrolase Gene, *puhA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2270. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2270-2275.2001>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4(SEP).  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Van Veen, J. A., Van Overbeek, L. S., Dirk, J., & Elsas, V. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 121–135. <https://doi.org/10.1128/MMBR.61.2.121-135.1997>
- Vander Horn, P. B., Backstrom, A. D., Stewart, V., & Begley, T. P. (1993). Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (thiCEFGH) in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 175(4), 982–992. <https://doi.org/10.1128/JB.175.4.982-992.1993>

- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS one*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112963>
- Wang, Q., Li, H., & Post, A. F. (2000). Nitrate Assimilation Genes of the Marine Diazotrophic, Filamentous Cyanobacterium *Trichodesmium* sp. Strain WH9601. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1764. <https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1764-1767.2000>
- Wang, X., Oba, B. T., Wang, H., Luo, Q., Liu, J., Tang, L., Yang, M., Wu, H., & Sun, L. (2023). Degradation of DDT by a Novel Bacterium, *Arthrobacter globiformis* DC-1: Efficacy, Mechanism and Comparative Advantage. *Water 2023, Vol. 15, Page 2723*, 15(15), 2723. <https://doi.org/10.3390/W15152723>
- Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z., & Nowak, J. (2010). Managing Soil Microorganisms to Improve Productivity of Agro-Ecosystems. <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>, 23(2), 175–193. <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 52(Spec Issue), 487–511. [https://doi.org/10.1093/JEXBOT/52.SUPPL\\_1.487](https://doi.org/10.1093/JEXBOT/52.SUPPL_1.487)
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J. M., & Shen, Q. (2015). Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep13438>

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela Suplementar 1.** Resultados das análises de distâncias de hibridização DNA-DNA digital (dDDH)

Type Strain Genome Server								
Query strain	Subject strain	dDDH	C.I. (d0, %)	dDDH	C.I. (d4, %)	dDDH	C.I. (d6, %)	G+C content difference (%)
		(d0, %)		(d4, %)		(d6, %)		
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137	61.6	[57.9 - 65.1]	37.6	[35.1 - 40.1]	56	[52.9 - 59.2]	0.21
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter ipis</i> IA7	58.2	[54.6 - 61.8]	36.7	[34.2 - 39.2]	53.1	[50.0 - 56.2]	0.36
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545	34	[30.6 - 37.5]	25.2	[22.9 - 27.7]	30.8	[27.9 - 33.9]	0.72
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter nitrophenolicus</i> SJConT	23.4	[20.1 - 27.0]	23.4	[21.1 - 25.9]	22.3	[19.5 - 25.4]	0.18
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter oryzae</i> DSM 25586	21.5	[18.2 - 25.1]	23.3	[21.1 - 25.8]	20.8	[18.0 - 23.8]	0.68
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter nitrophenolicus</i> DSM 23165	23.8	[20.5 - 27.4]	23.3	[21.1 - 25.8]	22.6	[19.8 - 25.7]	0.17
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter bangladeshi</i> MAHUQ-	23.7	[20.4 - 27.4]	23	[20.8 - 25.5]	22.5	[19.7 - 25.6]	0.08
		56						

'genome CNM05'	<i>Pseudarthrobacter enclensis</i> DSM 25279	25	[21.7 - 28.7]	22.9	[20.6 - 25.3]	23.5	[20.7 - 26.6]	0.68
'genome CNM05'	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	23.1	[19.8 - 26.7]	22.9	[20.7 - 25.4]	22	[19.2 - 25.1]	1.05
'genome CNM05'	<i>Pseudarthrobacter enclensis</i> NIO-1008	25	[21.7 - 28.7]	22.9	[20.6 - 25.3]	23.5	[20.7 - 26.6]	0.68
'genome CNM05'	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i> CGMCC 1.1927	23.1	[19.8 - 26.7]	22.6	[20.3 - 25.0]	22	[19.2 - 25.0]	0.6
'genome CNM05'	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i> A6	23	[19.7 - 26.6]	22.6	[20.3 - 25.0]	21.9	[19.1 - 25.0]	0.46
'genome CNM05'	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i> DSM 12829	23	[19.7 - 26.6]	22.6	[20.3 - 25.0]	21.9	[19.1 - 25.0]	0.47
'genome CNM05'	<i>Arthrobacter rhizosphaerae</i> CCNWXL 1-35	18.8	[15.7 - 22.4]	21.5	[19.2 - 23.9]	18.4	[15.7 - 21.4]	4.49

**Tabela Suplementar 2.** Resultados das previsões PGPT-Pred, nível 2: biofertilização.

NÍVEL 3	NÍVEL 4	FREQUÊNCIA	TOTAL
CARBON_DIOXID_FIXATION	CO2_FIXATION-ALTERNATIVE_PAHTWAYS	4	7
	CO2_FIXATION-RuBisCo	3	
IRON_ACQUISITION	IRON_ACQUISITION-HEMOPHORES	11	90
	IRON_ACQUISITION-IRON_HOMOEOSTASIS	12	
	IRON_ACQUISITION-OTHER_TRANSPORT_SYSTEMS	24	
NITROGEN_ACQUISITION	IRON_ACQUISITION-SIDEROPHORES	43	96
	N-AQUISITION-ALLANTOIN_USAGE	6	
	N-AQUISITION-AMMONIUM_ASSIMILATION_USAGE	29	
	N-AQUISITION-ATMOSHPERIC_NITROGEN_FIXATION	8	
	N-AQUISITION-DENITRIFICATION NITRATE_USAGE	12	
PHOSPHATE_SOLUBILIZATION	N-AQUISITION-ETHANOLAMINE_USAGE	3	252
	N-AQUISITION-REGULATION	10	
	N-AQUISITION-RELATED_FUNCTIONS	6	
	N-AQUISITION-TRIGONELLINE_USAGE	16	
	N-AQUISITION-UREA_USAGE	6	
	K-SOLUBILIZATION-ORGANIC_ACID_METABOLISM	2	
	P-SOLUBILISATION-ORGANIC_ACID_METABOLISM	204	
	P-SOLUBILISATION-OTHER_ACID_METABOLISM	15	

	P-SOLUBILISATION-PHOSPHATASE_ACTIVITY	7
	P-SOLUBILISATION-PHOSPHATE_METABOLISM	24
POTASSIUM_SOLUBILIZATION	K-SOLUBILISATION-OTHER_ACID_METABOLISMS	10
	K-SOLUBILIZATION-ORGANIC_ACID_METABOLISM	191
	K-SOLUBILIZATION-POTASSIUM_TRANSPORT	9
SULFUR_ASSIMILATION MINERALIZATION	S-ASSSIMILATION-SULFUR_METABOLISM	32
		210

**Tabela Suplementar 3.** Resultados das previsões PGPT-Pred, nível 3: neutralização de estresse biótico.

NÍVEL 4	NÍVEL 5	FREQUÊNCIA	TOTAL
ANTIPROTOZOAN ANTIPROTISTAL_ACTIVITY	ANTIPROTISTAL-ALKYLRESORCINOL ALKYLPYRONE BIOSYNTHESIS	1	1
	BACTERICIDAL-ALKYLRESORCINOL ALKYLPYRONES_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-AMYCIN_DERIVATE BIOSYNTHESIS	1	
	BACTERICIDAL-ANSAMITOCIN RIFAMYCIN_METABOLISM	5	
	BACTERICIDAL-AURACHIN_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-BACTERIOCINS LANTIBIOITC NISIN	11	
	BACTERICIDAL-CEPHALOPORIN_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-MEGALOMYCIN_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-POLYMYXIN_METABOLISM	1	
BACTERICIDAL_COMPOUNDS ANTIBIOTICS	BACTERICIDAL-PRODIGIOSIN_METABOLISM	24	77
	BACTERICIDAL-REBECCAMYCIN_METABOLISM	2	
	BACTERICIDAL-SPERMIDINE PUTRESCINE_METABOLISM	11	
	BACTERICIDAL-TOXOFLAVIN_METABOLISM	4	
	BACTERICIDAL-TYPE_II_PolyKETIDE-AKLAVINONE-DAUNORUBICIN_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-TYPE_II_PolyKETIDE-ELLORAMYCIN_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-TYPE_II_PolyKETIDE-LANDOMYCIN_METABOLISM	1	
	BACTERICIDAL-TYPE_II_PolyKETIDE-MITHRAMYCIN_METABOLISM	1	

	BACTERICIDAL-TYPE_II_POLYKETIDE-NOGALAVINONE-NOGALAMYCIN_METABOLISM	1
	BACTERICIDAL-TYPE_II_POLYKETIDE-OXY CHLOR TETRACYCLINE_METABOLISM	9
BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-PHENAZINE_DERIVATES	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-PHENAZINE-1-CARBOXYLIC_ACID BIOSYNTHESIS	11 16
	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-PHENAZINE BIOSYNTHESIS	5
	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-ACETOIN 2 3-BUTANEDIOL_VOLATILE BIOSYNTHESIS	21
BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-VOLATILES	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-ALCOHOL KETONE_VOLATILE_METABOLISM	9 67
	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-HYDROXYACETONE_VOLATILE BIOSYNTHESIS	1
	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-VOLATILE RELATED_FATTY_ACID_METABOLISM	36
FUNGICIDAL_COMPOUNDS ANTIBIOTICS	FUNGICIDAL-ALKYLRESORCINOL ALKYLPYRONE_METABOLISM	1
	FUNGICIDAL-ANSAMITOCIN_P-3_METABOLISM	2
	FUNGICIDAL-ANSAMITOCIN RIFAMYCIN_METABOLISM	5 5
	FUNGICIDAL-CHITINOLYTIC_ACTIVITIES	2
	FUNGICIDAL-CHITOSAN_DEGRADATION	1
	FUNGICIDAL-KANOSAMINE_METABOLISM	2

	FUNGICIDAL-MOTILITY-MEDIATED_DEFENSE_SIGNALLING	6
	FUNGICIDAL-POLYENE_AMPHOTERICIN_B_METABOLISM	1
	FUNGICIDAL-PUROMYCIN_METABOLISM	1
	FUNGICIDAL-TOXOFLAVIN_METABOLISM	4
INSECTICIDAL_COMPOUNDS	INSECTICIDAL-GAMMA-AMINOBUTYRIC_ACID BIOSYNTHESIS	6 6
OTHER BIOTIC_STRESS_RESISTANCE_GENES	BIOTIC_STRESS_RESISTANCE-BACILYSIN_METABOLISM	4 4
	TUMORICIDAL-ANSAMITOCIN_P-3_METABOLISM	2
TUMORICIDAL_COMPOUNDS	TUMORICIDAL-REBECCAMYCIN BIOSYNTHESIS	2 5
	TUMORICIDAL-TYPE_II_POLYKETIDE-MITHRAMYCIN_METABOLISM	1

**Tabela Suplementar 4.** Análise dos melhores resultados de BLASTP do cluster de genes biossintéticos de poliaminoácidos não-alfa.

Região	Identificador	Função	Melhores hit(s) BLASTP	Nome científico	Cobertura do Query (%)	Identidade (%)
35.1	ctg35_9	BAG	argininosuccinate lyase	<i>Arthrobacter globiformis</i>	98	98.35
	ctg35_10	BAG	argininosuccinate synthase	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	99.5
	ctg35_12	BAG	ornithine carbamoyltransferase	<i>Arthrobacter</i> sp. AFG20	100	98.51
	ctg35_13	BAG	acetylornithine transaminase	<i>Arthrobacter</i> sp. FW305-BF8	100	93.76
	ctg35_14	BAG	acetylglutamate kinase	<i>Arthrobacter</i>	100	99.69
			bifunctional glutamate N-			
	ctg35_15	BAG	acetyltransferase/amino-acid acetyltransferase ArgJ	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	96.39
	ctg35_16	BAG	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	<i>Arthrobacter</i>	100	98.25
	ctg35_17	BAG	quinone oxidoreductase	<i>Arthrobacter</i> sp. ISL-65	100	96.26
	ctg35_27	TRG	MFS transporter	<i>Arthrobacter</i> sp. ISL-65	100	97.76

Nota: BAG – gene biossintético adicional; TRG – Gene relacionado à transporte;

**Tabela Suplementar 5.** Análise dos melhores resultados de BLASTP do *cluster* de genes biosintéticos de sideróforo independente de sintetase de peptídeo não ribossômico.

Região	Identificador	Função	Melhores hit(s) BLASTP	Nome científico	Cobertura do Query (%)	Identidade (%)
15.1	ctg15_15	BAG	aspartate aminotransferase family protein	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	92.27
		BAG	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	92.29
		BAG	pyridoxal-dependent decarboxylase	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	89.93
	ctg15_16	BAG	lysine N(6)-hydroxylase/L-ornithine N(5)-oxygenase family protein	<i>Arthrobacter</i> sp.	98	91.65
	ctg15_17	BAG	GNAT family N-acetyltransferase	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	89.47
	ctg15_19	BAG	SDR family oxidoreductase	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100	97.38
	ctg15_21	TRG	MFS transporter	<i>Arthrobacter ipis</i>	100	96.68

Nota: BAG – gene biosintético adicional; TRG – Gene relacionado à transporte;