

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Diversidade e mecanismos de promoção do crescimento de plantas utilizando abordagem dependente e independente de cultivo por microrganismos obtidos de milho cultivado em diferentes fontes de fósforo

Belo Horizonte, Março de 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Diversidade e mecanismos de promoção do crescimento de plantas utilizando abordagem dependente e independente de cultivo por microrganismos obtidos de milho cultivado em diferentes fontes de fósforo

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, para obtenção do título de Doutor(a) em Microbiologia.

**Estudante: Ubiana de Cássia Mourão Silva
Orientadora: Vera Lúcia dos Santos
Co- orientadoras: Christiane A. Oliveira e Sara Cuadros.**

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
JUSTIFICATIVA.....	17
OBJETIVOS.....	18
ARTIGO 1: Long-Term Rock Phosphate Fertilization Impacts the Microbial Communities of Maize Rhizosphere.....	20
INTRODUCTION.....	1
MATERIALS AND METHODS.....	2
RESULTS.....	4
DISCUSSION.....	5
REFERENCE.....	9
ARTIGO 2: Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato e avaliação de seu potencial na promoção do crescimento de plantas	32
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS.....	40
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	54
REFERENCE.....	56
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	59
ARTIGO 3: Comparative study of the genome of endophyte <i>Serratia marcescens</i> isolated from <i>Zea mays</i> with the genomes of <i>Serratia</i> strains isolated from different lifestyles	62
ABSTRACT.....	1
INTRODUCTION.....	2
MATERIALS AND METHODS.....	6
RESULTS.....	10

DISCUSSION.....	18
REFERENCE.....	27
TABLES AND FIGURES.....	35
DISCUSSÃO GERAL	117
CONCLUSÃO GERAL.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

Fosfato de rocha (FR)
Rock phosphate (RP)
Superfosfato triplo (SFT)
Triple Superphosphate (TSP)
Phosphate (P)
Ácido Indol Acético (AIA)
Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA)
Espécies reativas de oxigênio (EROS)
Plant growth promoting rhizobactéria (PGPR)
Pirroloquinolina quinona (PQQ)
1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)
Microrganismos promotores do crescimento de plantas (MPCPs)
Ferro (Fe)
Compostos orgânicos voláteis (COVs)
Ácido ribonucleotídeo ribossomal (rRNA)
Subunidade menor do rRNA de procariotos (16 S)
Internal transcribed spacer (ITS)
Polymerase chain reaction (PCR)
Non-metric multidimensional scaling (NMDS)
Principal Coordinates Analysis (PcoA)
Operational taxonomic unit (OTU)
Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)
Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight (MALDI-TOF)
Sequência codificante (CDS)
Rapid prokaryotic genome annotation (Prokka)
Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST)
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)
Nonribosomal peptides (NRP)

**Dedico este trabalho
Aos meus pais, Urbano e Arlita
Ao meu marido, Chateaubream
Às minhas irmãs, Arihana,
Uliana e Thais.
E aos meus amigos.**

“Até os adolescentes podem esgotar-se, e jovens robustos podem cambalear, mas aqueles que confiam no Senhor renovam suas forças; Ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão para a frente sem se fatigar.”
Isaías: 40, 30-31.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença fiel, especialmente nos momentos mais difíceis, e por ser minha proteção e esperança em todas as circunstâncias.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante o curso.

À profa Vera Lúcia dos Santos, minha orientadora, pela confiança em mim depositada, por não medir esforços para me ajudar na realização deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Às co-orientadoras, Christiane Abreu Oliveira, por ser muito incentivadora e a Sara Cuadros pelo apoio indispensável para a execução deste trabalho.

Também gostaria de agradecer a todos os professores e orientadores que desde o início da minha formação foram exemplo e grande incentivo para minhas escolhas:

Ao prof. de Biologia no Ensino Médio, José Maria de Oliveira (*in memoriam*)

Ao Dr. Ivanildo Evódio Marriel, meu primeiro orientador de iniciação científica – Embrapa Milho e Sorgo.

A Dra. Eliane Aparecida Gomes, Dr. Francisco Adriano de Souza e Dr. Ubiraci Gomes de Paula que também me orientaram na Embrapa Milho e Sorgo e me deram grandes oportunidades de aprendizado.

Ao prof. Maurício Dutra Costa, meu orientador de mestrado na UFV, a quem devo muito agradecimento, especialmente na parte de escrita científica.

A todos os professores e funcionários do departamento de Microbiologia da UFMG, em especial a profa Regina pelo sua serenidade e amizade durante o convívio no mesmo laboratório.

À equipe do Cebio na Fiocruz MG pela crucial ajuda, Gabriel, Fausto, Daniel, Laura, Juliana Assis e a Ana e o Flávio da plataforma de sequenciamento.

À Julliane Medeiros, a Jú, que com muita dedicação e boa vontade me ajudou muito no aprendizado das análises de bioinformática e preparo de bibliotecas de amplicons, além das inúmeras caronas!

Ao prof. Leandro e seus alunos Érica e Washigton da UFOP pela ajuda com as análises de genômica.

Aos meus queridos colegas do laboratório de Microbiologia Aplicada: Francisco, Marcus, João, Débora, Andrea Lima, Natália, Ana Flávia, Andréa Rodrigues, Fabíola, Mateus, Alessandra, Mariana, Mayara. Em especial ao Luiz, Daliane e Ana Cristina que foram imprescindíveis para a execução do projeto. Obrigada também pela amizade. E à Aline que por estarmos numa linha de pesquisa relacionada, sempre me ajudou se mostrando prestativa, responsável e amiga nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido, por acreditar e vibrar muito por mim, pela compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais queridos, aos quais devo tudo. Pelo bom exemplo de honestidade, trabalho, sabedoria e amor incondicional. Por me apoiar nos momentos de dificuldade e pela compreensão das minhas ausências.

Às minhas irmãs que com ternura sempre me apoiaram.

Aos meus tios, Sirlei e João (*in memoriam*) que foram base fundamental no início dos meus estudos, a quem devo uma imensa gratidão. E aos meus primos, Hiago, Bruninho, Matheus e Luquinhas que foram apoiadores e irmãos do coração.

Aos meus tios, Maria do Socorro e Roney que me apoiam muito e sei que torcem na mesma intensidade. Vocês são pessoas muito queridas.

À minha avó, Dona Preta, pelo apoio e incentivo sempre.

Às minhas colegas de república, Amanda e Yasmim.

Aos amigos do Ministério Universidades Renovadas, por fazerem parte do meu crescimento na fé e pela oportunidade de encontrar com o Senhor nos momentos de oração.

A todos da minha família que torceram por mais esta conquista.

A todos da família do meu marido que também torceram pela concretização deste trabalho.

RESUMO

O uso de fertilizantes fosfatados na agricultura é importante devido ao alto requerimento deste nutriente pelas plantas. Contudo, grande parte do fósforo (P) adicionado na forma de fertilizantes solúveis no solo é rapidamente adsorvido aos óxidos de ferro, alumínio e cálcio, o que pode levar a uma retenção de até 80 % do P aplicado. O Superfosfato triplo (SFT) é excelente fonte de P solúvel. Porém, devido ao elevado custo de produção desta fonte, o uso de fosfato de rocha (FR) tem sido alternativa atrativa nos países em desenvolvimento. No entanto, a baixa reatividade dos FR tem estimulado pesquisas envolvendo a utilização de microrganismos solubilizadores de P para melhorar a disponibilização deste nutriente nos solos adubados com FR. Muitas vezes, esses microrganismos além de promoverem a solubilização de P, desempenham várias funções que auxiliam no crescimento vegetal, constituindo candidatos ideais ao desenvolvimento de inoculantes que aumentem a produtividade e sustentabilidade de cultivos agrícolas importantes, como o milho. Neste trabalho, nós comparamos o efeito da fertilização do milho com FR e SFT em ensaio de campo, por um período de três anos, na diversidade da comunidade microbiana da rizosfera do milho utilizando método independente de cultivo. Além disso, obtivemos isolados bacterianos da rizosfera do milho cultivado com o FR e sem adição de P, que foram avaliados juntamente com microrganismos endofíticos também isolados de milho quanto à solubilização dos fosfatos de rocha (Araxá) e fosfato de ferro em testes *in vitro*, promoção do crescimento de milheto cultivado com FR em testes de casa de vegetação, e ainda quanto à presença de genes relacionados a promoção do crescimento vegetal por análise genômica. Analisamos também o genoma parcial de duas linhagens de *Serratia marcescens*, SmCNPMS2112 e SmUFMG85, endofíticas isoladas do milho que se destacaram nos ensaios *in vitro* e de casa de vegetação. Esses genomas foram comparados entre eles e com outras linhagens de *Serratia* isoladas de diferentes ambientes, visando a identificação de genes relacionados ao estilo de vida endofítico, promoção do crescimento de planta e patogenicidade. Nos estudos de diversidade da microbiota da rizosfera do milho, o filo Proteobacteria foi dominante em todas as condições de fertilização fosfatada, enquanto Oxalobacteraceae (principalmente *Massilia* sp. e *Herbaspirillum* sp.) foi enriquecida no solo adicionado de FR. *Burkholderia* sp. e *Bacillus* sp. foram também predominantes no solo fertilizado com FR, quando comparado ao solo tratado com SPT. Quanto aos fungos, Glomeromycota apresentou maior abundância nos solos adicionados de FR, os principais gêneros foram *Scutellospora* e *Racocetra*. Estes táxons já foram descritos como importantes para a solubilização / aquisição de P em solo fertilizado com FR. As plantas de milho cultivadas nos solos tratados com SPT e com FR apresentaram produtividade similar, e uma correlação positiva foi detectada entre o conteúdo de P e o perfil da comunidade microbiana desses solos. Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae também foram predominantes nas culturas obtidas do solo rizosférico do milho cultivado com e sem adição de FR; os gêneros principais foram *Klebsiella* e *Enterobacter*. Nos ensaios de caracterização dos isolados quanto ao potencial de solubilização de fosfatos, o fosfato de Araxá foi mais solubilizado do que o fosfato de ferro e as bactérias endofíticas foram as mais eficientes no processo de solubilização de P a partir do fosfato de Araxá em relação às rizosféricas. Nos ensaios de promoção de crescimento do milheto, em condições controladas, oito das nove bactérias avaliadas contribuíram para a melhoria de no mínimo um dos parâmetros de crescimento desta planta, com destaque para os isolados *Bacillus megaterium* UFMG50, *Ochrobactrum* sp. CNPMS2088 e *S. marcescens* CNPMS2112. Essas bactérias apresentaram genes relacionados ao metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e de fitohormônios. De acordo com a análise filogenética do genoma total e da região conservada das espécies de *Serratia*, observou-se que a região acessória não afetou a separação dos genomas dado que ambas as árvores contendo o genoma total e apenas a parte de famílias gênicas conservadas apresentaram uma distribuição muito similar entre os genomas. Numerosas funções preditas foram compartilhadas entre as *Serratia* spp. de diferentes estilos de vida, como solubilização, hidrólise e aquisição de fosfato, aquisição de ferro, produção de ácido indol acético (AIA) motilidade, adesão e formação de biofilme, produção de bacteriocina, antibióticos e genes que conferem resistência a drogas e a agentes oxidantes, além

de muitos fatores de virulência. Portanto, as diferenças que definem determinado estilo de vida entre as *Serratia* spp. avaliadas são provavelmente mais relacionados às variações na expressão gênica do que ao conteúdo genômico *per se*. Além disso, 3 profagos foram detectados no genoma de *S. marcescens* SmUFMG85 e 2 no genoma de *S. marcescens* SmCNPMS2112. A análise comparativa mostrou que as regiões únicas e acessórias estão localizadas em ilhas genômicas. No genoma de SmCNPMS2112, elas continham, por exemplo, genes do sistema secretório do tipo III, protease, quitinase, fimbria, sideróforo e β -lactamase. Enquanto em SmUFMG85 estavam presentes genes do sistema de secreção tipo IV, genes relacionados à conjugação e transposição, quimiotaxia, aquisição de ferro e produção de ramnolipídeos. Os dados sugerem que o repertório de genes detectados confirma o estilo endofítico dos isolados SmUFMG85 e SmCNPMS2112 e o potencial para promover o crescimento das plantas. Além disso, foi evidente o papel do mobiloma de SmUFMG85 e SmCNPMS2112, especialmente os genes localizados em ilhas genômicas, para a aquisição de várias funções que podem conferir capacidade de adaptação à planta hospedeira além de outros ambientes. Foram observadas mudanças na composição da comunidade microbiana associadas ao tipo de fertilização fosfatada e, embora não seja possível estabelecer relações de causalidade, alguns táxons identificados são relacionados com a solubilização do fosfato de Araxá e promoção do crescimento das plantas. Da mesma forma, os testes feitos *in vitro* e em casa de vegetação apontam diversas bactérias como candidatas ao desenvolvimento de bioinoculantes para a agricultura.

ABSTRACT

The use of phosphate fertilizers in agriculture is important due to the high requirement of this nutrient for the plants. However, much of the phosphorus (P) added to soil as soluble P is rapidly adsorbed to iron, aluminum or calcium oxides, which can lead to a complexation of 80% of the P applied to the soil. Triple superphosphate (TSP) is an excellent source of soluble P. However, due to its high cost of production, the use of, cheaper P sources, such as rock phosphate (RP) has been an attractive alternative in developing countries. A drawback is the low reactivity of RP, but the use of P solubilizing microorganisms to improve the availability of this nutrient is investigated. These microorganisms, in addition to improving P solubilization, may also play a role in promoting the growth of plants. They can be used for the development of microbial inoculants aimed at increasing the productivity and sustainability of important agricultural crops such as maize. In this work, we compared the effects of three years of fertilization with RP and TSP on the diversity of the maize rhizosphere microbial community using independent cultivation method. In addition, we obtained bacterial isolates from the rhizosphere of maize cultivated with RP and without P addition and evaluated the potential of these and of endophytic bacteria also isolated from maize for the solubilization of rock phosphate (Araxá) and iron phosphate *in vitro*. Pearl millet growth-promotion under RP fertilization was also evaluated in greenhouse tests. Furthermore, we investigated the presence of genes related to plant growth-promotion in 9 sequenced genomes. We also analyzed the draft genome of *Serratia marcescens* SmCNPMS2112 and *S. marcescens* SmUFMG85 isolated from maize that stood out in the *in vitro* and greenhouse trials. These genomes were compared among themselves and to other strains of *Serratia* isolated from different environments, aiming at the identification of genes related to the endophytic lifestyle, promotion of plant growth and pathogenicity. Proteobacteria phylum was dominant in all phosphate fertilization conditions, while Oxalobacteraceae (mainly *Massilia* sp. and *Herbaspirillum* sp.) were enriched in the soil fertilized with RP. *Klebsiella* sp. was the second most abundant taxon in soil treated with RP. *Burkholderia* sp. and *Bacillus* sp. were enriched in the soil fertilized with RP when compared to soil treated with TSP. As for fungi, Glomeromycota presented higher abundance in RP-treated soils, and the most abundant genera were *Scutellospora* sp. and *Racocetra*. These taxa are already described as important for P solubilization / acquisition in soil fertilized with RP. Maize cultivated in the TSP and RP treated soil presented similar productivity, and a positive correlation was detected for the P content and the microbial community of these soils. Bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family were predominant in the cultures obtained from the rhizosphere soil of maize cultivated with and without RP, and the main genera were *Klebsiella* and *Enterobacter*. Among the sources of P we evaluated, Araxá phosphate was solubilized to a higher extent, when compared to iron phosphate and independent of the P source, the endophytic bacteria solubilized P more efficiently than the rhizospheric ones. In addition, eight in nine bacteria evaluated for the capacity to promote the growth of millet contributed to the improvement of at least one of the growth parameters evaluated, and the most efficient strains were *Bacillus megaterium* UFMG50, *Ochrobactrum* sp. CNPMS2088 and *Serratia marcescens* CNPMS2112. These bacteria contain genes related to P metabolism, production of organic acids and phytohormones. Whole genome phylogenetic analysis together with the analysis of conserved phylogenetic markers of *Serratia* sp., it was observed that the conserved part of the genome contributed more to the separation, whereas the accessory portion of the total genome did not affect the phylogenetic distribution. Numerous predicted functions were shared between *Serratia* sp. of different lifestyles, such as solubilization, hydrolysis and phosphate acquisition, iron acquisition, indole acetic acid (IAA) production, motility, adhesion and biofilm formation, bacteriocin production, antibiotics, and genes that confer drug resistance and oxidizing agents, as well as many virulence factors. Therefore, the differences that define a particular lifestyle among the *Serratia* sp. evaluated are probably more related to variations in gene expression than to genomic content *per se*. In addition, 3 prophages were detected in the *S. marcescens* SmUFMG85 genome and 2 in the *S. marcescens* SmCNPMS2112 genome. Comparative analysis, along with the search for genomic islands, showed that the unique and accessory regions are located in genomic

islands. In the genome of *S. marcescens* SmCNPMS2112, they contained, type III secretory system, protease, chitinase, fimbriae, siderophore and β -lactamase. While in *S. marcescens* SmUFMG85 the type IV secretion system was obtained, genes related to conjugation and transposition, chemotaxis, iron acquisition and production of rhamnolipids. Thus, it can be concluded that the repertoire of detected genes confirms the endophytic style of the isolates (SmUFMG85 and SmCNPMS2112) and the potential to promote plant growth. In addition, the role of the *S. marcescens* SMUFMG85 and SmCNPMS2112 mobilomes, especially from genomic islands, was evident for the acquisition of various functions that may confer adaptability to the host plant in addition to other environments. Differences in the composition of microbial communities associated to the type of P fertilization were observed in this study. Even though it is not possible to establish causal relationships, our *in vitro* and greenhouse tests allowed us to identify taxa involved in the solubilization of RP and in plant growth-promotion. Likewise, the tests done *in vitro* and in greenhouse show several bacteria as candidates for the development of bioinoculants for agriculture.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O milho na agricultura

Os cereais são alimentos importantes para a população humana, servindo de alimento tanto para o homem quanto para os animais. Podem ainda ser utilizados em inúmeras aplicações industriais, por exemplo, na produção de energia (Koehler & Wieser, 2013). O milho (*Zea mays* L.) está entre os três principais cereais mais produzidos mundialmente (FAO, 2016), atingindo, a produção de cerca de 800 milhões de toneladas por ano (Mejía, 2003). No ranque dos países produtores de milho, o primeiro lugar é ocupado pelos Estados Unidos, seguido da China e do Brasil.

No Brasil, a cultura do milho tem representatividade alta na balança comercial, sendo o grão a principal forma exportada dessa cultura (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2016). Em 2017, o Brasil exportou o total de 29,25 milhões de toneladas de milho, registrando aumento em relação à safra do ano anterior (Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, 2018). Além disso, nenhuma parte da planta é desperdiçada, a palha do milho é tradicionalmente usada para fazer comidas típicas ou peças de artesanato; os colmos tornam-se alimento para a ração animal; as sedas de milho são usadas para fazer chás medicinais (Latham, 2012). Existem previsões de crescimento contínuo da demanda por grãos de milho nos próximos anos por causa do aumento das exportações para o mercado de carnes que por sua vez se utiliza do milho na ração dos animais (Mapa, 2016).

1.2. Microbioma associado ao milho

O estudo do microbioma do milho tem possibilitado o conhecimento da comunidade microbiana que se associa às regiões diferentes microrregiões desta planta, a saber, rizosfera, filosfera e endosfera (Liu et al. 2012; Li et al. 2014). A rizosfera compreende região de solo ao redor das raízes das plantas que se estende de 1 a 3 mm e contém os exsudatos, secreções, mucilagens, mucigel lisados e alta colonização dos microrganismos (Moreira, 2006). Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem dentro da planta por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, podendo colonizar as partes aéreas, folhas e caule, além das raízes. Esses microrganismos se caracterizam por não causarem dano à planta. Já a filosfera é o termo usado para se referir às partes foliares, florais e vegetativas, em que a parte dominante são as folhas, as quais representam um habitat único para a diversidade microbiana (Compant et al. 2010). Esses microrganismos são chamados de epifíticos por colonizarem a superfície dos tecidos (Hardoim et al. 2008). Alguns trabalhos tem investigado os microrganismos associados ao milho (Aira et al. 2010; Arruda et al. 2013; Liu et al. 2013; Gomes et al. 2015; Johnston-Monje et al. 2016). Na maioria das vezes, esses estudos buscam descrever como a microbiota do milho se distribui em função das

variações ambientais a que as plantas estão submetidas. Fatores como pH do solo, disponibilidade de água, textura e disponibilidade de nutrientes, regiões de plantio, genótipos e estágio de crescimento da planta tem sido citados como os que mais afetam o perfil da comunidade microbiana dessa cultura (Peiffer et al, 2013; Aira et al., 2010; Johnston-Monje et al. 2016).

Muitos grupos taxonômicos associados às plantas de milho já foram descritos. Dentre as bactérias, representantes do filo Proteobacteria tem sido os mais encontrados na região rizosférica dessa planta (Chelius and Triplett 2001), principalmente, as ordens Burkholderiales, Oceanospirillales e Sphingobacteriales (Peiffer et al, 2013). Esse filo é dominante na região de solo rizosférico em inúmeras regiões como Canadá, Brasil, Florida e Illinois . Neste trabalho, a classe Betaproteobacteria foi dominante em todos os solos, com exceção do Brasil, no qual a classe dominante foi Gammaproteobacteria (Roesch et al. 2007). Em seguida, os filos Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria e Firmicutes foram os mais frequentes nessas regiões (Roesch et al., 2007). A predominância do filo Proteobacteria na região rizosférica tem sido relatada também em outras plantas, tais como batata, beterraba e *Arabidopsis* (Weinert et al. 2011; Lundberg et al. 2012). Os gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Massilia*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Ochrobacterium* também são relatados nos trabalhos que investigam o microbioma do milho (Peiffer et al. 2013; Johnston-Monje et al., 2016). A abundância da microbiota associada à rizosfera de plantas de milho varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da plantas. Por exemplo, nos estágios iniciais (2 a 5 semanas) *Massilia*, *Flavobacterium*, *Arenimonas*, e *Ohtaekwangia* foram os mais abundantes, enquanto a população de *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Dyella*, *Chitinophaga*, *Sphingobium*, *Bradyrhizobium* e *Variovorax* foram dominantes nos estágios finais (9 a 12 semanas) (Li et al., 2014). A região rizosférica do milho comporta maior abundância de grupos de bactérias quando comparada com a região não rizosférica (Peiffer et al, 2013). Contudo, a diminuição da riqueza de bactérias na região da rizosfera tem sido descrita (Peifer et al, 2013, Uroz et al 2010), sugerindo seleção de espécies pelas plantas. A influência que as raízes exercem sobre a comunidade bacteriana está associada à liberação de mucilagem e exsudados, como ácidos orgânicos, açúcares, compostos aromáticos, ácidos graxos, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios e células mortas (Peiffer et al, 2013; Johnston-Monje et al., 2016) que podem ser utilizados pelos microrganismos e dessa forma, interferir na estruturação da comunidade microbiana da região rizosférica (Zahar et al., 2008).

Além da microbiota rizosférica, os estudos buscam identificar os táxons de bactérias endofíticas de milho. Os endofíticos podem colonizar a planta hospedeira pela transmissão horizontal quando é proveniente do ambiente ou vertical quando a microbiota é proveniente de parentais do vegetal, por exemplo via sementes (Frank et al., 2017). O sistema vascular do xilema é a principal via de transporte para a colonização sistêmica dos compartimentos internos das plantas

(James et al., 2002). A colonização dos tecidos internos da planta ocorre, principalmente, através dos pelos radiculares, zonas de alongação, pontas de raízes, podendo colonizar os espaços intracelulares e áreas de células lisadas (Compant et al. 2010; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Outros locais através dos quais os endofíticos podem penetrar nos tecidos vegetais são estômatos, particularmente em folhas e caules jovens (Roos e Hattingh, 1983), lenticelas (Scott et al., 1996) e radículas (Gagné et al., 1987).

Diferentes gêneros bacterianos tem sido descritos como endofíticos de milho. *Enterobacter*, *Pantoea*, *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Sphingomonas*, por exemplo, foram descritos como endofíticos em grãos de milho (Seghers et al. 2004; Rijavec et al. 2007). O gênero *Bacillus* foi detectado em folhas de milho, sendo *B. subtilis* e *B. pumilus* os mais frequentes (Figueiredo et al. 2009). Nas sementes de milho tem sido encontrado amplo espectro de táxons de bactérias endofíticas, a classe Gammaproteobacteria, representada pelos gêneros *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp., foi a mais abundante dentre as bactérias endofíticas encontradas no estudo de Johnston-Monje and Raizada (2011). Em outro trabalho, os gêneros *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., e *Enterobacter* sp. também foram dominantes nas sementes de milho, além de *Sphingomonas* sp., *Acinetobacter* sp., e *Leclercia* sp. (Liu et al. 2012) e *Undibacterium* sp., *Burkholderia* sp. e *Limnobacter* sp. (Liu et al. 2013).

Para os fungos, muitos táxons formadores de micorrizas arbusculares (FMA) tem sido relatados em associação com o milho, tais como *Scutellospora* sp., *Glomus intraradices*, *G. claroideum*, *G. mosseae*, *G. caledonium* e *Gigaspora* sp. (Gomes et al. 2003; Toljander et al. 2008). Espécies pertencentes a outros filos também tem sido encontradas, tais como *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* e *Cladosporium cladosporioides* inclusive associadas aos tecidos internos das folhas de milho (Gomes et al. 2003). Nas partes epidérmicas do caule, fungos como *Aurebasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium graminearum* e *Ustilago* sp. foram os mais encontrados, e nas partes internas do caule, os fungos mais abundantes foram *Ustilago* sp., *Acremonium strictum* e *Chaetomium* sp. (Fisher et al., 1992).

Além disso, ocorrem também as bactérias do solo denominadas de "bactérias helper" que podem interagir com os FMA estimulando o crescimento micelial e/ou inibindo organismos competidores e antagonistas (Frey-Klett et al., 2007, Offre et al., 2008; Scheublin et al., 2010). Um dos fatores de regulação desta interação é a composição dos exsudatos liberados pelos FMA, que são metabolizados pelas bactérias como fonte de carbono e energia (Toljander et al. 2007).

O sucesso da colonização endofítica da planta depende da capacidade do microrganismo de ultrapassar a camada celular cortical, onde a endoderme representa a principal barreira física. Assim também faz-se necessário superar os mecanismos de defesa da planta, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo vegetal em resposta à colonização microbiana

(Compant et al., 2010; Zamioudis & Pieterse, 2012). O microrganismo pode, então, expressar competência rizosférica e endofítica. A primeira refere-se à capacidade de colonizar a rizosfera durante longo período e com alta densidade populacional (Rodríguez-Navarro et al., 2007;). Isto requer a expressão de várias características, tais como a motilidade, adesão, produção de sideróforos e uso de ampla gama de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, incluindo os presentes nos exsudatos radiculares, e produção de compostos antimicrobianos (Bloomberg e Lugtenberg, 2001; Lugtenberg et al., 2001; Capdevila et al., 2004; Haar e Défag, 2005; Rodríguez-Navarro et al., 2007; Mavrodi, et al., 2011; Ghirardi et al., 2012). Na competência endofítica, a bactéria apresenta muitas das características requeridas para a competência rizosférica como expressão de flagelo ou motilidade, produção de sideróforos, além de outros como enzimas hidrolíticas dos tecidos vegetais, sistemas de secreção de proteínas, de sistema de *quorum sensing* e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (Sessitsch et al., 2012).

1.3. A importância do fósforo

As formas de P no solo, tanto orgânicas como inorgânicas, não são prontamente acessíveis às plantas (Smyth, 2011). O P orgânico corresponde a cerca de 80 % do P total nos solos, principalmente nas formas de fosfato inositol e fosfonato (Harrison, 1987; Turner et al., 2002). Já as fontes de P inorgânico no solo são constituídas, principalmente, por apatitas. Esses minerais podem ser de origem ígnea, sedimentar ou de acumulação orgânica. As variedades mais comuns de apatita são a fluorapatita $[Ca_5(PO_4)_3(F)]$, a hidroxiapatita $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ e, mais raramente, a cloroapatita $[Ca_5(PO_4)_3(Cl)]$ (Toledo & Pereira, 2001). Nos solos ácidos, como os do cerrado, altas doses de adubos fosfatados têm sido adicionadas devida a baixa fertilidade desse nutriente (Novais & Smith, 1999). O P é um dos nutrientes com menor disponibilidade nesses solos ácidos, devido a sua alta capacidade de formar complexos insolúveis com os óxidos e hidróxidos de alumínio e ferro, tornando-se adsorvido e, portanto, indisponível às plantas. Já nos solos neutros a alcalinos, a indisponibilidade do P ocorre devido à sua precipitação ou adsorção à superfície do carbonato de cálcio (Novais & Smith, 1999).

O P é um dos macronutrientes requeridos pelos vegetais e o terceiro componente que limita o crescimento das plantas, estando abaixo apenas do nitrogênio e da água. O P atua em inúmeros processos, incluindo fotossíntese, respiração, sinalização celular e síntese de ácidos nucléicos (Vance et al., 2003), sendo, portanto, essencial para o crescimento e produtividade das plantas. Para o milho, pouco P é requerido nos estágios iniciais de desenvolvimento, da germinação até os 35-40 dias que é o período de floração. Nessa fase, a exigência pelo P aumenta, chegando ao pico máximo no período de desenvolvimento dos grãos (Coelho & Alves, 2003). Nos sistemas de cultivo de milho mais tecnificados, os gastos com correção do solo e adubação representam, em média, 40 a

45 % do custo de produção (Coelho & Alves, 2003). Este fato se dá porque plantas de ciclo curto como o milho requerem maior nível de P em solução e reposição mais rápida do P adsorvido (não disponível) do que culturas perenes (Coelho & Alves, 2003).

Devido ao aumento da população mundial, aumentou-se o consumo de alimentos e, conseqüentemente, a demanda por alta produtividade dos vegetais, como os grãos (ANDA, 2016). Aliado a isso, o Brasil possui limitadas reservas de rochas fosfáticas com teores de P adequados para o processamento convencional de síntese de adubos (Oliveira & Ferreira, 2007). Assim, o agronegócio brasileiro é dependente do mercado externo para a importação, em média, de 40 % dos fertilizantes fosfatados utilizados na agricultura (ANDA, 2016), o que pode comprometer sua sustentabilidade e competitividade da produção agrícola nacional. Sendo assim, a busca por fontes alternativas de P tem sido incentivada.

Neste contexto, estudos tem sido realizados visando a utilização de alguns fosfatos de rocha (FR) nacionais (Bedin et al., 2003, Steiner et al., 2009, Chaves et al., 2013, Mendes et al., 2014, Oliveira et al., 2015, Silva et al., 2015) devido às indicações de que o uso dessas fontes poderá ser vantajoso considerando os custos, a disponibilidade e o efeito residual desses materiais, além da perspectiva de redução da dependência nacional pela importação de fertilizantes fosfatados. Todavia, devido à baixa reatividade, o emprego direto dos FR na fertilização do solo ainda não é economicamente recomendável (Simpson et al., 1998), visto que a liberação de P é muito lenta, se comparada aos fertilizantes convencionais (Lopes et al., 2004). Uma alternativa para aumentar a disponibilização de P presente nesses FRs é o uso de microrganismos solubilizadores de fosfato que serão abordados nos tópicos seguintes (Vassilev et al., 2007; Richardson et al., 2009; Mendes et al., 2013a).

1.4. Solubilização de fosfato (P)

Existem vários microrganismos capazes de solubilizar o P (MSP) do solo e disponibilizá-lo para as plantas. Dentre as bactérias que possuem essa característica, destacam-se os gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Serratia*, *Bradyrhizobium*, *Salmonella*, *Sinomonas*, *Thiobacillus Flavobacterium*, *Aneurinibacillus* e *Lysinibacillus* (Matos et al., 2017). No grupo dos fungos, os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Sclerotium*, *Torula*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Glomus*, compreendem aqueles de maior potencial na solubilização de fosfato (Mittal et al. 2008; Alori et al., 2017).

Com relação aos mecanismos de disponibilização de P inorgânico, acredita-se que a capacidade de solubilizar o P correlaciona-se com o potencial de liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos, sendo os mais citados os ácidos cítrico, oxálico, glucônico, láctico e itacônico

(Mendes et al., 2013a; Vassilev et al., 2013). A produção desses ácidos propicia a disponibilização do P através da formação de complexos ou quelação com íons ligados ao P (Mendes et al., 2013a). Os grupos hidroxila e carboxila dos ácidos orgânicos ligam-se aos cátions na estrutura do fosfato, liberando o P em forma solúvel (Sagoe et al., 1998). A liberação de íons H^+ durante a assimilação de NH_4^+ ou através de outras reações metabólicas que desencadeiam a excreção de prótons, como a respiração, também é relatada como mecanismo que propicia a liberação do P_i (Illmer & Schinner, 1995).

Vários ácidos orgânicos estão envolvidos com o processo de solubilização do P mediada pelos microrganismos. O ácido oxálico tem sido o principal ácido orgânico avaliado com capacidade de solubilização de P dos fosfatos de rocha (Mendes et al., 2013a; Silva et al., 2014, Bolan et al. 1994; Kpombrekou-a & Tabatabai 1994; Jones 1998). Ele é um ácido dicarboxílico que possui alta capacidade de formação de complexos com cátions divalentes, como o cálcio que está ligado ao P na estrutura das apatitas - base química de muitos fosfatos de rocha - o que pode liberar o P em forma solúvel para o meio (Sagoe et al. 1998). Nos trabalhos de Mendes et al. (2013a) e Silva et al. (2014), a liberação do ácido oxálico pelo fungo *Aspergillus niger* contribuiu para o aumento da solubilização do fosfato a partir do fosfato de rocha Araxá em condições *in vitro*. A inoculação da bactéria *Bacillus* sp. solubilizadora de P e adição do ácido oxálico também promoveram a melhoria do crescimento de arroz cultivado com FR (Panhwar et al., 2013). O ácido cítrico também tem sido encontrado no processo de solubilização de P (Mendes et al., 2013a). Este é um ácido tricarboxílico sintetizado nas vias metabólicas centrais, particularmente, pela atividade da enzima citrato sintase no ciclo de Krebs (Magnuson & Lasure, 2004). A capacidade desse ácido de liberar P a partir de fontes pouco solúveis ocorre em razão do poder de quelação e de liberação de prótons desse composto (Kpombrekou-A & Tabatabai, 1994). Além disso, microrganismos com elevada capacidade de solubilização de fosfato de cálcio tem apresentado a produção do ácido glucônico nos sistemas de solubilização de P (Lin et al., 2006; Chuang et al., 2007; Mendes et al., 2013a). Este é um ácido monocarboxílico sintetizado pela enzima glicose oxidase, em fungos, e glicose desidrogenase em bactérias (Ramachandran et al., 2006). Pirroloquinolina quinona (PQQ) atua como cofator da enzima glicose desidrogenase na reação de oxidação da glicose a ácido glucônico (Goldstein, 2003). A acidificação associada à produção deste ácido pode resultar na solubilização do P mediante a liberação dos metais ligados a sua molécula, como o cálcio (Mendes et al., 2013a).

1.5. Microrganismos promotores do crescimento de plantas (MPCPs)

O grupo dos MPCPs inclui tanto organismos procariotos quanto eucariotos. Quando associados às plantas, desempenham funções que estimulam o crescimento das raízes e da parte

aérea, aumentam a disponibilidade de nutrientes, auxiliam no processo de rizorremediação, controle de estresse abiótico e controle de doença (Glick, 2012). Essas características benéficas são largamente descritas para bactérias, com destaque para os filos Proteobacteria e Firmicutes, e os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, como também para fungos, com destaque para os gêneros *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Piriformospora* (Mendes et al, 2013b).

Dentre as bactérias, há aquelas de vida livre no solo que colonizam a região rizosférica das plantas, denominadas de Plant Growth Promoting Rhizobacteria e as bactérias endofíticas (Kloepper et al., 1989; Hardoim et al., 2012). Ambos esses grupos são capazes de aumentar a mobilização e aquisição de nutrientes, produzir fitohormônios que contribuem para o desenvolvimento vegetal e estimulam a tolerância aos estresses abióticos. Aumentam também a resistência das plantas a doenças por apresentarem relações de antagonismo e competição com os patógenos e induzirem a resistência sistêmica das plantas (Hardoim et al. 2012; Beneduzi et al., 2012). Acredita-se que os microrganismos endofíticos podem ser mais eficientes na colonização das plantas e promoção do crescimento em comparação às rizobactérias, devido ao alto potencial de competição com os microrganismos nativos e a capacidade de colonização dos tecidos vegetais internos sem desencadear respostas de defesa da planta (Compant et al. 2010). Além disso, muitas das características encontradas nas rizobactérias são também esperadas nos endofíticos, como diversidade metabólica, resistência ao estresse oxidativo, inativação dos fatores de defesa da planta e capacidade competitiva, por exemplo pela produção de bacteriocinas (Sessitsch et al., 2005; Beneduzi et al., 2012).

1.5.1. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas

Os MPCPs apresentam vários mecanismos que resultam na promoção do crescimento de plantas, dentre eles: a solubilização de fosfato como já abordado em item anterior, a fixação de nitrogênio, aquisição de ferro, produção de fitohormônios e atividade de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) desaminase (Vessey, 2003). Os MPCPs podem também exercer efeitos indiretos na promoção do crescimento de plantas pelo controle de fitopatógenos e indução de resistência sistêmica vegetal (Beneduzi et al., 2012). A compreensão de tais mecanismos é de grande importância quando se busca melhorar o desempenho das culturas por meio de tecnologias baseadas no uso de microrganismos. A utilização dos MPCPs é interessante num cenário de agricultura sustentável por constituir alternativa aos agroquímicos e possibilidade de redução de custo de produção. Todavia, investigar os mecanismos de promoção de crescimento vegetal ainda é um grande desafio, uma vez que o crescimento vegetal é resultado de um conjunto de fatores, sendo difícil associá-lo a um mecanismo específico (Hardoim et al., 2012).

Além da solubilização do P inorgânico discutida no item 1.4, os microrganismos podem disponibilizar o fosfato para as plantas à partir da mineralização do P orgânico (microrganismos mineralizadores de fosfato, MMP). O fosfato inositol (fitato; myoinositol hexafosfato) é a principal forma de P orgânico encontrada em muitos solos (Turner, 2007). O fitato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) é a principal forma de P orgânico nos solos (Gerke, 2015) e a mineralização do P retido nessa molécula ocorre mediante a liberação de enzimas fosfatases e fitases (Greiner, 2006). Fosfatases não específicas desfosforilam o P de ligações fosfoester ou fosfoanidro da matéria orgânica, fosfonatases e C-P liases quebram ligações C-P em organofosfonatos (Rodriguez et al., 2006), disponibilizando o P em formas solúveis (PO_4^-) para as plantas. A enzima fitase disponibiliza o P a partir do ácido fítico. De acordo com a estrutura e o mecanismo catalítico, fitases são classificadas como fitase cisteína, fosfatase ácida histidina, fosfatase ácida púrpura e fitases β -hélice (BPP) (Mullaney & Ullah, 2003; Jorquera et al., 2011). Os genes que codificam fitases são distribuídos em diferentes táxons microbianos. Por isso, a identificação e quantificação desses genes são difíceis, sendo necessária a construção de oligonucleotídeos iniciadores para todos os principais tipos de fitases (Jorquera et al., 2011). A classe BPP é, dentre as quatro classes de fitases, a mais encontrada nos organismos, sendo considerada a maior classe desta enzima na natureza (Huang et al., 2009). Em espécies de *Bacillus*, por exemplo, tem-se verificado a predominância dos genes que codificam este tipo de fitase (Greiner, 2007).

A capacidade de fixar o nitrogênio (N_2) atmosférico é outra característica de promoção do crescimento de plantas. Esta é amplamente distribuída entre os microrganismos procariotos (Dekas et al., 2009). No grupo α -Proteobacteria estão os fixadores de N_2 mais conhecidos. Estes são representados por *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* (Weir, 2011). Alguns membros de β -proteobacteria, como *Burkholderia* e *Cupriavidus* também têm sido relatados com capacidade de nodular plantas e fixar o N_2 (Moulin et al., 2001). Nos estudos sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em plantas não leguminosas têm sido isolados microrganismos a partir de cana-de-açúcar, milho, arroz, capim elefante, dendê, dentre outros (Embrapa, 2013). Estirpes pertencentes às espécies de bactérias associativas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*) e endofíticas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Burkholderia brasilensis* e *B. tropicalis*) tem sido caracterizadas como fixadoras de N_2 nestas culturas (Lugtenberg et al., 2013).

A promoção da aquisição de Ferro é outro processo desempenhado pelos microrganismos promotores do crescimento de plantas. O Ferro (Fe) é um elemento essencial, sendo requerido para atividade catalítica de proteínas, respiração, fotossíntese, síntese de DNA e proteção contra estresse oxidativo (Chu et al., 2010). Entretanto, em meios aeróbicos e pH neutro é encontrado apenas na forma insolúvel (Dellagi et al., 2009). As bactérias, em condições de baixa concentração de Fe^{3+} , secretam sideróforos que são moléculas de baixo peso molecular e diversas estruturas químicas quelantes seletivas do íon férrico (Winkelmann, 2007; Dellagi et al., 2009). Os sideróforos ligam-se com alta afinidade ao Fe, formando o complexo sideróforo- Fe^{3+} , que pode ser absorvido pelas plantas. A liberação de sideróforo é estratégia que auxilia na competição entre os microrganismos. Por exemplo, microrganismos fitopatogênicos ao liberarem sideróforos aumentam seu potencial de competição e causam infecção (Haas et al., 2008). Os microrganismos endofíticos também podem obter vantagens competitivas pela produção de sideróforos em relação a outros microrganismos em um mesmo local (Loaces et al., 2011).

Muitos MPCPs produzem hormônios reguladores do crescimento vegetal. Os fitohormônios são compostos que, em baixas concentrações (inferiores a $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$), regulam o desenvolvimento das plantas (Vessey, 2003). Os principais fitohormônios são auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (Zahir et al., 2003). Os processos de divisão celular, expansão celular, diferenciação, ramificação de brotos e morte celular são regulados por estas moléculas. A auxina atua na promoção do crescimento das plantas pelo aumento do comprimento e área de superfície das raízes, o que permite às plantas adquirirem mais nutrientes e água do solo (Khalid et al., 2004). O AIA é o mais abundante na família das auxinas e cerca de 80 % das bactérias rizosféricas podem sintetizá-lo (Patten & Glick, 1996). Sabe-se que a promoção de crescimento vegetal exercido por *Azospirillum*, antes relacionado apenas a fixação de N_2 , ocorre, principalmente, devido a sua capacidade de produzir auxinas que influenciam positivamente o desenvolvimento do sistema radicular. Além da auxina, muitas bactérias podem produzir a citocinina, por exemplo: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum rubrum*, *Serratia* e *Xanthomonas* (García de Salome et al., 2001). A citocinina também está envolvida na germinação, formação inicial dos ramos, crescimento de gemas laterais, expansão foliar, aumento da abertura dos estômatos, desenvolvimento do cloroplasto, senescência foliar e ainda possui importante papel na formação de nódulos durante a fixação de nitrogênio (Murray et al. 2007). A giberelina é outro hormônio vegetal produzido por MPCP, vários gêneros bacterianos são capazes de produzir este hormônio, dentre eles: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* (Tsavkelova

et al., 2006). As giberelinas pertencem a um grupo composto por mais de 130 moléculas diferentes (Dodd et al., 2010) e estão envolvidas, principalmente, com a divisão e alongação celular dentro do meristema apical. Além disso, afetam a germinação das sementes, crescimento do tubo polínico e florescimento das plantas. Como as moléculas auxina e citocinina, as giberelinas atuam em combinação com outros hormônios (Gutiérrez Manero et al., 2001; Tsavkelova et al., 2006). O ácido abscísico está envolvido nas respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos, juntamente, com o etileno (Smyth, 2011). O ácido abscísico é responsável pela inibição da germinação das sementes e florescimento, proteção contra seca, estresse salino e de metais tóxicos (Smyth, 2011). O etileno é um hormônio gasoso que também atua em condições de estresses abióticos e estresse por ataque de patógenos; sendo produzido a partir da conversão do S-adenosilmetionina a 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) pela atuação da enzima ACC sintase (Giovannelli et al., 1980). Alguns microrganismos da rizosfera são capazes de converter o ACC secretado pelas raízes das plantas em α -cetobutirato e amônia, o que diminui o nível de ACC e, conseqüentemente, de etileno na planta. As bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* são relatadas como produtoras deste hormônio em meios de cultura (Cohen et al., 2008).

Dentre outros mecanismos desempenhados pelos MPCP e que podem auxiliar no desenvolvimento vegetal estão a capacidade de remoção de substâncias tóxicas do solo, como metais, compostos aromáticos, herbicidas, pesticidas e outros xenobióticos (Milton, 2007). Contribuem também para a resistência das plantas à seca, salinidade, inundação e estresse oxidativo (Alvarez et al. 1996; Stajner et al., 1997; Saleem et al., 2007), assim como os mecanismos envolvidos na supressão de fitopatógenos, que incluem a produção de compostos antimicrobianos, competição por substrato e indução da resistência sistêmica da planta (Van Loon et al., 1998), entre outros. Por exemplo, a inibição de fungos fitopatógenos pode ocorrer devido à produção de cianeto de hidrogênio (HCN) e / ou enzimas de degradação de parede celular de fungos, por exemplo, quitinase e β -1,3-glucanase e de sideróforos pelos MPCP (Cattelan et al., 1999; Pal et al., 2001; Glick & Pasternak, 2003). Moléculas biossurfactantes, como a surfactina, também são descritas como controladoras do crescimento de microrganismos patogênicos (Bais et al., 2004), sendo que essas substâncias podem romper os biofilmes formados pelos fitopatógenos (Banat et al., 2014). Além desses, compostos orgânicos voláteis produzidos por várias bactérias já foram relatados como indutores da resistência sistêmica em *Arabidopsis thaliana* (Ryu et al., 2004) como 3-pentanol e 2-butanona que estimularam a resposta de defesa em plantas de pepino contra fitopatógeno desta planta (Song & Ryu, 2013).

Os compostos ativos de superfície são não apenas determinantes na competência de colonização de microrganismo, mas também beneficiam as plantas às quais esses organismos estão associados. Um dos mecanismos ocorre devido à ação antibiótica de alguns biossurfactantes que

inibem o crescimento de fitopatógenos (Banat et al., 2000). Eles o fazem por meio do rompimento de biofilmes, dissociando as células das colônias (Banat, Rienzo & Quinn, 2014). Por exemplo, surfactina, produzida por *Bacillus*, já foi demonstrada controlando o crescimento tanto de bactérias (Bais et al., 2004), quanto de fungos (Snook, et al., 2009) patogênicos. Ramnolipídeos, outra classe bem descrita, produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* também foram descritos inibindo o crescimento de patógenos (Banat et al., 2000; D'ae et al., 2010; Rienzo et al., 2016).

1.6. Mecanismos de promoção do crescimento de plantas detectados via sequenciamento dos genomas de MPCP

Dados os avanços nos métodos de sequenciamento de nova geração, muitos genomas de MPCP foram sequenciados nos últimos anos (Shankar et al., 2012; Mitter et al., 2013; Chaudhry & Patil, 2016; Xie et al., 2016; Khan et al., 2017). O estudo desses genomas tem revelado inúmeros genes relacionados aos mecanismos de promoção do crescimento de plantas. Dentre eles, genes que codificam a enzima nitrogenase *nifHDK*, relacionados à fixação de nitrogênio (Xie et al., 2016), genes codificantes da pirroloquinolina quinona *pqqBCDEFG*, que contribui para a produção do ácido glucônico (Goldstein, 1996, Khan et al., 2017), um dos responsáveis pela solubilização de P (Mendes et al., 2013a), e genes de moléculas sideróforas, como acromobactina, pioverdina (Gupta et al., 2014). Além desses, genes codificantes das enzimas chave para a produção do fitohormônio AIA, indol-3-piruvato descarboxilase (*ipdC*) (Khan et al., 2017), e da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase *acdS*, que garante níveis baixos de produção do etileno. O gene da nitrito redutase *nirK* forma o sinal de ramificação induzido pelo óxido nítrico em *Azospirillum brasilense* (Pothier et al., 2008), e os genes para a produção de acetoína *budAB* e 2,3-butanodiol *budC* (Shankar et al., 2012; Khan et al., 2017) estão relacionados à indução de resistência sistêmica das plantas e alongamento das raízes (Yi et al., 2016; Khan et al., 2015). Quitinase *chiA-chiO*, fenazina *phzABCDEF* e HCN *hcnABC*, todos eles relacionados ao controle de fitopatógenos (Loper et al., 2007; Pathma et al., 2011), são exemplos adicionais.

Além de contribuir com diversos mecanismos de promoção do crescimento das plantas, os MPCP dependem da expressão de inúmeros fatores para o sucesso na colonização da planta hospedeira. Muitos destes tem sido relatados a partir das análises dos genomas sequenciados. Alguns exemplos são aqueles fatores relacionados a quimiotaxia, motilidade, capacidade de adesão às células vegetais, biossíntese de polissacarídeos e formação de biofilme (Mitter et al., 2013), além da capacidade de degradação de compostos orgânicos complexos e detoxificação de EROS (Mitter et al., 2013). A resistência aos antimicrobianos e produção de fatores de virulência também são características que conferem vantagens competitivas aos MPCP durante o processo colonização (Shankar et al., 2012; Lòpez-Fernández et al., 2015).

1.7. Microrganismos usados como biofertilizantes

Biofertilizantes são formulações baseadas em estirpes microbianas com comprovado potencial de promoção de crescimento vegetal e que podem ser cultivadas e inoculadas às plantas (Vessey, 2003). Esses microrganismos são denominados inoculantes. No Brasil, os produtos que utilizam microrganismos benéficos para o crescimento das plantas são desenvolvidos de acordo com protocolos estabelecidos pela Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) com a supervisão do ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Embrapa, 2013). A promoção do crescimento das plantas em resposta à presença do inoculante pode ser medida de forma indireta através de análises de produção de grãos e crescimento da planta, que podem ser expressos tanto pela massa da matéria seca da parte aérea ou raízes, como pela altura das plantas (Coelho et al., 2007). O registro do inoculante deve ser feito no MAPA mediante a realização dos testes de viabilidade e de eficiência agrônômica, seguindo as orientações expedidas por meio da Instrução Normativa MAPA/SDA nº 13, de 2011, bem como, a observância dos métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza, de acordo com o previsto na Instrução Normativa Mapa/SDA nº 30, de 2010 (Araújo & Vasconcelos, 2017).

Dentre os microrganismos, as bactérias são mais utilizadas nos estudos de formulação de inoculantes para as plantas, devido ao seu rápido crescimento e capacidade de secretar compostos antimicrobianos, uma vez que essas características são relevantes para competição e estabelecimento no ambiente solo-planta (Compant et al., 2010). No Brasil, existem diversos relatos de promoção de crescimento de milho pela inoculação de rizobactérias; porém, atualmente, apenas estirpes envolvidas com a fixação biológica de N₂ são produzidas na forma de inoculantes comerciais (Hungria et al., 2007). *Azospirillum brasilense* é a estirpe base presentes nos inoculantes Masterfix Gramíneas (Stoller, Brasil) e NITRO1000 gramíneas (Nitro1000, Brasil) e bactérias do gênero *Azospirillum* sp. também são usadas na fabricação do AzoTotal e do Azzofix (Milléo & Cristófoli, 2016). De acordo com os fabricantes, a aplicação de inoculantes estimula o desenvolvimento e crescimento das raízes, aumentando a área de absorção de água e nutrientes (Melo, 2015). Como consequência, proporciona economia de até 50% no uso de adubo nitrogenado e ganho significativo na produtividade (Melo, 2015).

No mercado de inoculantes de microrganismos solubilizadores de fosfato, existem alguns produtos como o Biophos comercializado na Nova Zelândia, à base de *Aspergillus niger*, JumpStart nos EUA; Philom Bios no Canadá, à base de *Penicillium bilaiae*, o PR-70 RELEASE, produzido pela Bio-Care Technology na Austrália, utilizando *P. radicum*. No Brasil, mais recentemente, a produção do Bioativo pela empresa Instituto de Fosfato Biológico, no qual a solubilização do P a

partir da rocha fosfática é feita pela comunidade microbiana presente na matéria orgânica (estercos bovinos e de aves) adicionada no processo de fabricação deste fertilizante (IFB, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O milho é um dos principais cereais produzidos no mundo, com aproximadamente 900 milhões de toneladas produzidas anualmente (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2017). Para garantir essa produção, é necessário alto investimento em aditivos agrícolas como fertilizantes e pesticidas. O P é um nutriente essencial para esta cultura, especialmente nos estágios de florescimento e enchimento de grãos. Toneladas desse nutriente são adicionadas ao solo anualmente. Entretanto, a necessidade de uso intensivo desse nutriente contribui para aumento dos custos de produção e efeitos negativos ao ambiente, como a eutrofização de águas superficiais. Além disso, as reservas mundiais de fosfato são recurso finito, o que motiva esforços de pesquisa direcionados para o uso de fontes alternativas de P como os fosfatos de rocha (FR). Embora os FR apresentem menor reatividade do que os fertilizantes solúveis para aplicação direta no solo, são fontes mais baratas e, ambientalmente menos impactante. Além disso, o uso combinado dessas rochas com microrganismos solubilizadores de P tem aumentado a disponibilidade desse nutriente.

Os microrganismos capazes de solubilizar o P geralmente liberam ácidos orgânicos no meio que atuam na hidrólise das moléculas de fosfato ou na quelação de íons que estão ligados ao fosfato, liberando-o na solução do meio. Além disso, no sistema solo-planta, os microrganismos na rizosfera podem aumentar o conteúdo de P pela hidrólise do P orgânico através da ação de enzimas fosfatases, especialmente fitases. Outra importante interação dos microrganismos com as plantas, é a simbiose com os fungos micorrízicos que contribuem para o aumento da absorção de P pelo vegetal, principalmente em solos com deficiência deste nutriente. Dessa forma, a investigação da estrutura e composição da microbiota associada à rizosfera das plantas em condições de deficiência de P pode ajudar a esclarecer o efeito desta condição nas interações microrganismo-planta-solo. Nesse contexto, métodos independentes de cultivo como a metataxonômica tem permitido conhecer os grupos microbianos de um dado ambiente, o que não seria factível pelos métodos clássicos de cultivo na microbiologia.

Contudo, além da solubilização e aquisição de P, os microrganismos podem participar de inúmeros mecanismos de promoção do crescimento vegetal, como a aquisição de outros nutrientes como nitrogênio (N) e ferro (Fe), produção de fitohormônios e de compostos orgânicos voláteis (COVs) e, indiretamente, contribuir para o desenvolvimento vegetal mediante o controle biológico de fitopatógenos e a indução da resistência sistêmica das plantas. Estudos com bactérias promotoras do crescimento das plantas, por exemplo, têm sido estimulados visando o seu uso como bioinoculantes para a agricultura. Alguns inoculantes utilizando bactérias já tem sido avaliados para

o milho, como *Azospirillum brasilienses* inoculado nas sementes do milho tem contribuído para o aumento do sistema radicular desta planta, resultando no aumento do volume de solo explorado e, conseqüentemente, maior desenvolvimento vegetal. Efeitos positivos da inoculação de outras bactérias relacionadas com fixação de nitrogênio em milho também já foram reportados, incluindo linhagens de *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia* spp. e *Herbaspirillum*.

Dessa forma, a seleção dessas bactérias candidatas a bioinoculantes para as plantas se torna importante no contexto de biotecnologia agrícola podendo ser realizada por meio do isolamento e avaliação em testes *in vitro*, seguido de reintrodução das bactérias mais eficientes no sistema solo-planta. Neste estudo, dois isolados de *Serratia marcescens* que foram selecionados a partir de experimentos *in vitro* e dos testes realizados em casa de vegetação tiveram seus genomas sequenciados visando a investigação dos diferentes mecanismos de promoção do crescimento das plantas, bem como dos possíveis fatores de patogenicidade. A análise em nível de genoma nos permite acessar tais características de forma mais ampla e rápida. Além disso, a escolha dessas duas bactérias isoladas do mesmo nicho (tecidos internos da raiz) permite-nos a investigação da presença de características que podem estar sendo importantes para a adaptação a este nicho mediante a comparação com *Serratia* sp. isoladas de outros ambientes.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Acessar a diversidade da comunidade microbiana associada ao milho cultivado com fosfato de rocha por meio do sequenciamento de amplicons e avaliar bactérias isoladas da rizosfera e endofíticas quanto ao potencial promoção do crescimento vegetal por meio de ensaios *in vitro*, *in vivo* e predição gênica.

Objetivos específicos

Artigo 1. Long-Term Rock Phosphate Fertilization Impacts the Microbial Communities of Maize Rhizosphere

- Avaliar a diversidade de bactérias e fungos associados à rizosfera de milho cultivado com fosfato de araxá por meio de metagenômica baseada em amplicons usando como marcadores taxonômicos os genes do rRNA 16S e ITS, respectivamente;

- Avaliar o efeito da adição do fosfato de araxá em relação ao supertriplo e a não adição de fosfato na composição da comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera de milho pelo sequenciamento de amplicons e pela técnica do T-RFLP;
- Avaliar o efeito dessas diferentes adubações fosfáticas nos parâmetros de crescimento, produtividade, e teores de nutrientes nas plantas e nos grãos de milho;
- Correlacionar os parâmetros de crescimento e produtividade do milho com a composição da comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera do milho nos tratamentos com as diferentes fontes de P.

Artigo 2. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato e avaliação de seu potencial na promoção do crescimento de plantas

- Isolamento de bactérias da rizosfera de milho cultivado sem adição de P e adubado com fosfato de Araxá;
- Identificar com base no sequenciamento de regiões do gene rRNA 16S as bactérias isoladas da rizosfera do milho.
- Avaliar *in vitro* o potencial de solubilização de fosfato de Araxá e fosfato de ferro das bactérias isoladas da rizosfera e bactérias endofíticas de milho pertencentes a coleção da Embrapa Milho e Sorgo e da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG;
- Avaliar a promoção de crescimento do milheto em ensaio de casa de vegetação utilizando fosfato de rocha como fonte de P de nove bactérias pré-selecionadas nos ensaio *in vitro*
- Investigar o potencial genômico para a solubilização/mineralização de P e produção de fitohormônios das nove bactérias pré-selecionadas nos ensaio *in vitro*

Artigo 3. Comparative study of the genome of endophyte *Serratia marcescens* isolated from *Zea mays* with the genomes of *Serratia* strains isolated from different lifestyles

- Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas de duas linhagens endofíticas de *Serratia marcescens* isoladas do milho e que apresentaram potencial de promoção do crescimento de plantas nos testes *in vitro* e *in vivo*.
- Comparação via análise de pangenoma das características relacionadas à promoção do crescimento de plantas, patogênese e estilo de vida.
- Investigação da evolução desses genomas com base na sintenia gênica.
- Análise das características presentes no mobiloma destes genomas



Long-Term Rock Phosphate Fertilization Impacts the Microbial Communities of Maize Rhizosphere

Ubiana C. Silva¹, Julliane D. Medeiros², Laura R. Leite², Daniel K. Morais^{2,3}, Sara Cuadros-Orellana^{2,4}, Christiane A. Oliveira⁵, Ubiraci G. de Paula Lana⁵, Eliane A. Gomes⁵ and Vera L. Dos Santos^{1*}

¹ Microbiology Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Biosystems Informatics and Genomics Group, René Rachou Research Center, Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil, ³ Microbiology Institute, Czech Academy of Sciences – CAS, Prague, Czechia, ⁴ Centro de Biotecnología de los Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile, ⁵ Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Diana Elizabeth Marco,
National Scientific and Technical
Research Council (CONICET),
Argentina

Reviewed by:

Aymé Spor,
INRA, UMR1347 Agroécologie,
France
David Dowling,
Institute of Technology Carlow, Ireland

*Correspondence:

Vera L. Dos Santos
verabio@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 27 April 2017

Accepted: 23 June 2017

Published: 11 July 2017

Citation:

Silva UC, Medeiros JD, Leite LR,
Morais DK, Cuadros-Orellana S,
Oliveira CA, de Paula Lana UG,
Gomes EA and Dos Santos VL
(2017) Long-Term Rock Phosphate
Fertilization Impacts the Microbial
Communities of Maize Rhizosphere.
Front. Microbiol. 8:1266.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01266

Phosphate fertilization is a common practice in agriculture worldwide, and several commercial products are widely used. Triple superphosphate (TSP) is an excellent soluble phosphorus (P) source. However, its high cost of production makes the long-term use of crude rock phosphate (RP) a more attractive alternative in developing countries, albeit its influence on plant-associated microbiota remains unclear. Here, we compared long-term effects of TSP and RP fertilization on the structure of maize rhizosphere microbial community using next generation sequencing. Proteobacteria were dominant in all conditions, whereas Oxalobacteraceae (mainly *Massilia* and *Herbaspirillum*) was enriched in the RP-amended soil. *Klebsiella* was the second most abundant taxon in the RP-treated soil. *Burkholderia* sp. and *Bacillus* sp. were enriched in the RP-amended soil when compared to the TSP-treated soil. Regarding fungi, Glomeromycota showed highest abundance in RP-amended soils, and the main genera were *Scutellospora* and *Racocetra*. These taxa are already described as important for P solubilization/acquisition in RP-fertilized soil. Maize grown on TSP and RP-treated soil presented similar productivity, and a positive correlation was detected for P content and the microbial community of the soils. The results suggest changes of the microbial community composition associated to the type of phosphate fertilization. Whilst it is not possible to establish causality relations, our data highlights a few candidate taxa that could be involved in RP solubilization and plant growth promotion. Moreover, this can represent a shorter path for further studies aiming the isolation and validation of the taxa described here concerning P release on the soil plant system and their use as bioinoculants.

Keywords: microbial community, maize rhizosphere, rock phosphate

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main cereals produced in the world, with approximately 900 million tons produced annually (United State Department of Agricultural, 2017). Phosphorus (P) is an essential nutrient for this crop, especially in the flowering and grain filling stages (Vasconcellos et al., 2000) and to ensure this production, millions of tons of P fertilizer are added to soils each year

(Koppelaar and Weikard, 2013). However, this overuse of P fertilizers raises the cost of production and can exert negative impacts on aquatic environment by the eutrophication of surface water (Dodds et al., 2009). In addition, phosphate reserves are a finite resource that are predicted to be depleted in the next few centuries (Cordell and White, 2011). This can become a limiting factor in global food production. Research efforts have been directed to the use of rock phosphate (RP) as P fertilizers as they have lower costs, are agronomically more useful and environmentally more feasible than soluble P. Although RP has a lower reactivity than commercial fertilizers for direct application on the soil, P availability from these rocks can be increased over years of cultivation, for instance, due to the action of the soil microbiota (Coutinho et al., 1991). Actually, P-solubilizer microorganisms have been described at this niche (Whitelaw, 1999; Linu et al., 2009; Silva et al., 2014; Matthews and Adzahar, 2016). Organic acid production has been pointed as the main factor involved in RP microbial solubilization (Rashid et al., 2004; Mendes et al., 2014). Nevertheless, other mechanisms, such as the release of H^+ ions during NH_4^+ assimilation or metabolic reactions that trigger proton excretion such as cellular respiration, can also contribute to P solubilization (Illmer and Schinner, 1995). Furthermore, microorganisms at the rhizosphere can increase P supply by hydrolysis of organic P through the action of phosphatases, especially phytases (Richardson and Simpson, 2011). Important factors for increasing plant P acquisition includes roots architecture alteration in many plant families like root cluster formation, proliferation and increase of lateral length, a higher number of root hairs, and a reduced length and thickness of the primary root (Hammond et al., 2009; Hunter et al., 2014). All these processes have a strong influence on the microbial communities that colonize the rhizosphere of these plants, and studies suggest that plants can attract P solubilizing microorganisms according to their root structure and the compounds released from exudates (Bolan et al., 1997; Grayston et al., 1998; Broeckling et al., 2008; Guo and Wang, 2009; Hartmann et al., 2009; Chaparro et al., 2012; Hunter et al., 2014).

The impact of RP on rhizosphere microbial diversity is still poorly understood. Recently, culture-independent methods, such as “meta-omics” based on next generation sequencing, have helped to shed some light on the diversity associated to plant–microorganism–soil interactions (Aira et al., 2010; Chhabra et al., 2013; Peiffer et al., 2013; Li et al., 2014). These techniques provide access to a collection of microbial groups related to certain environmental conditions and contribute to the description of non-cultivated taxa by the classic methods of microbiology. Based on the exposed, we used a culture-independent approach to analyze the effect of 3 years of maize fertilization with RP on the microbial community diversity of the rhizosphere. We hypothesized that long-term RP fertilization will drive the selection of efficient P solubilizing or uptake microorganisms to the rhizosphere of maize comparing to conventional use of soluble fertilizers. The results may contribute to understanding of the microbial ecosystem services to the plants. In the future, the use of microbial inoculants able

to improve P release/acquisition by plants along with RP fertilization can become a sustainable agriculture practice that will reduce of the environmental impacts besides of the costs production.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

The field site is located at Embrapa Maize and Sorghum in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil ($19^{\circ}28'S$ $44^{\circ}15'W$). The experiment was conducted in an agricultural Oxisol of the Brazilian Savanna biome (Cerrado), classified as a low P soil (Supplementary Table S1). This area was cultivated for 3 years with the 30F35YH hybrid maize (Pioneer, Brazil) on a system of two annual cultivations, one in summer and the other in winter. Each cultivation was conducted using the same P fertilization conditions, namely, soil fertilized with RP (rock phosphate of Araxá), soil with triple superphosphate (TSP, a commercial P fertilizer), and soil without added P. The experimental design was composed of these three types of P fertilization in three replicates. P_2O_5 concentration on the control soil was 4 kg/ha and was adjusted to 100 kg/ha on the RP or TSP fertilized soil. Each experimental plot consisted of six rows that were 5 m long and spaced at 70 cm. The useful experimental area consisted of 14 m² of the four central rows of 5 m, eliminating the two border rows.

Sample Collection for Metataxonomic and Growth Parameters Analysis

Rhizospheric soil was collected at 60 days after sowing (flowering time) from the plants in the summer period of the 3rd year of cultivation. Each triplicate consisted of five randomly chosen plants. Initially, the roots of the plants collected in the field were washed with water under pressure to remove excess soil. Then, approximately 5 g (fresh weight) of the fine roots with adhering rhizosphere soil from each replicate were transferred to 50 mL Falcon tubes with 30 mL of phosphate buffer (per liter: 6.33 g of $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ and 16.5 g of $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$). Samples were shaken for 30 s and the roots were transferred to new Falcon tubes containing 30 mL of phosphate buffer. The soil obtained from this procedure corresponded to the first soil fraction. Roots were homogenized in the phosphate buffer again and sonicated at low frequency (50–60 Hz) for 5 min, followed by five cycles of sonication for 30 s and rest for 30 s. Roots were removed and the second fraction of the obtained soil was mixed with the first soil fraction and centrifuged. The pellet obtained after this procedure, considered rhizosphere soil, was frozen in liquid nitrogen and stored at $-80^{\circ}C$ until DNA extraction.

Subsamples of shoots and grains corresponding to a stand of 45 plants at the end of the experiment (approximately 90 days of culture) were collected for measuring parameters related to plant growth, such as nutrients content, plant biomass and grain productivity. Also, the rhizosphere soil of five plants in three replicates for each treatment was collected at flowering time for determination of P content.

PCR Amplification and Sequencing

Metagenomic DNA was extracted from rhizosphere soil samples using a Max Power Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, United States). DNA was quality-checked using agarose gel electrophoresis and quantified by absorbance at 260 nm on a spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, United States). The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified from DNA using the primer pair 341F and 806R (Klindworth et al., 2013) and the ITS region was amplified using the primer pair ITS3_KYO1F and ITS4_KYO1R (Toju et al., 2012) (Supplementary Table S2). The primers were modified to contain an overhang sequence complementary to the Nextera Index (Illumina, San Diego, CA, United States). A PCR reaction was performed in 25 μ L of final volume, which contained, briefly, 12.5 μ L of PCR buffer (2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix), 5 μ M of primer and 30 ng of DNA. PCR amplification was performed using 95°C for 3 min of initial denaturation, followed by 30 cycles at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 5 min. The amplicons were purified with AMPure XT beads (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, United States). Then, amplicons were ligated to an index sequence during a second PCR, containing 12.5 μ L of PCR buffer (2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix), 3 μ L of each Nextera XT index, 2.5 μ L of the PCR purified product and 7 μ L of ultrapure water (25 μ L final volume). Amplification was performed at 95°C for 3 min, eight cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 5 min. Amplicons were purified using AMPure XP beads and the size of the libraries was checked using Bioanalyzer DNA 1000 Assay (Agilent, Santa Clara, CA, United States) and quantified using the KK4824 Kapa kit (Biosciences, Woburn, MA, United States). The paired-end (2 \times 300 bp) libraries were sequenced using a MiSeq Reagent V3 Kit.

DNA Sequence Analysis

The DNA sequences were analyzed using a modified version of the pipeline recommended by the Brazilian Microbiome Project (<http://www.brmicrobiome.org/>; Pyro et al., 2014). Briefly, quality control of the sequence data was performed with

Trimmomatic v0.32 (Bolger et al., 2014), with an average Phred score of 15 into a sliding window composed of 4 bp. Then, the sequences were truncated to a size of 400 bp for bacteria and 300 bp for fungi, and unique sequences (singletons) were removed. Chimeric sequences were filtered using USEARCH (Edgar, 2010). Taxonomy was assigned using Greengenes_13_08 for the bacteria database and UNITE_2016_08_04 for the fungi database at 97% similarity and was performed using the QIIME package (Caporaso et al., 2010). To improve the taxonomic assignment of the Oxalobacteraceae and Gigasporaceae families, their sequences were also aligned using the SINA Alignment Service from Silva (Pruesse et al., 2012) and NCBI BLASTn (Altschul et al., 1990) from GenBank, respectively.

The sequence data have been submitted to the GenBank databases under accession number PRJNA379083 for bacterial community and PRJNA379918 for fungal community.

AMF Community Analysis by T-RFLP

For arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) community analysis by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), the 28S rRNA gene was amplified using the general fungal LR1 and FLR2 primers (Van Tuinen et al., 1998; Trouvelot et al., 1999), followed by a nested PCR reaction employing the AMF-specific primers FLR3 (5' labeled with 6-FAM) and FLR4 (5' labeled with NED) (Gollotte et al., 2004). The PCR contained 1 \times reaction buffer, 0.2 μ M of each primer, 2.5 mM of MgCl₂, 0.125 mM of dNTPs, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) and 50 ng of DNA in a final volume of 50 μ L. A nested PCR reaction was performed with 2.5 μ L of the products from the first PCR reaction in the same conditions reported above. Thermal cycling for all reactions included an initial denaturing step of 95°C for 5 min, 35 cycles consisting of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C, followed by a final extension step of 72°C for 10 min. The amplified fragments were digested using the restriction enzyme *TaqI* (New England Biolabs, Beverly, MA, United States) and were incubated for 6 h at 65°C. To evaluate the generated fragments, 2 μ L of the digestion was mixed to 9.8 μ L of deionized formamide (Applied Biosystems, Foster

TABLE 1 | Read numbers obtained from sequencing, OTU number, richness estimators, and diversity indices of the P treatments for bacteria and fungi community, adjusted for 37,000 and 100,000 reads, respectively.

Group	Treatment ¹	N° reads ²	N° OTU ³	Richness estimator		Diversity index	
				Chao1 ⁴	ACE ⁵	Shannon ^{6,7}	Simpson ⁸
Bacteria	Control	84, 224 \pm 23, 034	1258 \pm 140 a	1329 \pm 145 a	1315 \pm 140 a	6.4 \pm 0.4 b	0.92 \pm 0.03 b
	RP	77, 972 \pm 19, 846	1441 \pm 128 a	1513 \pm 116 a	1501 \pm 116 a	7.6 \pm 0.35 a	0.98 \pm 0.01 a
	TSP	60, 211 \pm 12, 328	1463 \pm 88 a	1536 \pm 79 a	1519 \pm 82 a	8.3 \pm 0.03 a	0.99 \pm 0.01 a
Fungi	Control	257, 511 \pm 97, 148	628 \pm 44 a	649 \pm 40 a	652 \pm 42 a	5.4 \pm 0.4 a	0.92 \pm 0.03 a
	RP	269, 627 \pm 56, 806	724 \pm 84 a	759 \pm 80 a	756 \pm 83 a	6.1 \pm 0.1 a	0.96 \pm 0.01 a
	TSP	249, 197 \pm 53, 537	658 \pm 55 a	696 \pm 54 a	696 \pm 53 a	5.2 \pm 0.8 a	0.86 \pm 0.01 a

¹Treatments: control, without added P; RP, rock phosphate added; TSP, triple superphosphate added. ²Mean and standard error of the read numbers for triplicates in each condition. ³Analysis of variance adjusted to the negative binomial distribution followed of the contrast test at 5% for bacteria and fungi community. ^{4,5,6,8}Analysis of variance followed by a Scott Knott test at 5% for bacteria and fungi. ⁷Analysis of variance using distribution of Poisson followed of the contrast test at 5% for fungi, according to the Shannon index. Means with the same letter is equal according to Scott Knott test or Contrast test at 5%.

City, CA, United States) and 0.2 μ L standard ROX 500 (Applied Biosystems). Analysis was performed on the 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the GeneMapper 5.0 software. T-RF profiles were selected by the software if their minimum peak height was above the noise observed, usually above 50 relative fluorescence units. Only peaks between 50 and 500 bp were considered to avoid peaks caused by primer-dimers and to obtain fragments within the linear range of the internal size standard. T-RF length profiles for AMF were loaded into the online T-RFLP processing software T-REX (Culman et al., 2009) for noise filtering and peak alignment.

Statistical Analysis

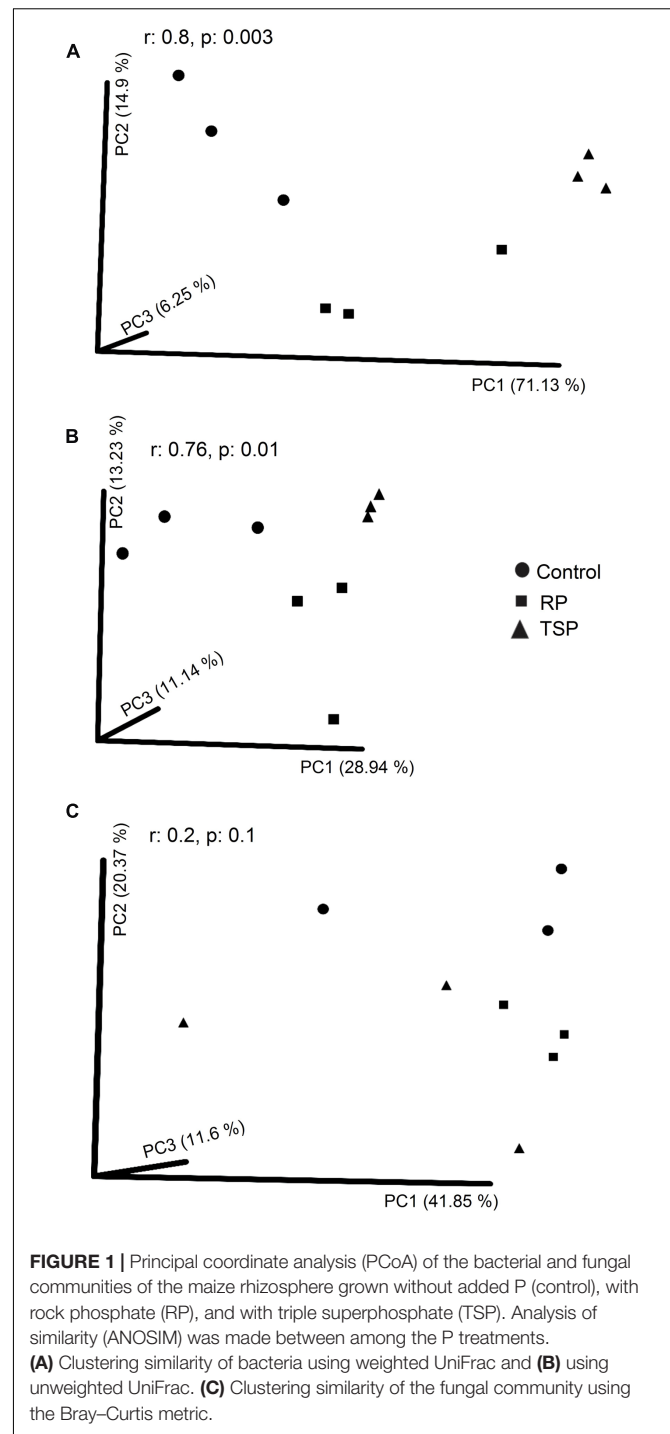
Nutrient content, plant biomass and grain productivity of the plants were measured and submitted to variance analysis. Means of different response factors were compared by a Scott Knott test ($p < 0.05$).

T-RFLP data were analyzed using non-metric multidimensional scaling (NMDS) with a Jaccard similarity matrix. Permutational multivariate analysis of variance of the distance matrix was then performed by an Adonis test using the Vegan package in the R program (R Development Core Team, 2008).

Taxonomic classification and alpha and beta diversity analyses were performed using the core diversity pipeline of the QIIME package. Rarefaction curves were constructed based on the observed operational taxonomic units (OTUs) number per reads for bacteria and fungi, and these curves were evaluated by good coverage analysis. To assess the diversity of the samples, we used the coverage estimator Ace, the richness estimator Chao1 and the Shannon and Simpson diversity indices.

Analyses of variance were performed to indices, followed by a Scott Knott test at 5% probability for Ace, Chao1, and Simpson (for bacteria and fungi) and for Shannon (for bacteria). Analysis of variance of the Shannon index for fungi was performed using a Poisson distribution, followed by a contrast test at 5% probability. Additionally, for comparing the OTU number, we used the negative binomial distribution, followed by a contrast test at 5% probability. Variance analysis, followed by a Scott Knott test at 5%, was also used to determine differences at the levels of phyla and families (only for groups with at least 3% relative abundance). Moreover, significance analysis of the relative abundance of the bacterial and fungal taxa was held at a family level (values greater than 0.1%) using the edgeR package. All of the above analysis were performed using R program.

Principal coordinates analysis (PCoA) was performed using the weighted and unweighted UniFrac distance metrics for bacteria and the Bray–Curtis metric for fungi to show the influence of P fertilization on beta diversity. Similarity analysis (ANOSIM) of the clustering was used to evaluate the contribution of the P treatments on microbial communities between samples. In addition, we conducted an NMDS analysis using the Rho metric for bacteria and fungi to assess the sources of variation in the bacteria and fungi community matrices (constructed using OTU number, taxa richness, and family abundance) due to plant biomass, grain yield and P accumulated in the soil using the Past program.



RESULTS

P Fertilization Affects the Structure and Composition of the Maize Rhizosphere Microbial Community

Following assembly and quality filtering, a total of 667,222 high-quality reads of the bacterial 16S rRNA gene were obtained

from nine samples of rhizospheric soil with an average of 74,136 reads/sample. For fungal amplicon libraries, 2,329,006 high-quality reads were also obtained from the nine samples of rhizospheric soil (an average of 258,778 reads per sample). OTUs having at least 97% sequence similarity with reads deposited in the used databases (Greengenes and Unite) was represented in rarefaction curves within each treatment (**Supplementary Figures S1A,C**). Rarefaction curves tend to an asymptote reaching 0.99 of Good Coverage values (**Supplementary Figures S1B,D**), indicating that the depth of the sequencing was sufficient to accurately characterize both the bacterial and fungal communities in the samples. Bacterial richness (Chao1 and Ace) was greater than fungal richness in all samples (**Table 1**), but there were no significant differences between the treatments ($p = 0.10$; $\alpha = 0.05$). According to Shannon's and Simpson's indices, the bacterial diversity was higher in the treatments RP and TSP added ($p = 0.02$; $\alpha = 0.05$) when compared to the control (**Table 1**), which showed lower equitability. For fungi, the distribution of OTUs among species (equitability) was favored to a higher extent by the RP treatment (Simpson's index = 0.96), followed by the control (0.92) and the TSP treatment (0.86) (**Table 1**).

We used the distance matrix of weighted UniFrac (**Figure 1A**) and found a clustering of the bacterial communities into three groups, depending on the P treatments. However, the transformations based on the unweighted UniFrac distance showed a reduction in variance related to the P treatments (**Figure 1B**). For fungi, there was no separation of the samples at different P fertilization treatments using Bray–Curtis in the PCoA (**Figure 1C**). However, T-RFLP allowed grouping the samples ($p = 0.003$) depending on the given P treatments for the AMF (**Supplementary Figure S2**).

In general, differences in the abundance of bacterial community taxa were observed between P treatments (**Figure 2**). Regarding RP fertilized soil, the most abundant phylum was Proteobacteria (52%), followed by Planctomycetes (11%), Actinobacteria (7.8%) and Chloroflexi (5.8%) (**Figure 2A**). In the TSP, Proteobacteria (41%) was also the most abundant, followed by Planctomycetes (13.6%), Actinobacteria (8.6%), Chloroflexi (8.5%) and Acidobacteria (6.4%). On the control, the phylum Proteobacteria corresponded to 64.7% of the reads, followed by Chloroflexi with 6.2%, Planctomycetes with 5.6% and Actinobacteria with 5.4%. The major alteration corresponded to the decrease on the abundance of Proteobacteria with the use of TSP and RP in relation to control. For the other phyla, with exception for Firmicutes and Chloroflexi, it was observed an inverse effect: the relative abundance increased with the use of these P sources. **Figure 2B** summarizes the alterations observed in the bacterial community at family level. The dominant families were Enterobacteriaceae and Oxalobacteraceae. In the RP fertilized soil, there was a predominance of Oxalobacteraceae compared to the control and TSP treatments. Enterobacteriaceae was stimulated on the control and RP treatments (**Figure 2B**). The *Massilia* and *Herbaspirillum* genera were the most abundant of Oxalobacteraceae in the RP soil (**Figure 2C**). In addition, *Klebsiella* genus was the most abundant OTU found in the bacterial community, indicating its contribution to the

differentiation of samples between P sources. The main alterations between the bacterial and fungal communities on the maize rhizosphere cultivated with TSP and RP were further explored by the Volcano plot (**Figure 3A**) that shown a general perspective of the OTUs' fold changes between treatments according to the significance analysis of the relative abundance of the taxa using edgeR analysis. It was also observed predominance of Oxalobacteraceae in the RP fertilized soil compared to the TSP added soil, following by Burkholderiaceae and Bacillaceae (**Figure 3B**), comprised by *Burkholderia* and *Bacillus* genera (**Figure 2C**).

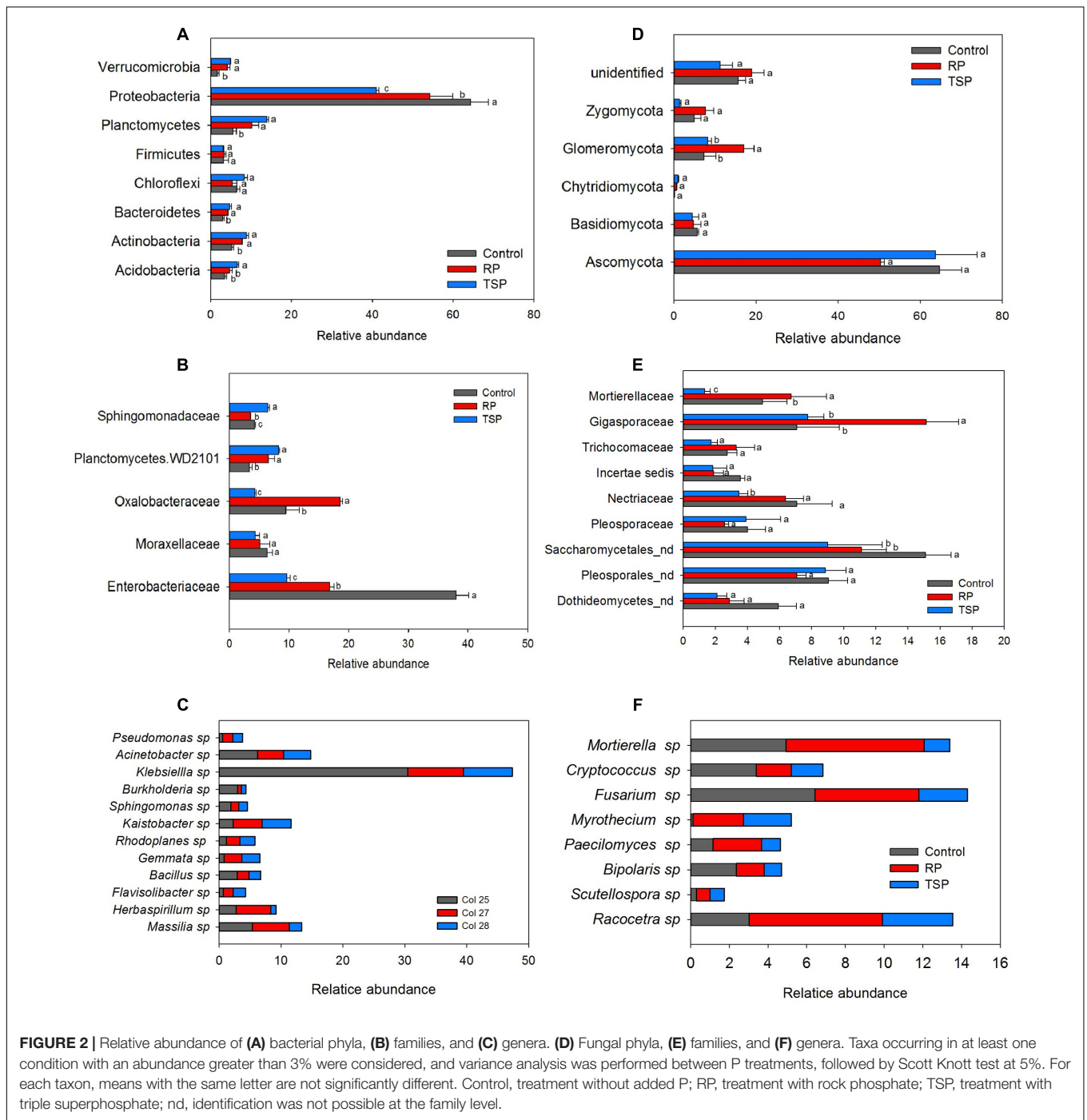
For the fungi, variation of the taxa abundance was also observed as a function of the P source. Ascomycota dominated in all experimental setup systems (**Figure 2D**). The second most abundant phylum was Glomeromycota, followed by Basidiomycota, Zygomycota, and Chytridiomycota. In the RP fertilized soil, the Glomeromycota OTUs were enriched in comparison to other treatments (**Figure 2D**), and Gigasporaceae was the dominant family in this niche (**Figure 2E**). *Scutellospora* and *Racocetra* were the most representative genera of this family (**Figure 2F**). Other families were abundant in the RP treatment in relation to TSP, according to edgeR analysis showed in the Volcano Plot (**Figures 3C,D**), such as Mortierellaceae and Acaulosporaceae, which showed *Mortierella* (**Figure 2F**) and *Acaulospora* (not showed data) as representative genera, respectively. Moreover, Saccharomycetales predominated in the control soil.

Soil P Content and Productivity of the Maize are Related to the Microbial Community

We used NMDS analysis to assess whether any parameters such as plant biomass, maize productivity, and P content on the soil (Supplementary Table S3) could be associated with the taxonomic variation of the microbial communities amidst P treatments (**Figure 4**). The formation of two groups was observed, one composed of the samples of the RP- and TSP-fertilized soils and the control soil, suggesting that the bacterial and fungal communities profile was altered in the control soil. For RP and TSP treatments, we observed positive correlation of the samples with grain yield, maize biomass and P content in the soil. Additionally, the values of all these parameters for the control decreased in relation to the RP- or TSP-fertilized soil (Supplementary Table S3).

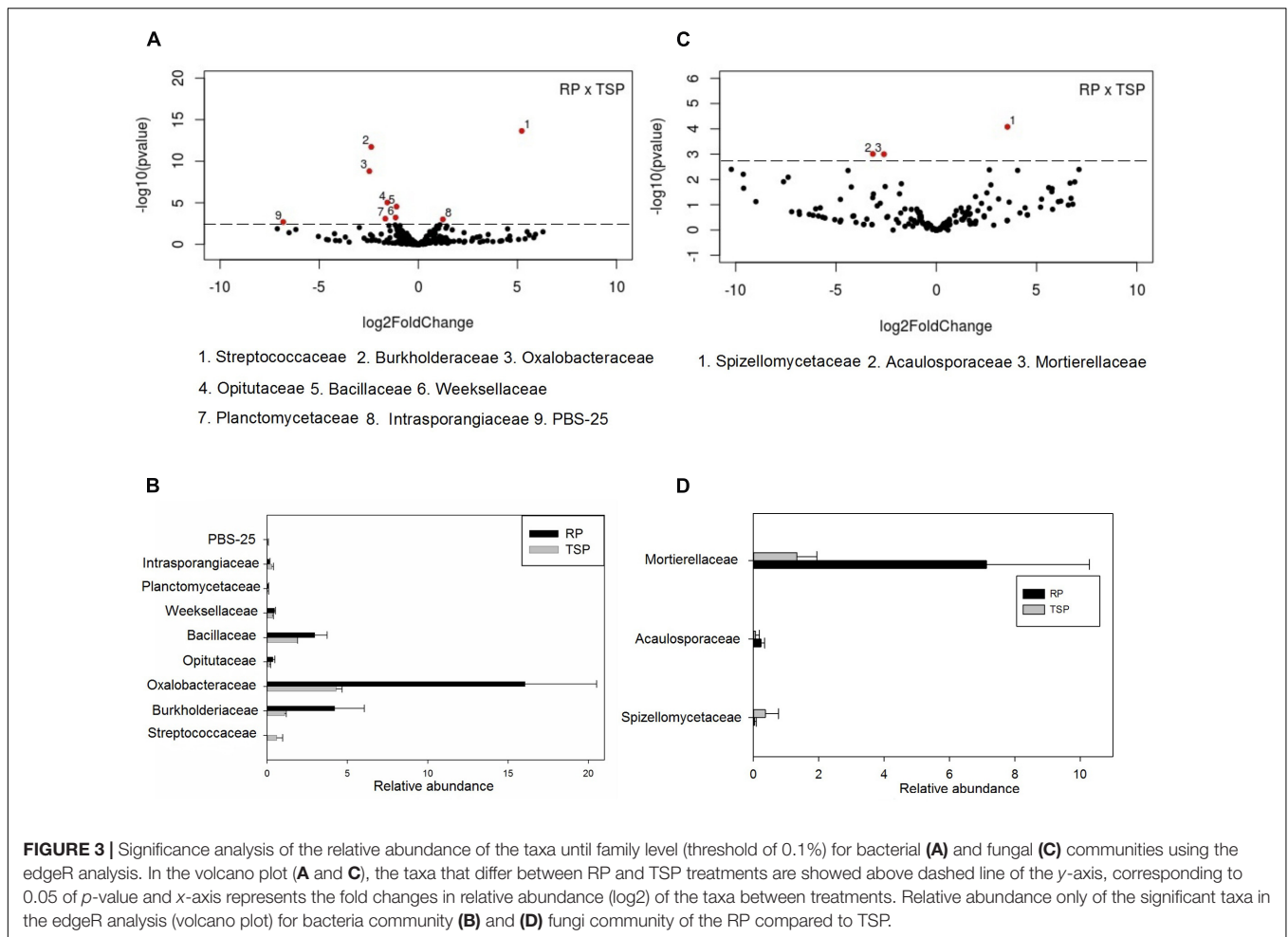
DISCUSSION

We used a metataxonomic approach to characterize the structure of the microbial community at maize rhizosphere under different P sources. The P fertilization type modified the taxa profile of the microbial community of maize rhizosphere (**Figure 1**). The abundance of OTUs from bacteria were more affected by P sources than richness, as noted in the separation of the bacterial community by weighted UniFrac, which considers phylogenetic affiliations and OTUs abundance (**Figure 1A**). These results are different from the unweighted UniFrac



(Figure 1B), which is sensitive only to the presence or absence of taxa, but not to OTUs abundance. Additionally, the Shannon and Simpson indices, which consider OTUs abundance, showed significantly higher values for P added samples (RP and TSP) in relation to the control for bacteria (Table 1). These results are different from previous studies that described a increase of the bacterial diversity in the P unfertilized soil (da Silva and Nahas, 2002; Toljander et al., 2008). It is possible that the effects of P sources on bacterial

diversity are variable and are likely to be site-dependent. Moreover, such effects can be somehow associated to the soil and rhizosphere microbiota capacity of recovery from environmental perturbations, mainly after long periods of exposition to such condition. Factors like soil chemistry, plant genotype, management techniques, and plant growth stage also has modified the bacterial community associated with the maize (Castellanos et al., 2009; Cavaglieri et al., 2009; Aira et al., 2010; Li et al., 2014).



We also evaluated which taxa were enriched or decreased in the RP treatment in relation to the TSP treatment and the control. Proteobacteria was the dominant phylum in all P treatments (Figure 2A), and was found to be predominant in the microbial community of the maize rhizosphere (Chauhan et al., 2011; Peiffer et al., 2013; Li et al., 2014; Yang et al., 2017). Different taxa related to this phyla responded differently to P treatments. While Enterobacteriaceae (gammaproteobacteria) decreased with TSP and RP, Oxalobacteraceae and Burkholderiaceae (betaproteobacteria) increased with RP addition (Figures 2B, 3B). Bacillaceae (Firmicutes) showed significantly higher abundance in RP when compared to TSP-fertilized soil (Figure 3B). The taxa stimulated in response to cultivation using RP share similarity with those found in the *Phaseolus vulgaris* rhizosphere such as Oxalobacteraceae, Enterobacteriaceae, besides Actinobacteria, Comamonadaceae, Bradyrhizobacteriaceae, and Pseudomonadaceae (Trabelsi et al., 2017).

Klebsiella sp., the most abundant genera of Enterobacteriaceae (Figure 2C), has been frequently found in association with the maize crop (Brusetti et al., 2005; Roesch et al., 2007; Arruda et al., 2013), and it comprises bacterial species that are able to improve P release (Rajput et al., 2013; Walpolá et al., 2014).

Our group isolated *Klebsiella* from the rhizosphere and from the endophytic microbiota of maize cultivated in low P soil (Vieira et al., unpublished data). *Massilia* and *Herbaspirillum* are the most abundant genera of the Oxalobacteraceae family, and have already been described as P solubilizing bacteria (Estrada et al., 2013; Wang et al., 2016). *Burkholderia* sp. (Burkholderiaceae) and *Bacillus* sp. (Bacillaceae) are also reported to be effective RP solubilizers, both *in vitro* assays (Gomes et al., 2014; Ghosh et al., 2016) or inoculated in plants (Baig et al., 2014; Stephen et al., 2015; Wahid et al., 2016). Furthermore, *Burkholderia* and *Herbaspirillum* are both diazotrophs.

Regarding fungal community, although clustering related to P source were not significant on PCoA (Figure 1C), the AMF community was divided according to P treatments using T-RFLP analysis (Supplementary Figure S2). Additionally, the Glomeromycota phylum showed the most evident change between treatments, being the most abundant phylum on RP added soil (Figure 2D). Among the AMF families, Gigasporaceae was significantly more abundant on the RP added soil (Figure 2E). *Scutellospora* and *Racocetra* genera were predominant in this family (Figure 2F). Our research group has also found Gigasporaceae in the rhizosphere of maize cultivated in low P level soil, especially *Racocetra* sp. (unpublished data).

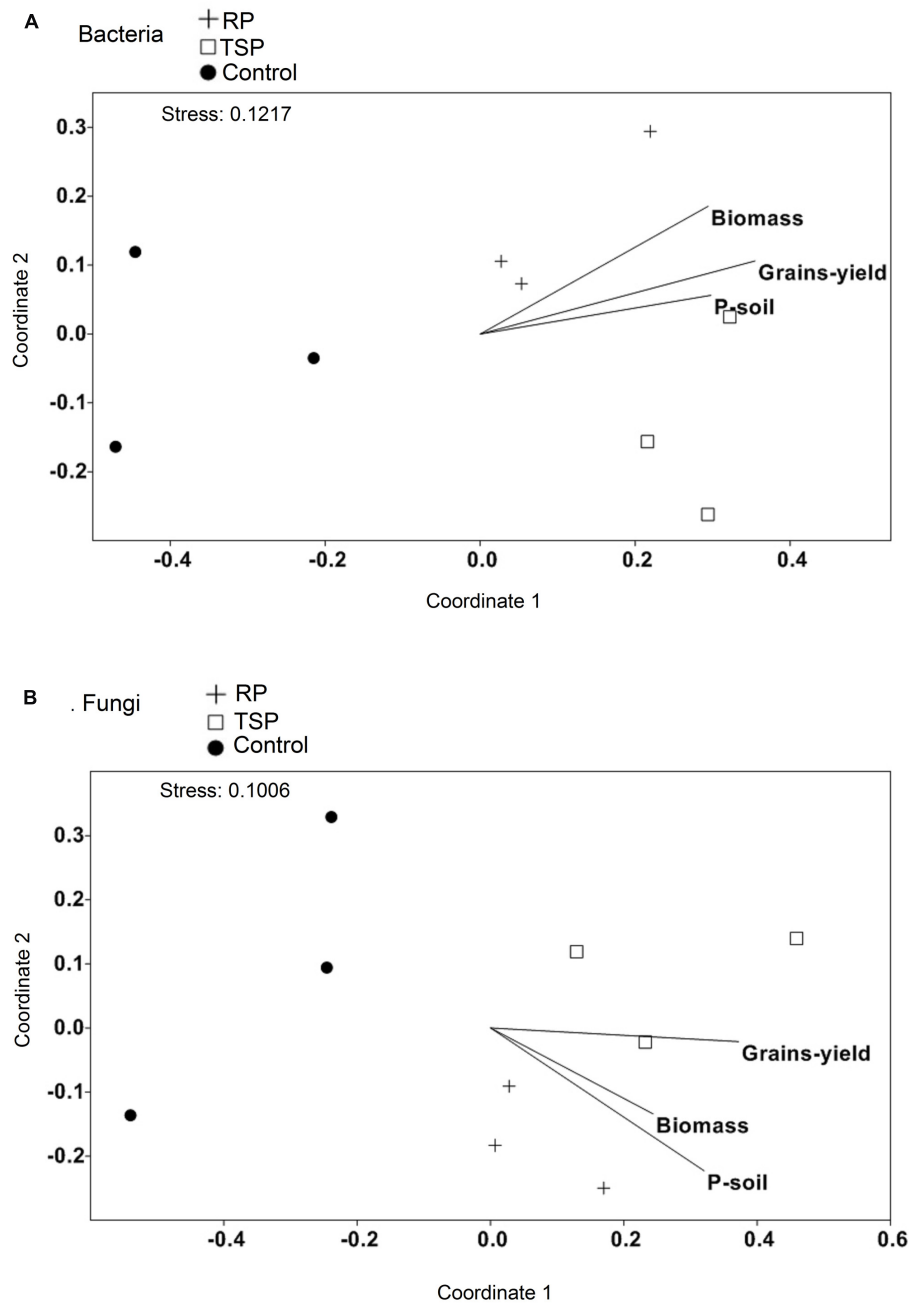


FIGURE 4 | Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of the composition of the **(A)** bacterial community and **(B)** the fungal community using a Rho metric. The samples were plotted with fitted environmental variables (biomass of the plant, grain yield, and P in the soil at the end of the experiment). Arrows indicate the direction of the correlation with the microbial community. For community composition, an OTU richness and phyla abundance with more than 1% of relative abundance were used. Treatments: soil without added P (control), soil treated with rock phosphate (RP), and soil with added triple superphosphate (TSP).

Acaulosporaceae family also showed a significant increase in their abundance in the RP added soil when compared to soil with TSP ($p < 0.05$) (Figures 3C,D). P absorption by maize can be related to greater AMF presence on RP soil, since plant-AMF symbiosis supports P supply to plants on low P availability soils (Nouri et al., 2014). Thus, this indicates that these fungi may have contributed to maize productivity in

RP treatment (Supplementary Table S3). *Mortierella* sp. also showed major abundance on RP-fertilized soil (Figure 2F), and was already reported as RP solubilizing fungi (Osorio and Habte, 2013; Vega et al., 2015). Moreover, synergistic effects of the inoculation of *Mortierella* sp. with AMF for plant P uptake and growth have been described (Zhang et al., 2011; Osorio and Habte, 2013).

Some studies have reported bacteria as symbionts of AMF hyphae. These were defined as “mycorrhiza helper bacteria,” which stimulate mycelial growth and/or contribute to inhibition of competitors and antagonists (Frey-Klett et al., 2007; Offre et al., 2008; Scheublin et al., 2010). Varied strains found in this work show symbiose with AMF. *Massilia* sp., for example, was reported by Cruz et al. (2008) to be associated to spores of AMF. *Burkholderia* and *Bacillus* genera were also reported as AMF symbionts from hyphosphera (Levy et al., 2003; Frey-Klett et al., 2007), and some *Burkholderia* strains isolated from AMF hyphae showed RP solubilization capacity (Taktek et al., 2015, 2017; Trabelsi et al., 2017). Thus, this result suggests that the high abundance of *Massilia* (Oxalobacteraceae), *Burkholderia* (Burkholderiaceae) and *Bacillus* (Bacillaceae) in the RP-fertilized soil could be associated to the greater abundance of AMF in this treatment when compared to the others (Figures 2C, 3B). Moreover, some bacterial genera enriched in the RP treatment have been described as auxin producers including *Herbaspirillum* spp. (Brusamarello-Santos et al., 2012), *Burkholderia* sp. and *Bacillus* sp. (Galdiano et al., 2011). This phytohormone is known to stimulate root growth that can also help P uptake by the plant once it increases its absorption surface area.

A lower AMF abundance in the TSP supplemented soil was expected since there is a significant decrease in the percentage of AMF colonization in the soil with high P level available (Smith et al., 1992). However, there was also a lower AMF abundance in the soil with no P addition, possibly due to the occurrence of P competition between the AMF hyphae and roots in the rhizosphere (Smith et al., 2011). Some studies have demonstrated that plants cultivated in very low P doses have decreased AMF colonization (Amijee et al., 1989; Koide and Li, 1990).

Our results are consistent with the long-term selection of P solubilizing microbial community. These microorganisms could be contributing to an increase on the P content in the RP-fertilized soil at the end of the 3 years of cultivation and to the facilitated P absorption by plants. This is evidenced by the maize plants growth profile cultivated in soil added RP, a low solubility phosphorus source, that was comparable to that of the plants cultivated in the TSP-added soil (Figure 4 and Supplementary Table S3). However, we do not neglect the plant's ability in acquiring nutrients by itself and the effects of physical-chemical processes over the 3-year cultivation, which may also contribute for soil P dynamics and consequently help its release in RP-fertilized soil (Goedert and Lobato, 1980; Coutinho et al., 1991). While it is not possible to infer cause-effect relationship in microbiota-phosphate acquisition, our study points to a few candidate groups possibly involved RP solubilization, which

could be further evaluated as inoculants in greenhouse and field studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

US, SC-O, CO, EG, and VD designed the experiment. US, JM, and UL obtained and processed the data. US, JM, LL, and DM analyzed the data. US and VD wrote the paper with contribution of all co-authors.

FUNDING

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), to Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant no 477349/2013-7 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) grant no. Apq-01819-13 for financial support.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the CPqRR platform by support in bioinformatics data processing (<http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/plataformas/>), Brazilian Microbiome Project for suggesting data analysis pipelines, to Anna Christina de Matos Salim and Flávio Marcos Gomes Araújo for their assistance in library construction and sequencing, and to Marcus V. Dias-Souza, for his suggestions on the manuscript. The Brazilian group belongs to the MCTI/CNPq/CAPES/FAPS (INCT-MPCPAgro).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01266/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Rarefaction curves of (A) bacteria and (C) fungi using QIIME software were calculated according observed OTU number in the treatment means. Control, without added P; RP, rock phosphate addition; TSP, addition of triple superphosphate. Furthermore, 0.99 of Good Coverage values from 10,000 reads for (B) bacteria and 20,000 for (D) fungi was observed in all treatments.

FIGURE S2 | Community of mycorrhizal fungi detected in the soil fertilized with RP, TSP, and without the addition of P (control). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was based on the matrix of Jaccard and it was performed variance analysis of the distance matrix using the multivariate permutation test (Adonis).

REFERENCES

- Aira, M., Gomez-Brandon, M., Lazcano, C., Baath, E., and Dominguez, J. (2010). Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2276–2281. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.08.029
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amijee, F., Tinker, P. B., and Stribley, D. P. (1989). The development of endomycorrhizal systems VII. A detailed study of the effects of soil phosphorus on colonization. *New Phytol.* 111, 435–446. doi: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb00706.x
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., et al. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L) in Rio Grande do Sul State (south Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Appl. Soil Ecol.* 63, 15–22. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.09.001

- Baig, K. S., Arshad, M., Khalid, A., Hussain, S., Abbas, M. N., and Imran, M. (2014). Improving growth and yield of maize through bioinoculants carrying auxin production and phosphate solubilizing activity. *Soil Environ.* 33, 159–168.
- Bolan, N. S., Elliott, J., Gregg, P. E. H., and Weil, S. (1997). Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils* 24, 169–174. doi: 10.1007/s003740050226
- Bolger, Anthony, M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 738–744. doi: 10.1128/AEM.02188-07
- Brusamarello-Santos, L. C. C., Pacheco, F., Aljanabi, S. M. M., Monteiro, R. A., Cruz, L. M., Baura, V. A., et al. (2012). Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 356, 113–125. doi: 10.1007/s11104-011-1044-z
- Brusetti, L., Francia, P., Bertolini, C., Pagliuca, A., Borin, S., Sorlini, C., et al. (2005). Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant Soil* 266, 11–21. doi: 10.1007/s11104-005-5399-x
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., and Costello, E. K. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Castellanos, T., Dohrmann, A. B., Imfeld, G., Baumgarte, S., and Tebbe, C. C. (2009). Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 383–393. doi: 10.1016/j.ejsobi.2009.07.006
- Cavaglieri, L., Orlando, J., and Etcheverry, M. (2009). Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiol. Res.* 164, 391–399. doi: 10.1016/j.micres.2007.03.006
- Chaparro, J., Sheflin, A., Manter, D., and Vivanco, J. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fertil. Soils* 48, 489–499. doi: 10.1007/s00374-012-0691-4
- Chauhan, P. S., Chaudhry, V., Mishra, S., and Nautiyal, C. S. (2011). Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. *J. Basic Microbiol.* 51, 15–32. doi: 10.1002/jobm.201000171
- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J. L., O’Gara, F., and N Dowling, D. (2013). Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *Microbiologyopen* 2, 717–724. doi: 10.1002/mbo3.1110
- Cordell, D., and White, S. (2011). Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustainability* 3, 2027–2049. doi: 10.3390/su3102027
- Coutinho, E. L., Natale, W., Nova, A. S. V., and Sitta, D. S. (1991). Eficiência agrônômica de fertilizantes fosfatados para a cultura da soja. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 26, 1393–1399.
- Cruz, A. F., Horii, S., Ochiai, S., Yasuda, A., and Ishii, T. (2008). Isolation and analysis of bacteria associated with spores of *Gigaspora margarita*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1711–1717. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03695.x
- Culman, S. W., Bukowski, R., Gauch, H. G., Cadillo-Quiroz, H., and Buckley, D. H. (2009). T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* 10:171. doi: 10.1186/1471-2105-10-171
- da Silva, P., and Nahas, E. (2002). Bacterial diversity in soil in response to different plans, phosphate fertilizers and liming. *Braz. J. Microbiol.* 33, 304–310. doi: 10.1590/S1517-83822002000400005
- Dodds, W. K., Bouska, W. W., Eitzmann, J. L., Pilger, T. J., Pitts, K. L., Riley, A. J., et al. (2009). Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environ. Sci. Technol.* 43, 12–19. doi: 10.1021/es801217q
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., de Oliveira, D. M., Urquiaga, S., and Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* 369, 115–129. doi: 10.1007/s11104-012-1550-7
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. A., and Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x
- Galdiano, R. F. Jr., Pedrinho, E. A. N., Castellane, T. C. L., and Lemos, E. G. D. M. (2011). Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 35, 729–737.
- Ghosh, R., Barman, S., Mukherjee, R., and Mandal, N. C. (2016). Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiol. Res.* 183, 80–91. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.011
- Goedert, W. J., and Lobato, E. (1980). Eficiência agrônômica de fosfatos em solo de cerrado. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 15, 311–318.
- Golotte, A., van Tuinen, D., and Atkinson, D. (2004). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14, 111–117. doi: 10.1007/s00572-003-0244-7
- Gomes, E. A., Silva, C. U., Marriel, I. E., Oliveira, C. A., and Lana, U. P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Rev. Bras. Milho Sorgo* 13, 69–81. doi: 10.18512/1980-6477/rbms.v13n1p69-81
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D., and Edwards, A. C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30, 369–378. doi: 10.1016/S0038-0717(97)00124-7
- Guo, H. C., and Wang, G. H. (2009). Phosphorus status and microbial community of paddy soil with the growth of annual Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) under different phosphorus fertilizer treatments. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 761–768. doi: 10.1631/jzus.B0920101
- Hammond, J. P., Broadley, M. R., White, P. J., King, G. J., Bowen, H. C., Hayden, R., et al. (2009). Shoot yield drives phosphorus use efficiency in *Brassica oleracea* and correlates with root architecture traits. *J. Exp. Bot.* 60, 1953–1968. doi: 10.1093/jxb/erp083
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., and Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321, 235–257. doi: 10.1007/s11104-008-9814-y
- Hunter, P. J., Teakle, G., and Bending, G. D. (2014). Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to *Brassica*. *Front. Plant Sci.* 5:27. doi: 10.3389/fpls.2014.00027
- Illmer, P., and Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates—Solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257–263. doi: 10.1016/0038-0717(94)00190-C
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1. doi: 10.1093/nar/gks808
- Koide, R. T., and Li, M. (1990). On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 114, 59–65. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00373.x
- Koppelaar, R. H. E. M., and Weikard, H. P. (2013). Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options. *Glob. Environ. Change* 23, 1454–1466. doi: 10.1016/j.gloenvcha.2013.09.002
- Levy, A., Chang, B. J., Abbott, L. K., Kuo, J., Harnett, G., and Inglis, T. J. (2003). Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6250–6256. doi: 10.1128/AEM.69.10.6250-6256.2003
- Li, X. Z., Rui, J. P., Mao, Y. J., Yannarell, A., and Mackie, R. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol. Biochem.* 68, 392–401. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.017
- Linu, M. S., Stephen, J., and Jisha, M. S. (2009). Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. and their potential interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Int. J. Agric. Res.* 4, 79–87. doi: 10.3923/ijar.2009.79.87
- Matthews, S., and Adzahar, M. S. (2016). Application of phosphate solubilising microorganisms to increase the solubilisation of rock phosphates in soil. *J. Trop. Agric. Food Sci.* 44, 9–18.
- Mendes, G. O., de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., and Costa, M. D. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann. Microbiol.* 64, 239–249. doi: 10.1007/s13213-013-0656-3

- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., and Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE* 9:e90841. doi: 10.1371/journal.pone.0090841
- Offre, P., Pivato, B., Mazurier, S., Siblot, S., Berta, G., Lemanceau, P., et al. (2008). Microdiversity of *Burkholderia* associated with mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 180–192. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00504.x
- Osorio, N. W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281. doi: 10.1139/cjcb-2012-0226
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., et al. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 6548–6553. doi: 10.1073/pnas.1302837110
- Pruesse, E., Peplies, J., and Glockner, F. O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28, 1823–1829. doi: 10.1093/bioinformatics/bts252
- Pyro, V. S., Roesch, L. F. W., Ortega, J. M., do Amaral, A. M., Tótola, M. R., Hirsch, P. R., et al. (2014). Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. *Microb. Ecol.* 67, 237–241. doi: 10.1007/s00248-013-0302-4
- R Development Core Team (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>
- Rajput, M. S., Naresh Kumar, G., and Rajkumar, S. (2013). Repression of oxalic acid-mediated mineral phosphate solubilization in rhizospheric isolates of *Klebsiella pneumoniae* by succinate. *Arch. Microbiol.* 195, 81–88. doi: 10.1007/s00203-012-0850-x
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., and Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak. J. Biol. Sci.* 7, 187–196. doi: 10.3923/pjbs.2004.187.196
- Richardson, A. E., and Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol.* 156, 989–996. doi: 10.1104/pp.111.175448
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., et al. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290. doi: 10.1038/ismej.2007.53
- Scheublin, T. R., Sanders, I. R., Keel, C., and Van der Meer, J. R. (2010). Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME J.* 4, 752–763. doi: 10.1038/ismej.2010.5
- Silva, U. C., Mendes, G. O., Silva, N. M. R., Duarte, J. L., Silva, I. R., Tótola, M. R., et al. (2014). Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. *PLoS ONE* 9:e110246. doi: 10.1371/journal.pone.0110246
- Smith, S. E., Jakobsen, I., Gronlund, M., and Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156, 1050–1057. doi: 10.1104/pp.111.174581
- Smith, S. E., Robson, A. D., and Abbott, L. K. (1992). The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. *Plant Soil* 146, 169–179. doi: 10.1007/BF00012010
- Stephen, J., Shabanamol, S., Rishad, K. S., and Jisha, M. S. (2015). Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions. *Biotech* 5, 831–837. doi: 10.1007/s13205-015-0286-5
- Taktek, S., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J. A., and Antoun, H. (2017). Igneous phosphate rock solubilization by biofilm-forming mycorrhizobacteria and hyphobacteria associated with *Rhizoglossum irregulare* DAOM 197198. *Mycorrhiza* 27, 13–22. doi: 10.1007/s00572-016-0726-z
- Taktek, S., Trépanier, M., Servin, P. M., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J. A., et al. (2015). Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biol. Biochem.* 90, 1–9. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.016
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., and Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE* 7:e40863. doi: 10.1371/journal.pone.0040863
- Toljander, J. F., Santos-González, J. C., Tehler, A., and Finlay, R. D. (2008). Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 323–338. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00512.x
- Trabelsi, D., Cherni, A., Zineb, A. B., Dhane, S. F., and Mhamdi, R. (2017). Fertilization of *Phaseolus vulgaris* with the Tunisian rock phosphate affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities. *Appl. Soil Ecol.* 114, 1–8. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.11.014
- Trouvelot, S., van Tuinen, D., Hijri, M., and Gianinazzi-Pearson, V. (1999). Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8, 203–206. doi: 10.1007/s005720050235
- United States Department of Agriculture (2017). Available at: <https://www.worldcornproduction.com/> [accessed June 12, 2017].
- Van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A., and Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.* 7, 879–887. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x
- Vasconcellos, C. A., Pitta, G. V. E., Franca, G. E., and de Alves, V. M. C. (2000). Fósforo para o milho? *Cultivar* 12, 8–9.
- Vega, N. W. O., Habte, M., and León Peláez, J. D. (2015). Effectiveness of a rock phosphate solubilizing fungus to increase soil solution phosphate impaired by the soil phosphate sorption capacity. *Rev. Fac. Nacl. Agron.* 68, 7627–7636. doi: 10.15446/rfnam.v68n2.50950
- Wahid, F., Sharif, M., Steinkellner, S., Khan, M. A., Marwat, K., and Khan, S. (2016). Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria in the presence of rock phosphate improves phosphorus uptake and growth of maize. *Pak. J. Bot.* 48, 739–747.
- Walpola, B. C., Arunakumara, K. K. I. U., and Yoon, M. H. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria (*Klebsiella oxytoca*) with enhanced tolerant to environmental stress. *Afr. J. Microbiol. Res.* 31, 2970–2978. doi: 10.5897/AJMR2013.5771
- Wang, F., Shi, N., Jiang, R., Zhang, F., and Feng, G. (2016). In situ stable isotope probing of phosphate-solubilizing bacteria in the hyphosphere. *J. Exp. Bot.* 67, 1689–1701. doi: 10.1093/jxb/erv561
- Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69, 99–151. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60948-7
- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., and Ye, B. (2017). Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS ONE* 12:e0178425. doi: 10.1371/journal.pone.0178425
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biol. Fertil. Soils* 47, 543–554. doi: 10.1007/s00374-011-0563-3

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Silva, Medeiros, Leite, Morais, Cuadros-Orellana, Oliveira, de Paula Lana, Gomes and Dos Santos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. ARTIGO 2: Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato e avaliação de seu potencial na promoção do crescimento de plantas

Ubiana C. Silva¹, Daliane R. Silva¹, Luiz F. Freitas-Júnior¹, Ana C. Fernandes¹, Laura R. Leite², Sara Cuadros-Orellana³, Christiane A. Oliveira⁴ e Vera L. Dos Santos^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ² Grupo de genômica e informática de biosistemas, Centro de pesquisa René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, Brasil, ³Centro de Biotecnologia dos Recursos Naturais, Faculdade de Ciências Agrárias e Florestais, Universidade Católica de Maule, Talca, Chile, ⁴Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brasil.

* corresponding author

Palavras-chave: Bactéria, fosfato, solubilização, milho, promoção do crescimento de plantas.

RESUMO

O uso de fertilizantes fosfatados na agricultura é importante devido ao alto requerimento deste nutriente pelas plantas. Contudo, grande parte do fósforo (P) adicionado na forma de fertilizantes solúveis no solo tropical é rapidamente adsorvido aos óxidos de ferro, alumínio e cálcio, o que pode levar a complexação de até 80 % do P aplicado no solo. Assim, o uso de fosfatos de rocha (FR) como fonte de P para a agricultura tem sido investigado, dado a liberação mais lenta do P, menor custo e menor impacto ao ambiente. Entretanto, a utilização de microrganismos solubilizadores de P para melhorar a disponibilização deste nutriente a partir dos FRs também tem sido avaliada. Muitas vezes, esses microrganismos, além da solubilização de P, exercem outras funções que podem auxiliar no crescimento vegetal. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi obter bactérias da rizosfera de milho cultivado em solo adicionado de FR e sem adição de P, e avaliar o potencial destas e de bactérias endofíticas, também isoladas de milho, quanto à solubilização de P em testes *in vitro*, promoção do crescimento de milho cultivado com FR e presença de genes relacionados a promoção do crescimento vegetal. Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae foram predominantes nas culturas obtidas do solo rizosférico do milho cultivado com e sem adição de FR, os principais gêneros foram *Klebsiella* e *Enterobacter*. Dentre as fontes de P avaliadas, o fosfato de Araxá foi mais solubilizado do que o fosfato de ferro e as bactérias endofíticas foram as mais eficientes no processo de solubilização de P do fosfato de Araxá em relação às rizosféricas. Além disso, sete das oito bactérias avaliadas quanto à capacidade de promoção do crescimento do milho contribuíram para a melhoria de no mínimo um dos parâmetros de crescimento desta planta, com destaque para as linhagens *Bacillus megaterium* UFMG50 e *Ochrobactrum* sp. CNPMS2088. Essas bactérias apresentaram genes relacionados ao metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e de fitohormônios. Assim, foi possível eleger na comunidade bacteriana investigada, linhagens candidatas a bioinoculantes para a agricultura, cuja capacidade de promoção do crescimento de plantas precisa ser validada em condições de campo.

1. INTRODUÇÃO

O P é considerado um macronutriente importante para o desenvolvimento das plantas, sendo necessário um fornecimento adequado deste nutriente para o melhor crescimento vegetal (Sultenfuss & Doyle, 1999). Além disso, o P desempenha papel essencial em praticamente todos os processos que envolvem transferência de energia, como a fotossíntese, podendo dessa forma favorecer a produtividade das culturas (Stauffer & Sulewski, 2004). Para o milho, o P é crucial desde os estágios iniciais do seu desenvolvimento (da germinação até os 35-40 dias), passando pelo florescimento e enchimento dos grãos, que são os estágios de maior exigência deste nutriente (Coelho & Alves, 2003). Contudo, o P adicionado na forma de fertilizantes solúveis no solo é rapidamente adsorvido devido à sua alta capacidade de formação de complexos de alta energia de ligação com óxidos de ferro (P-Fe), de alumínio (P-Al) e silicatos de alumínio, nos solos ácidos tropicais, e cálcio (P-Ca), nos solos alcalinos (Novais & Smyth, 1999). Esta complexação, em alguns casos, pode chegar a 80 % do P aplicado, principalmente nos solos mais argilosos, tornando o elemento indisponível às plantas (Novais & Smyth, 1999).

Sendo assim, a busca por tecnologias que aumentem a eficiência no uso de P tem sido incentivada. Neste contexto, o uso de fosfato de rocha (FR) pode ser uma alternativa viável, devido a seu efeito residual no solo que aumenta o conteúdo de P ao longo do tempo, custo baixo e menor impacto ao ambiente, por exemplo, por resultar em menor eutrofização de águas superficiais (Goedert & Lobato, 1980; Coutinho et al., 1991; Carpenter et al., 1998). No entanto, estes fosfatos apresentam baixa reatividade quando comparados aos fertilizantes solúveis. Para compensar tal característica, diversos autores tem avaliado a aplicação simultânea de microrganismos solubilizadores de P e FR no solo, como forma de aumentar a disponibilização desse nutriente a partir dessa fonte pouco solúvel de P (Vassilev et al., 2006; Panhwar et al., 2011; Manzoor et al., 2017).

Os microrganismos solubilizadores de P compreendem um grupo amplo, incluindo tanto bactérias quanto fungos (Panhwar et al., 2011; Mendes et al., 2015; Satyaprakash et al., 2017). O principal mecanismo associado à solubilização de P é a liberação de ácidos orgânicos durante o crescimento microbiano (Mendes et al., 2013). Os grupos hidroxila e carboxila dos ácidos orgânicos acidificam o meio, formam complexos e podem quelar cátions presentes na estrutura do FR, liberando o P em forma solúvel (Sagoe et al., 1998). Além disso, a produção de ácidos orgânicos confere vantagens competitivas ao microrganismo. Em meio com alto teor de Al e Fe, os ácidos orgânicos formam complexos organo-metálicos, que podem diminuir a toxicidade desses elementos (Jarosz-Wilkolazka & Gadd, 2003, Magnuson & Lasure, 2004). Também a liberação de íons H^+ durante a

assimilação de NH_4^+ ou através de outras reações metabólicas que desencadeiam a excreção de prótons, como a respiração, pode resultar na solubilização de P (Illmer & Schinner, 1995).

Todavia, a solubilização microbiana de P é um dos processos desempenhados por microrganismos capazes de auxiliar no crescimento vegetal. Estas linhagens, geralmente, apresentam outras características, como mecanismos diversos de aquisição de outros nutrientes como nitrogênio (N) e ferro (Fe), produção de fitohormônios e compostos orgânicos voláteis (COVs) e, de forma mais indireta, auxiliam o desenvolvimento das plantas pelo controle de fitopatógenos e indução de resistência das plantas (Silva et al., 2016). Pesquisas com bactérias promotoras do crescimento das plantas (BPCPs) têm sido estimuladas visando o seu uso como bioinoculantes para a agricultura (Souza et al., 2015). Na produção de um bioinoculante, é desejável que as bactérias além de apresentarem mecanismos que resultem no aumento do crescimento vegetal, sejam boas competidoras e bem adaptadas ao ambiente rizosférico e / ou endofítico. Alguns inoculantes com bactérias solubilizadoras de P já tem sido lançados como produtos comerciais. Por exemplo, produto contendo *Bacillus megaterium* e *Azotobacter chroococcum*, que aumentam o fornecimento de N e P às plantas e outro produto composto por consórcio de bactérias do ácido lático, sendo este ácido o agente para solubilização de P (Rodríguez & Fraga, 1999). No caso do milho, alguns trabalhos já verificaram a eficácia da inoculação de microrganismos promotores de crescimento (Fallik et al., 1994; Palus et al., 1996; Estrada et al., 2002; Monje, 2011). *Azospirillum brasilienses* inoculado nas sementes do milho contribuiu para o aumento da área superficial das raízes, o que resultou no aumento do volume de solo explorado e, conseqüentemente, maior desenvolvimento vegetal (Fallik et al., 1994). Efeitos positivos da inoculação de outras bactérias relacionadas com fixação de nitrogênio em milho também já foram reportados, incluindo linhagens de *Klebsiella pneumoniae* (Palus et al., 1996), *Burkholderia* spp. (Estrada et al., 2002) e *Herbaspirillum* (Monje, 2011).

A seleção dessas bactérias candidatas a produção de bioinoculantes para as plantas tem sido realizada por meio de testes *in vitro* em condições laboratoriais para os mais diversos fenótipos de promoção do crescimento de plantas (Pontes et al., 2015; Husen, 2016; Rodrigues et al., 2016). Contudo a reprodutibilidade dos resultados nos testes de laboratório nos sistemas solo-planta ainda é uma dificuldade a ser superada, visto que a eficiência da inoculação varia de acordo com o tipo de solo, cultivar e fatores ambientais (Smith et al., 1962).

Dessa forma, o isolamento e reintrodução de bactérias em um mesmo ambiente pode ser uma forma de aumentar o sucesso da promoção do crescimento vegetal. Além disso, a investigação dessas bactérias em nível genômico contribui para a rápida definição de um potencial perfil de promoção do crescimento vegetal bem como uma maior compreensão das vias envolvidas. Assim, os objetivos deste estudo foram: 1) a obtenção de isolados bacterianos a partir da rizosfera de milho em solo cultivado com FR e sem adição de P, 2) a avaliação do seu potencial, juntamente ao de bactérias endofíticas isoladas de milho, quanto à solubilização de P em testes *in vitro*, e 3) a avaliação de sua capacidade de estimular o crescimento de milheto cultivado com FR em ensaios em casa de vegetação. A presença de genes relacionados à promoção do crescimento vegetal nestas linhagens também foi investigada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem das bactérias e condições de cultivo

No estudo, foram utilizadas 101 bactérias, sendo 32 isoladas da rizosfera de milho pela técnica de enriquecimento com fosfato de Araxá, 2 também isoladas da rizosfera do milho, pertencentes à coleção da Embrapa Milho e Sorgo, 57 endofíticas previamente isoladas de milho e pertencentes a coleção do laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG e 10 endofíticas também isoladas de milho e cedidas, gentilmente, pela Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo.

Os isolados endofíticos avaliados neste estudo foram selecionados considerando o potencial para a solubilização de P, previamente caracterizados em estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (Vieira et al., 2015; Abreu et al., 2017). A maioria dos isolados pertence ao gênero *Bacillus* (15%), seguido de *Pantoea* (13,5 %), *Serratia* (12 %), *Enterobacter* (12 %), *Klebsiella* (9%) e *Acinetobacter* (6 %). Os demais gêneros representados correspondem, individualmente, a menos de 5 % do total.

Para o isolamento das bactérias potencialmente solubilizadoras de P utilizando a técnica de enriquecimento, amostras de solo rizosférico de milho cultivado sem adição de P (1) e de rizosfera de milho cultivado com adição de fosfato de Araxá (2) foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio NBRIP (*National Botanical Research Institute*) (Nautiyal 1999) acrescido de fosfato de Araxá (5 g L^{-1}). Os frascos foram incubados a 28°C , sob agitação de 180 rpm por 48 h. Após esse período, 10 mL das culturas foram transferidas para um novo meio NBRIP acrescido de fosfato de Araxá (5 g L^{-1}) e submetidos a mais um período de incubação de 48 h nas mesmas condições descritas acima. Esse procedimento foi realizado mais uma vez e após essas três passagens, a cultura foi diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e alíquotas de 100 μL das diluições 10^{-1} a 10^{-7} foram inoculadas por espalhamento em superfície em meio NBRIP + Fosfato

tricálcio (meio seletivo/indicador de bactéria solubilizadora de P). Em seguida, as bactérias com resultado positivo para o halo de solubilização foram armazenadas a -80 ° C em caldo Triptona de Soja (TSB, Himedia, Mumbai, Índia) com 15% (v/v) de glicerol.

2.2. Identificação molecular das bactérias isoladas de amostras da rizosfera de milho pela técnica de enriquecimento

2.2.1. Extração do DNA bacteriano

O DNA genômico das bactérias isoladas a partir do cultivo de enriquecimento foi extraído utilizando protocolo definido por (Pitcher, 1989), com modificações. As células bacterianas foram reativadas por estriamento no meio Agar Triptona de Soja (TSA, Himedia, Mumbai, Índia) e placas incubadas durante 24 h a 27° C. Em seguida, as colônias individuais foram cultivadas em meio líquido TSB por 24 h a 37° C. Após este período, foram transferidas para microtubos de 2 mL, centrifugadas e lavadas com 1ml de solução salina (NaCl a 0,85%). O pellet foi ressuscitado em 250 µL de tampão TE (Tris-EDTA – Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7,5), adicionado de esferas de vidro e agitado no vortex por 2 min. Foram adicionados 400 µL do tampão de extração contendo solução de tiocianato de guanidina 5,0 mol/L, EDTA 100 mmol/L (pH 8,0) e sarcosil 0,5%. Os microtubos foram homogeneizados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 10 min. Após adição de 200 µl de acetato de amônio 7,5 mol/L gelado, os tubos foram agitados por inversão e incubados no gelo por 10 minutos. Após esse período, 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) foram acrescentados e os tubos agitados, novamente, por inversão. Após centrifugação a 12.000 $\times g$ por 10 min, a fase aquosa foi transferida para novos microtubos, nos quais o mesmo volume de isopropanol gelado foi acrescentado. Em seguida, os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente por 1 hora e centrifugados a 4.000 $\times g$ por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70 % (v/v). Em seguida, centrifugou-se as amostras para precipitação do DNA. Os tubos foram mantidos abertos a temperatura ambiente até evaporar todo o etanol. Ao final, o DNA foi diluído em 50 µL de água deionizada estéril e estocado a -20°C. O produto foi quantificado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

2.2.2. Amplificação e sequenciamento de regiões do gene rRNA 16 S

Amostras de DNA extraídos das bactérias foram utilizadas em PCRs para a amplificação das regiões V1-V5 do gene rRNA 16S utilizando os iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Goodfellow & Stackebrandt, 1991) ou as regiões V1-V4 utilizando os iniciadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Machtelinckx et al., 2012). As condições da reação de PCR foram as seguintes: tampão 1 X (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4, 50 mmol/L KCl); 1,5 mmol/L de MgCl₂;

200 $\mu\text{mol/L}$ de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de cada iniciador; 1,5 U de Taq DNA polimerase da Sinapse Biotecnologia; 50 ng do DNA molde em volume final de 25 μL .

A reação foi realizada utilizando termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min para os iniciadores 8F-907R e 52°C por 1 min para os iniciadores 27F-806R, seguidos de extensão a 72°C por 1 min e 30 segundos; com uma extensão final de 72°C por 10min. Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para avaliação de integridade e tamanho do produto amplificado e dosados em espectrofotômetro do tipo NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

Em seguida, os produtos da PCR foram purificados utilizando 11,25 μL de EDTA (125 mmol/L) e 135 μL de etanol absoluto (Merck) incubados por 15 min a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 4000 $\times g$ por 60 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuscitado em 120 μL de etanol 70% (v/v) e centrifugados a 4000 $\times g$ por 25 min. O sobrenadante foi novamente descartado. Após evaporação do etanol, o DNA purificado foi ressuscitado em 20 μL de água deionizada estéril, e novamente quantificado no NanoDrop ND 1000. Para o sequenciamento foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®), seguindo recomendações do fabricante para o sequenciador automático ABI 3700.

As sequências foram trimadas quanto à qualidade usando os softwares Bioedit Versão 7.2.5 (Hall 1999) e Asparagim (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Após a retirada de regiões de baixa qualidade (Score Phred < 20), as sequências foram comparadas com os bancos de dados, Genbank, Silva, RDP (Ribosomal Database Project) e Greengenes.

2.3. Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de Araxá e fosfato de ferro *in vitro*

As bactérias foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio NBRIP líquido suplementado com fosfato Araxá (5 g L^{-1}) ou fosfato de ferro (1 g L^{-1}). Os frascos foram inoculados com 1 mL de suspensão de bactéria ajustada para densidade ótica (600 nm) igual a 1 e incubados a 28 °C, 180 rpm durante três dias. Após o período de incubação, alíquotas foram removidas para avaliação da concentração de P solubilizado pelo método colorimétrico de azul de molibdênio a 880 nm (Murphy & Riley, 1962) e do pH final do meio de cultura. A concentração final de P foi estimada com base na comparação com a curva-padrão feita com KH_2PO_4 nas concentrações de 0 a 6 mg L^{-1} .

2.4. Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de Araxá por células sésseis

Neste ensaio, foram utilizadas as bactérias que obtiveram as maiores atividades nos testes de solubilização de fosfato de Araxá e ferro (35 bactérias endofíticas e 21 bactérias rizosféricas). Para o

preparo do inóculo, os isolados bacterianos foram ativados em placas contendo meio TSA (Ágar Triptona de soja) a 28 °C por 24 horas e ressuspensos em meio NBRIP sem adição de fosfato a uma concentração celular correspondente a 0,44 unidade de densidade ótica a 600 nm. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de poliestireno contendo 100 µL do inóculo bacteriano e 100 µL do meio NBRIP com fosfato de Araxá (10 g L⁻¹), o qual foi pipetado sob agitação constante para não precipitar o fosfato. As placas foram incubadas a 28°C por 3 dias. Após o período de incubação, o sobrenadante foi transferido para nova placa para a dosagem do fósforo solúvel e a parte precipitada no fundo da placa (fosfato de Araxá + células bacterianas aderidas) foi utilizada para dosar as células viáveis indicativas da formação do biofilme baseado no protocolo definido por Nakajima et al. (2007).

Para a dosagem do fósforo solúvel, alíquotas do sobrenadante da cultura foram centrifugadas a 1000 x g por 5 min. 180 µL do sobrenadante foram transferidas para nova placa e adicionadas de 40 µL da mistura de reagentes para dosar o P pelo método de azul de molibdênio (Murphy & Riley, 1962) e após 20 min de incubação o P solúvel foi quantificado por colorimetria a 880 nm.

2.5. Avaliação do potencial de crescimento de milho adubado com fosfato de rocha por bactérias pré-selecionadas nos ensaios *in vitro*

Para os ensaios de casa de vegetação foram avaliadas oito bactérias pré-selecionadas a partir dos testes *in vitro*. Essas, foram cultivadas em caldo TSB durante 24 horas, em seguida foram centrifugadas, o sedimento ressuspensionado em salina 0,8 %. As suspensões foram ajustadas para a densidade ótica de 1,0, absorvância de 550 nm, correspondendo a 10⁸ cells mL⁻¹.

O milho (*Pennisetum glaucum*), variedade BRS 1501, foi utilizado como planta modelo. Para tanto, vasos contendo 4 Kg de Latossolo vermelho distrófico típico, pH 5,2, contendo 0,4 cmolc dm⁻³ Al, 2,5 cmolc dm⁻³ Ca, 0,2 cmolc dm⁻³ Mg e 30 mg dm⁻³ K, 2,2 mg dm⁻³ P, capacidade de troca catiônica de 11,8 cmolc dm⁻³, saturação por bases de 23,2% e teor de argila de 74 dag kg⁻¹.

Aproximadamente 15 dias antes do plantio, foi feita a calagem do solo para correção da acidez e foi adicionada solução nutritiva contendo macronutrientes e micronutrientes: Para 1 L, 22,8 g de NH₄NO₃, 9,9 g de (NH₄)₂SO₄, 30,58 g de KCl, 0,23 g de H₃BO₃, 0,63 g de CuSO₄. 5H₂O, 0,74 g de MnSO₄ . H₂O, 0,67 g de ZnCl₂, 0,4 g de (NH₄)₆ Mo₇O₂₄.4H₂O . As fontes de P avaliadas foram: 1) Superfosfato triplo e 2) Fosfato de rocha de Marrocos, ambos na concentração de 300 mg P dm⁻³ de solo e um tratamento controle sem adição de P. Em seguida, as sementes foram preparadas com o veículo contendo fécula de mandioca e carvão vegetal, sendo adicionados a 500 g de semente de milho, 500 mL de fécula de mandioca (10 %) e 12,5 g de carvão vegetal. Em torno de 20 sementes foram depositadas ao solo e em seguida adicionou-se 10 mL/vaso da suspensão bacteriana ajustada para 1 O.D. de células.

Durante o cultivo, as plantas foram irrigadas com água destilada diariamente. Após período de 45 dias à partir do plantio, no início do florescimento, as plantas foram coletadas. Para estimar o crescimento das plantas em função das fontes de P, foram avaliadas biomassa seca tanto da parte aérea como das raízes, altura média das plantas por vaso, a área foliar média das plantas por vaso, atividade fotossintética no dia da coleta, conteúdo de P no solo e acúmulo de P na planta.

2.6. Análise taxonômica e predição dos genes relacionados ao metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e fitohormônios.

O DNA genômico das oito bactérias pré – selecionadas pelos testes *in vitro* foi extraído utilizando o kit Promega Genomic DNA Purification (Madison, USA), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida foi sequenciado na plataforma Illumina MiSeq utilizando o método paired-end com o kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina, San Diego, CA, USA). As sequências obtidas foram analisadas quanto a qualidade e montadas usando o protocolo A5 (Coil et al., 2014). A anotação foi feita com Prokaryotic Genome Annotation System (PROKKA) (Seemann, 2014) e uma implementação modular e extensível do algoritmo RAST (RAST-TK) na plataforma PATRIC (Aziz et al., 2008, Brettin et al., 2015). Em seguida, através de uma busca textual, foi investigada em cada genoma a relação de sequências codificadoras (CDS) pertencentes às vias de metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e fitohormônios.

Para a análise taxonômica foi feita atribuição de taxonomia para genes marcadores filogenéticos moleculares: genes do rRNA 16 S e 23 S, girase B (*gyrB*) e da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) utilizando o alinhamento múltiplo do Blast contra o banco de dados do Genbank e através da análise do perfil de proteínas das culturas bacterianas via espectrometria de massa de tempo de voo de desorção / ionização assistida por matriz (MALDI-TOF). Uma pequena porção de células bacterianas cultivadas em meio TSA foi transferida para poços da placa e aço inoxidável do MALDI por esfregaço (Bruker, Alemanha). Posteriormente, as amostras bacterianas foram cobertas com 1 μ L de ácido fórmico (P.A). Após secar à temperatura ambiente, cobriu-se o esfregaço com 1 μ L da matriz HCCA (ácido a-ciano-4-hidroxicinâmico, Sigma-Aldrich, Poland). Depois que a matriz foi seca a temperatura ambiente, a placa foi inserida no espectrômetro para medição automatizada e interpretação de dados. Os espectros de massa foram processados com o pacote de software Bruker Daltonik MALDI Biotype (Bruker, Alemanha). Os resultados foram obtidos a partir das 20 melhores correspondências de identificação, juntamente com valores de confiança que variam de 0,00 a 3,00. De acordo com os critérios recomendados pelo fabricante, valores abaixo de 1,70 não permitem uma identificação confiável; valores entre 1,70 e 1,99 permitem a identificação ao nível do gênero; entre 2,00 e 2,29 significa identificação altamente provável no nível do gênero e identificação provável ao nível da espécie; e um valor superior a 2,30 (2,30-3,00) indica identificação altamente provável ao nível da espécie.

2.7. Análises estatísticas

Os experimentos de solubilização de P e os ensaios de casa de vegetação foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. As médias dos resultados dos testes de solubilização de fosfato de Araxá e ferro por células planctônicas e solubilização de fosfato de Araxá por células sésseis foram agrupadas pelo método de K-médias usando Past (Hammer et al., 2001). Em seguida, os resultados de solubilização de P, bem como dos parâmetros de avaliação do crescimento vegetal foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias Scott Knott a 5 % de probabilidade usando o programa Sisvar (Ferreira, 2011). Foram feitas também análises de correlação linear para as variáveis P solubilizado e pH final do meio utilizando o programa R (R Development Core Team, 2008).

RESULTADOS

3.1. Distribuição taxonômica das bactérias associadas à rizosfera de milho obtidas a partir do enriquecimento com fosfato de Araxá e endofíticos obtidos das coleções do laboratório de Microbiologia aplicada da UFMG e Embrapa

No total, 32 isolados bacterianos foram obtidos das culturas de enriquecimento usando como inóculo solo rizosférico de milho cultivado sem adição de P (16 isolados) ou solo adicionado de fosfato de Araxá (16 isolados) (Tabela 1). Todos esses isolados apresentaram halos de solubilização após crescimento no meio seletivo/indicador de bactéria solubilizadora de P. Os isolados identificados por meio do sequenciamento de regiões de aproximadamente 600 pb do gene rRNA 16S foram classificados em 3 filos diferentes, Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria (Tabela 1a). No enriquecimento feito com o fosfato de Araxá a partir do solo adicionado deste fosfato foram obtidos isolados pertencentes ao filo Firmicutes (1) e à classe Gamaproteobacteria (15), enquanto naquele sem P, foram observados representantes das classes Betaproteobacteria (1) e Gamaproteobacteria (15).

Tabela 1: Classificação baseada no sequenciamento do gene 16 S do rRNA das bactérias obtidas neste trabalho a partir das culturas de enriquecimento de amostras de solo rizosférico do milho, e aquelas pertencentes às coleções do Laboratório de Microbiologia Aplicada (UFMG) e da Embrapa Milho e Sorgo.

A. Origem	Filo	Gênero	Número de isolados
Culturas de enriquecimento com fosfato de Araxá	Firmicutes	<i>Lysinibacillus</i>	1
		<i>Bacillus</i>	2
Araxá	Proteobacteria (Gamaproteobacteria)	<i>Klebsiella</i>	9
		<i>Pantoea</i>	3
		<i>Enterobacter</i>	1

Culturas de enriquecimento sem P	Proteobacteria (Gamaproteobacteria)	<i>Enterobacter</i>	7
		<i>Klebsiella</i>	5
		<i>Erwinia</i>	1
		<i>Pantoea</i>	1
	Proteobacteria (Betaproteobacteria)	<i>Burkholderia</i>	1
	Actinobacteria	<i>Curtobacterium</i>	1
TOTAL			32

B. Origem	Filo	Gênero	Número de cepas	
Endofíticas: Coleção LMA/ UFMG	Proteobacteria (Gamaproteobacteria)	<i>Serratia</i>	7	
		<i>Pantoea</i>	7	
		<i>Enterobacter</i>	7	
		<i>Klebsiella</i>	6	
		<i>Acinetobacter</i>	4	
		<i>Pseudomonas</i>	2	
		<i>Curtobacterium</i>	2	
		<i>Obesumbacterium</i>	1	
		<i>Raoultella</i>	1	
		<i>Rhizobium</i>	1	
		Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i>	2
		Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	3
			<i>Lactococcus</i>	2
			<i>Bacillus</i>	5
<i>Brevibacillus</i>	1			
Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>	3		
	<i>Arthrobacter</i>	3		
Endofíticas: Coleção EMBRAPA Milho e Sorgo	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	5	
	Proteobacteria (Gamaproteobacteria)	<i>Pantoea</i>	2	
		<i>Enterobacter</i>	1	
		<i>Serratia</i>	1	
Proteobacteria (Alphaproteobacteria)	<i>Ochrobactrum</i>	1		
Rizoféricas: Coleção EMBRAPA Milho e Sorgo	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	2	
TOTAL			69	

3.2. Solubilização de fosfato de Araxá e fosfato de ferro por células planctônicas e sésseis

O potencial de solubilização dos fosfatos de Araxá e Ferro por células planctônicas, *in vitro*, foi avaliado para um grupo de 101 bactérias, endofíticas e rizosféricas (Figura 1). Valores mais elevados de P solúvel a partir do fosfato de Araxá foram observados nos ensaios com as bactérias endofíticas ($p < 0,05$), que variaram de 0 a 269,2 mg L⁻¹, quando comparado aos das rizosféricas, que variaram de 0 a 76,1 mg L⁻¹ (Figura 1a). Entretanto, não foi observada diferença significativa para a solubilização deste fosfato em relação ao tipo de solo utilizado no enriquecimento e isolamento das bactérias rizosféricas.

O P solúvel foi usado para agrupar os isolados em 3 grupos de acordo com seus níveis de solubilização dos fosfatos pelo método de K-médias, em seguida foi feita a distribuição dos gêneros em cada grupo (Figura 1; Quadros S2). Para o cultivo sob agitação com fosfato de Araxá (Figura 1a), as bactérias endofíticas foram agrupadas em: Grupo 1, solubilização média de 189 mg L⁻¹; Grupo 2, solubilização média de 83,5 mg L⁻¹; e Grupo 3, solubilização média de 13 mg L⁻¹, e as bactérias da rizosfera foram agrupadas em: Grupo 1, solubilização média de 56,7 mg L⁻¹; Grupo 2, solubilização média de 28,9 mg L⁻¹; Grupo 3, solubilização média de 6,5 mg L⁻¹.

O maior valor de P solúvel a partir do fosfato de Araxá, 269,2 mg L⁻¹, foi detectado no ensaio com a bactéria endofítica *Serratia marcescens* UFMG85 ($p < 0,05$) no período avaliado de 72 horas. Além disso, os meios de cultivo dos tratamentos inoculados com as bactérias endofíticas e rizosféricas, dos grupos de maiores valores de P solubilizado a partir do fosfato de Araxá, apresentaram os menores valores de pH final (Figura 2). Essas duas variáveis apresentaram correlação negativa ($r: -0,47$, $p = 6.2 \times 10^{-7}$).

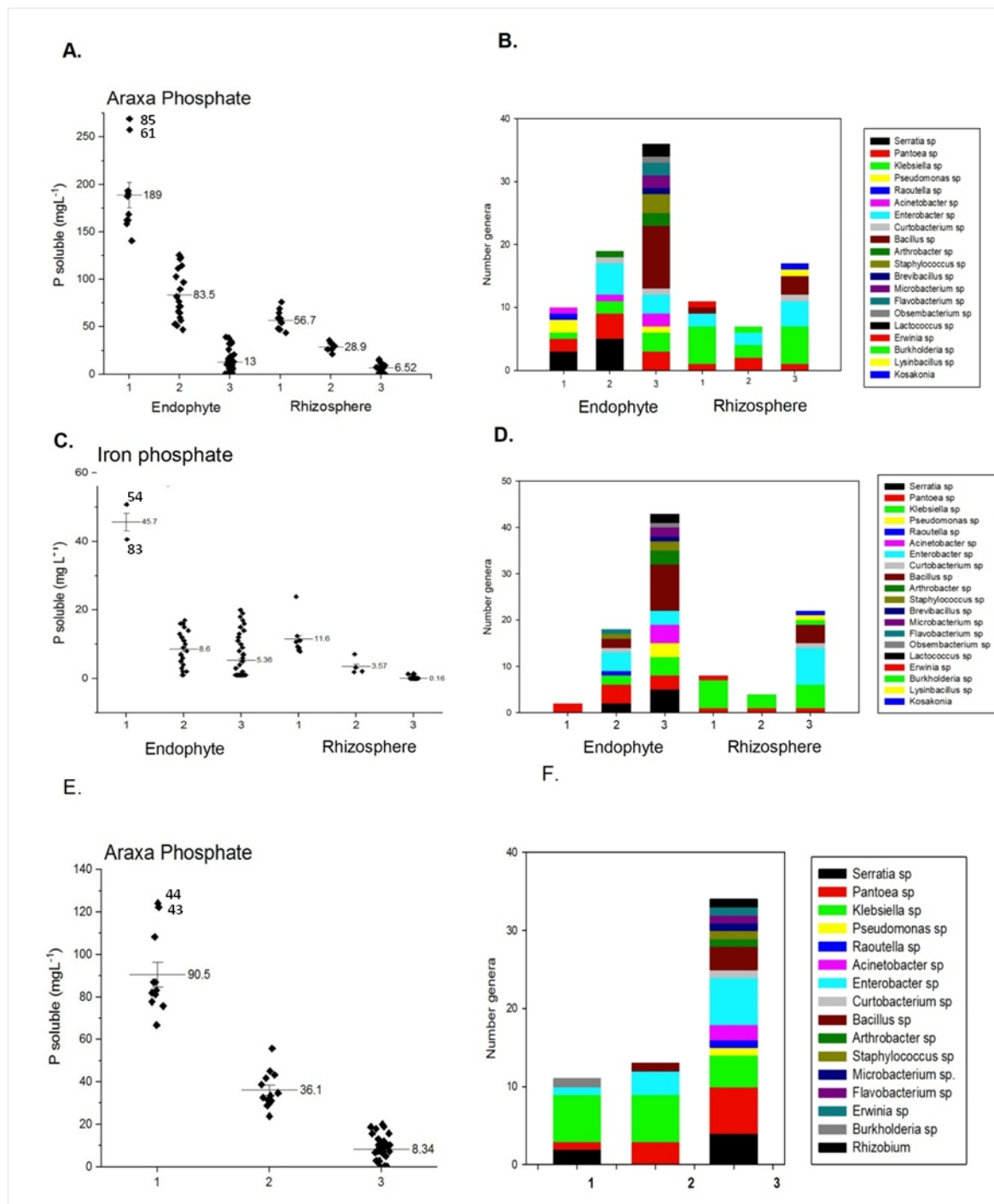


Figura 1: P solubilizado a partir do fosfato de Araxá sob agitação (A), do fosfato de ferro (C), do fosfato de Araxá - células sésseis (E) por bactérias endofíticas e rizosféricas. A capacidade de solubilização foi agrupada: 1: maiores valores de P solúvel; 2: valores intermediários, 3: menores valores de P solúvel. As médias de solubilização estão inseridas para cada grupo. Distribuição dos gêneros bacterianos endofíticos e rizosféricos em cada grupo para fosfato de Araxá sob agitação (B), fosfato de ferro (D) e fosfato de Araxá – células sésseis (F). Os melhores solubilizadores de P Araxá foram 85: *Serratia marcescens*, 61: *Microbacterium* sp.; P Fe 54: *Pantoea* sp. e 83: *Pantoea* sp. e P Araxá – células sésseis 44 e 43 *Serratia marcescens*. Para a identificação dos isolados mais eficientes na solubilização de cada fosfato ver os quadros S1, S2 e S3.

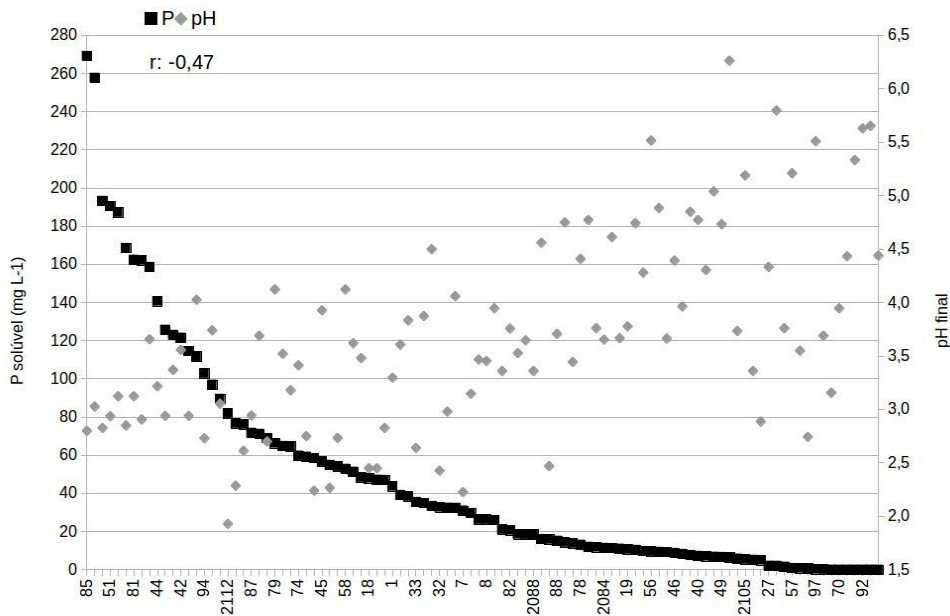


Figura 2: Valores de P solúvel e pH final dos ensaios de solubilização do fosfato de Araxá em condições de agitação para as 100 bactérias, endofíticas e rizosféricas. Análise de correlação entre P solubilizado e o pH ($r: -0,47$, $p= 6,2 \text{ e-}07$).

De acordo com os resultados da solubilização do fosfato de ferro (Figura 1 c), pode-se observar que os valores de P liberado no meio são menores que os observados nos ensaios com fosfato de Araxá. Para as bactérias rizosféricas, foi observado efeito do tipo de solo usado no enriquecimento no potencial de solubilização do P ligado ao ferro, sendo que os isolados obtidos a partir do solo adicionado de fosfato de Araxá foram mais eficientes ($p < 0,05$) em relação aos obtidos do solo sem adição de P. As bactérias endofíticas apresentaram no grupo 1 uma média de $45,7 \text{ mg L}^{-1}$ de P, no grupo 2 apresentaram uma média de P liberado de $11,34 \text{ mg L}^{-1}$ e no grupo 3 uma média de solubilização de $1,14 \text{ mg L}^{-1}$ de P. Já as bactérias rizosféricas do grupo 1 liberaram $11,57 \text{ mg L}^{-1}$ de P à partir do fosfato de ferro, o grupo 2 uma média de $3,57 \text{ mg L}^{-1}$ de P e o grupo 3 liberou uma média de $0,16 \text{ mg L}^{-1}$ de P. A distribuição dos gêneros bacterianos em cada um desses grupos é sumarizada no quadro S2. As bactérias endofíticas *Pantoea ananatis* (UFMG54) e *Pantoea* sp. (UFMG83) foram as que apresentaram maiores valores de P ($p < 0,05$) liberado a partir da solubilização de fosfato de ferro, com liberação de 51 mg L^{-1} e 41 mg L^{-1} de P solúvel no meio, respectivamente. Contudo, os valores de pH do meio apresentaram correlação muito baixa com o P solúvel liberado no meio, embora houve significância ($r: -0,25$, $0,04$).

Em relação aos ensaios de solubilização do fosfato de Araxá pelas células sésseis das 56 bactérias (Figura 1e,f, quadro S3) que se destacaram nos testes com as células planctônicas (sob

agitação), observou-se que o grupo 1 com maior níveis de solubilização atingiu uma média de 90,5 mg L⁻¹ de P liberado no meio, sendo composto por 11 isolados.

O grupo bacteriano que apresentou perfil intermediário (grupo 2), liberou uma média de 36,1 mg L⁻¹ de P enquanto o e o grupo 3 com menor potencial de solubilização apresentou, em média, 8,3 mg L⁻¹ de P. As bactérias endofíticas *S. marcescens* UFMG44 e *S. marcescens* UFMG43 (Figura 1e) apresentaram os maiores valores de P solubilizado ($p < 0,05$), com liberação de 124 e 122 mg L⁻¹ de P, respectivamente.

3.4. Avaliação do potencial do crescimento de milho por bactérias solubilizadoras de P selecionadas nos ensaios *in vitro*

Para avaliar a capacidade de estimular o crescimento do milho em solo adubado com fosfato de rocha e superfosfato triplo foram selecionadas oito das 100 bactérias testadas quanto à solubilização de P *in vitro*. A escolha foi feita de forma a ter representantes dos diferentes gêneros e dos diferentes grupos formados de acordo com os valores de solubilização de P. *S. marcescens* UFMG85, *Microbacterium* sp. UFMG61, *K. pneumoniae* UFMG51, *Pseudomonas* sp. UFMG81 foram escolhidas devido a maior capacidade de liberação de P nos tratamentos com fosfato de Araxá, *Pantoea* sp. UFMG54 por apresentar elevada capacidade de solubilização tanto do fosfato de Araxá quanto do fosfato de ferro e *S. marcescens* CNPMS2112, por apresentar valores intermediários de solubilização tanto de fosfato de Araxá quanto de fosfato de ferro. Já *B. megaterium* UFMG50, e *Ochrobactrum* sp. CNPMS2088 foram escolhidas para aumentar a diversidade de gêneros avaliados e/ou por resultarem em aumento do crescimento de milho em ensaios de inoculação em campo (dados ainda não publicados).

De acordo com os parâmetros de crescimento do milho avaliados (Figura 3), as plantas adicionadas de fosfato de rocha e inoculadas com as bactérias *Ochrobactrum* sp. CNPMS2088 apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) da altura das plantas (6,7 %) e aumento significativo ($P < 0,05$) do conteúdo de P no solo. As plantas inoculadas com *B. megaterium* UFMG50 também apresentaram aumento da altura das plantas (9,9 %), além do conteúdo de P no solo e na biomassa da planta nos tratamentos adicionados do FR.. Em seguida, ambas as bactérias *Pseudomonas putida* UFMG81 e *Klebsiella pneumoniae* UFMG51 contribuíram para o aumento significativo da biomassa radicular no tratamento adicionado de ST, além do aumento do P no solo e do P na biomassa planta nos tratamentos com FR, respectivamente. A bactéria *Pantoea anantis* UFMG54 também contribuiu para o aumento do P no solo e na biomassa da planta nos tratamentos com FR, Já as bactérias *S. marcescens* CNPMS2112 e *S. marcescens* UFMG85 se destacaram no aumentando, significativo ($P < 0,05$) da biomassa de raiz no tratamento adicionado de ST

3.5. Análise taxonômica e predição dos genes relacionados ao metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e fitohormônios.

As sequências dos genes do rRNA, 16S e 23S, da girase B (*gyrB*) e da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) foram investigadas com intuito de resolver a identificação taxonômica das bactérias avaliadas nos experimentos de promoção do crescimento de milho, em conjunto com a análise do perfil de proteínas ribossômicas utilizando a espectrometria de massa por MALDI-TOF (Tabela 2). Com a análise dos genes do rRNA, 16S e 23S, foi possível atingir a classificação taxonômica ao nível de gênero. Já a análise dos genes girase B (*gyrB*) e da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) permitiu a resolução ao nível de espécie para as bactérias UFMG50, identificada como *Bacillus megaterium*, UFMG85 e CNPMS2112, ambas identificadas como *Serratia marcescens*. Essas identificações no nível de espécie foram confirmadas pela análise por espectrometria de massas. Para as bactérias UFMG51 e CNPMS2084b, a determinação da espécie foi conseguida apenas pela análise do perfil protéico e para as demais, UFMG61, UFMG81 e CNPMS2088, nenhum dos métodos usados propiciou a resolução ao nível de espécie, sendo identificadas ao nível de gênero.

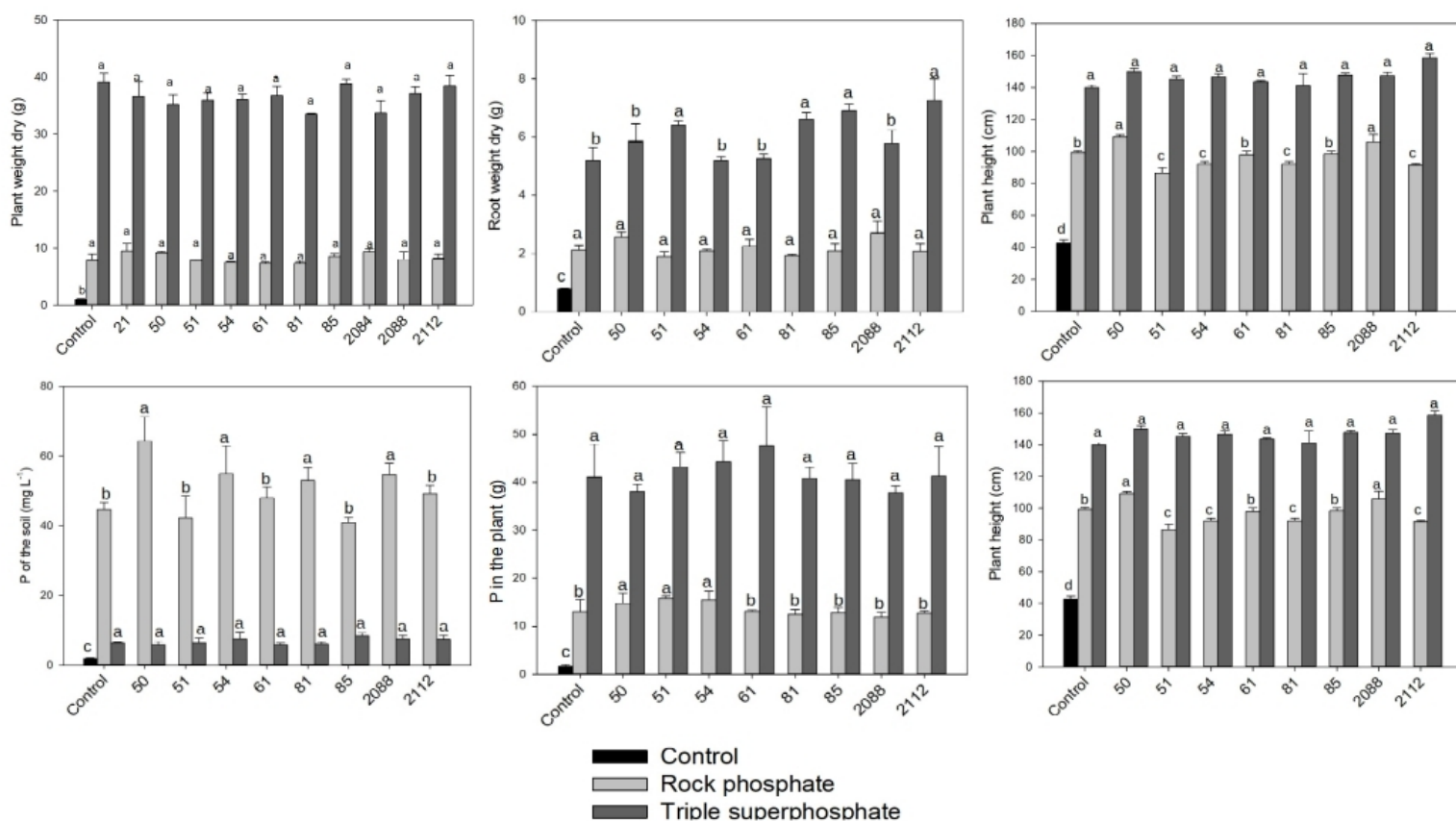


Figura 3.: Parâmetros de avaliação do crescimento vegetal: Biomassa seca da parte aérea e das raízes; Altura das plantas; Conteúdo de P no solo e na planta; Área foliar dos ensaios inoculados com as bactérias: UFMG50, UFMG51, UFMG54, UFMG61, UFMG81, UFMG85, CNPMS2088 e UFMG2112 utilizando as fontes de P fosfato de rocha ou superfosfato triplo. Todos estes parâmetros foram medidos após o período de aproximadamente 45 dias de cultivo. As médias com a mesma letra dentro de cada fonte de P não apresentaram diferença significativa pela análise de variância seguida do teste Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Visando uma maior caracterização dos possíveis mecanismos de promoção do crescimento de plantas (PCP) pelas 8 bactérias, a presença de genes relacionados aos principais mecanismos diretos de PCP foi investigada nos seus genomas (Tabela 3). Com relação ao metabolismo de P, todas as bactérias apresentaram sistemas de aquisição de P (Pst) de alta e baixa afinidade, exceto para o isolado CNMPS2088 que não possui o transportador de baixa afinidade por P. Todas as bactérias também apresentaram CDS relacionadas a mineralização e utilização de P orgânico, sendo que apenas a UFMG85 possui todas as CDS buscadas para estas duas funções. Com relação a produção de ácidos orgânicos, foram encontradas CDS relacionadas ao metabolismo dos ácidos glucônico, cetoglucônico, láctico e cítrico. Todas bactérias apresentaram CDS relacionadas a produção do ácido glucônico, com destaque para as bactérias UFMG51, UFMG54, UFMG85 e CNPMS2112 que apresentaram no mínimo um locus de todas as CDS buscadas nos genomas das oito bactérias para a produção desse ácido. Para a produção do ácido cetoglucônico, no genoma da bactéria UFMG61 não foi possível detectar CDS relacionadas à produção desse ácido. As bactérias CNPMS2112 e UFMG85 apresentaram o maior número de CDS relacionadas ao ácido cetoglucônico. Para o ácido láctico, também não foi possível detectar CDS no genoma da bactéria UFMG61 e a UFMG51 é a que possui maior número de CDS relacionados à produção desse ácido. Todas as bactérias apresentam várias CDS relacionadas à síntese do ácido cítrico e somente nos genomas das bactérias UFMG50, UFMG54 UFMG61, UFMG85 e CNPMS2088 foi possível detectar a enzima oxalato descarboxilase (OxdD). Com relação à produção de fitohormônios, todas as bactérias avaliadas apresentaram no mínimo duas CDS relacionadas às vias de produção do ácido indol acético (AIA) e citocininas. Contudo, os genomas de *S. marcescens* UFMG85 e CNPMS2112 foram os mais completos para as vias de produção de AIA.

Tabela 2: Taxonomia das oito bactérias pré-selecionadas nos testes *in vitro* utilizando o alinhamento dos marcadores filogenéticos moleculares: genes do rRNA, 16 S e 23 S, girase B (*gyrB*) e da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) com o banco de dados do Genbank e análise do perfil proteico utilizando Espectrometria de massa de tempo de vôo de desorção / ionização assistida por matriz (maldi tof).

Bact	Gene	Identity %			Maldi Tof	Score
B50	16S	Bacillus aryabhatai – 100%	Bacillus megaterium – 99%	Bacillus flexus -99%		
B50	23S	Bacillus megaterium – 100%	Bacillus flexus -98%			
B50	gyrB	Bacillus megaterium – 99%			<i>B. megaterium</i>	2.1
B50	rpoB	Bacillus megaterium – 99%				
B51	16S	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -100%	<i>Klebsiella variicola</i> -99%			
B51	23S	<i>Klebsiella pneumoniae</i> – 99%	<i>Klebsiella variicola</i> -99%	<i>Enterobacter aerogenes</i> -99%	<i>K. pneumoniae</i>	2.3
B51	gyrB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> – 99%	<i>Klebsiella variicola</i> -99%			
B51	rpoB	<i>Klebsiella variicola</i> -99%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> – 99%	<i>Enterobacter aerogenes</i> -98%		
B54	16S	<i>Pantoea ananatis</i> -100%	<i>Pantoea vagans</i> -99%	<i>Pantoea agglomerans</i> – 99%		
B54	23S	<i>Pantoea ananatis</i> -99%	<i>Pantoea vagans</i> -98%	<i>Pantoea stewartii</i> – 99%		
B54	gyrB	<i>Pantoea ananatis</i> -99%			<i>P. ananatis</i>	2.0
B54	rpoB	<i>Pantoea ananatis</i> -99%				
B61	16S	<i>M. hydrocarbonoxydans</i> -99%	<i>Microbacterium foliorum</i> -99%	<i>M. paraoxydans</i> -97%		
B61	23S	<i>Microbacterium foliorum</i> -99%	<i>Microbacterium pygmaeum</i> -97%	<i>M. paraoxydans</i> -97%		
B61	gyrB	<i>M. phyllosphaerae</i> -91%			<i>Microbacterium sp.</i>	1,9
B61	rpoB	<i>Microbacterium</i> -95%				
B81	16S	<i>Pseudomonas putida</i> – 99 %	<i>P. entomophila</i> – 99 %	<i>Pseudomonas monteillii</i> – 99 %		
B81	23S	<i>Pseudomonas putida</i> – 99 %	<i>P. entomophila</i> – 99 %	<i>Pseudomonas monteillii</i> – 99 %		
B81	gyrB	<i>Pseudomonas putida</i> – 92 %	<i>Pseudomonas entomophila</i> – 93 %		<i>P. putida</i>	2.0
B81	rpoB	<i>Pseudomonas putida</i> – 97 %	<i>Pseudomonas entomophila</i> – 97 %			
B85	16S	<i>Serratia marcescens</i> 99%	<i>Serratia ureilytica</i> -99%	<i>Enterobacter aerogenes</i> -99%		
B85	23S	<i>Serratia marcescens</i> 99%	<i>Serratia liquefaciens</i> – 98%	<i>Serratia fonticola</i> -98%	<i>Não identificada</i>	
B85	gyrB	<i>Serratia marcescens</i> 99%				
B85	rpoB	<i>Serratia marcescens</i> 99%				
B2088	16S	<i>O. pseudogrignonense</i> – 100%	<i>Ochrobactrum pituitosum</i> -100 %	<i>O. rhizosphaerae</i> -100%		
B2088	23S					
B2088	gyrB	<i>O. pseudogrignonense</i> – 98%	<i>Ochrobactrum pituitosum</i> -98%		<i>Não identificada</i>	
B2088	rpoB	<i>O. pseudogrignonense</i> – 99%	<i>Ochrobactrum pituitosum</i> -98%			
B2112	16S	<i>Serratia marcescens</i> 99%	<i>Enterobacter aerogenes</i> 99 %	<i>Serratia ureilytica</i> -99%		
B2112	23S	<i>Serratia marcescens</i> 99%	<i>Serratia liquefaciens</i> – 98%	<i>Serratia fonticola</i> - 98%	<i>S. marcescens</i>	2.4
B2112	gyrB	<i>Serratia marcescens</i> 99%				
B2112	rpoB	<i>Serratia marcescens</i> 99%				

Tabela 3: Predição das CDS (sequência codificante) relacionadas ao metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e fitohormônios a partir da anotação feita com Prokaryotic Genome Annotation

System (PROKKA) e RAST (RAST-TK). Os números representam o número de locus que cada CDS possui nos genomas.

		UFMG 50	UFMG 51	UFMG 54	UFMG 61	UFMG 81	UFMG 85	CNPMS 2088	CNPMS 2112	
Tamanho dos genomas		6,14	6,54	4,27	3,76	6,07	5,18	5,5	5,3	
Funções	CDS									
Metabolismo de P										
Utilização de organofosfonato	Operon Phn	-	phnC(2)) phnD phnE(2) phnF phnG phnH phnI phnK phnL phnN phnV	PhnD phnE(2) phnF phnG phnH phnI phnJ phnK phnL phnN phnM	PhnC(3) phnD(3) phnE(4) phnV	PhnD phnE(2) phnN phnU	PhnC PhnD PhnE(2) PhnF(2) PhnG PhnH PhnI phnJ PhnK PhnL PhnN PhnM PhnT PhnU PhnV(3)	PhnC PhnD(2) PhnE(2) PhnG PhnH PhnI PhnK PhnJ PhnL PhnN PhnM(2) PhnU PhnV(3)	PhnD PhnE(2) PhnF(2) PhnG PhnH PhnI PhnJ PhnK PhnL PhnN PhnM PhnT PhnU PhnV(3)	
	Fosfonoacetaldeído hidrolase	1	-	-	1	2	1	-	1	
	Fosfonopiruvato hidrolase	1	-	-	-	-	-	-	-	
	Captção de fosfato inorgânico	Sistema Pst	PstA, PstB(2) PstC PstS	PstA PstB PstC PstS	PstA(2) PstB(2) PstC(2) PstS(2)	PstB PstC PstS	PstA PstB PstC PstS	PstA(2) PstB(2) PstC(2) PstS(2)	PstA PstB PstC PstS	PstA(2) PstB(3) PstC(2) PstS(2)
		Transportador de fosfato inorgânico de baixa afinidade	1	1	2	1	2	2	-	2
		Regulon Pho	PhoB PhoU PhoR(3) PhoH(2)	PhoH phoB(2) PhoU PhoR	PhoH(2) PhoB PhoU PhoR	PhoH(2) PhoU	PhoB(2) PhoH(2) PhoU PhoR	PhoB PhoH(2) PhoU PhoR	PhoB PhoR PhoH PhoU	PhoB PhoH(2) PhoU
	Resposta à restrição de fosfato inorgânico no meio	Proteína de regulação transcricional da síntese de fosfatase alcalina (PhoP)	5	3	2	1	2	1	2	1
		Fosfatase alcalina	3	1	1	-	1	3	1	3
		Exopolifosfatase	1	1	1	1	1	1	-	1
	Fosfatases	Principal fosfatase ácida irrepressível por fosfato	-	2	1	-	-	1	-	-

Ácidos orgânicos

Ácidos glucônico e Cetoglucônico, lático, cítrico e oxálico	Gluconato desidrogenase	4	9	2	5	2	5	1	5
	Ácido 2,5-diceto- D-glucônico redutase	2	3	1	2	1	3	2	2
	Transportador de gluconato (alta afinidade)	2	1	1	-	1	2	-	2
	Transportador de gluconato (baixa afinidade)	-	1	1	-	-	1	-	1
	Síntese da coenzima PQQ (pirroloquinolina quinona)	-	3	3	-	3	4	-	4
	2-cetogluconato quinase	1	1	1	-	-	1	-	1
	Repressor da utilização de 2- cetogluconato (PtxS)	1	1	1	-	-	1	-	1
	2-cetogluconato redutase	-	2	-	-	1	1	3	1
	Transportador de cetogluconato	1	2	1	-	-	2	-	2
	2-ceto-3- desoxigluconato permease	-	-	1	-	-	-	-	-
	Ceto-D-gluconato desidrogenase	-	-	-	-	-	1	-	1
	Lactato desidrogenase	1	6	6	1	2	7	1	7
	L-lactato permease	1	1	1	-	-	1	-	1
	Proteína de utilização de lactato	3	-	1	-	2	-	-	-
	Possível proteína regulatória do operon L-lactato desidrogenase	1	3	3	-	-	2	1	-
	Antiporter malato- 2H(+)/Na(+)- lactato	1	-	-	-	-	-	-	1
	Metabolismo de citrato	9	16	10	10	14	22	6	4
	Oxalato descarboxilase (OxdD)	1	-	1	1	-	1	1	-

		Fitohormônios							
Ácido indol acético (AIA)	Indol-3-piruvato descarboxilase	1	1	1	-	-	2	-	2
	Indol-3-glicerol fosfato sintase	-	-	-	1	1	-	1	-
	Cadeias beta, alfa da triptofano sintase	2	2	2	2	2	2	2	2
	Fosforibosil antranilato isomerase	1	-	-	-	-	1	-	1
	Descarboxilase dos aminoácidos-L-aromáticos	-	-	-	-	-	1	-	2
	Hidrolase do indol-3-acetil-ácido aspártico	-	1	-	-	-	1	-	1
	Citocinina	Adenina fosforibosil transferase	1	1	1	1	1	1	1
Fosforibosil hidrolase		1	1	1	1	1	1	1	1
Adenosina fosfato isopentenil hidrolase		-	-	-	-	-	-	-	-
Isopentenil transferase		-	-	-	-	-	-	-	-
Isopentenil difosfato isomerase		2	1	1	1	-	-	-	1

DISCUSSÃO

A maioria das bactérias provenientes do enriquecimento com fosfato de Araxá pertencem a classe Gamaproteobacteria (Tabela 1) e a família Enterobacteriaceae. Estas foram representadas, principalmente, pelos gêneros *Klebsiella* sp. (62,5 %) e *Pantoea* sp. (25 %), quando o solo adicionado de fosfato de Araxá foi usado como inóculo para o enriquecimento, e por *Enterobacter* sp. (50 %) e *Klebsiella* sp. (25 %), para o solo sem adição de P. Enterobacteriaceae é uma família bacteriana distribuída de forma ubíqua nos ambientes, já sendo relatada em solos, água, planta e amostras clínicas (Podschun et al., 2001; Rodrigues et al., 2016; Silva et al., 2017). Estes gêneros já foram relatados como solubilizadores de P inorgânico e/ou adaptados a ambientes com limitação de P (Silva et al., 2017), como no meio seletivo usado para o enriquecimento e isolamento dessas bactérias (Ikeda et al., 2013). Muitas espécies desses gêneros podem também fixar nitrogênio de forma associativa ou de vida livre e já foram encontradas na rizosfera e no interior de tecidos (estilo de vida endofítico) de várias

plantas, inclusive do milho (Dong, Iniguez, & Triplett 2003; Iniguez, Dong, & Triplett 2004; Brisse, Grimont, & Grimont 2006; Magnani et al., 2010; Menéndez et al., 2016).

De acordo com o potencial de disponibilização de P pelas bactérias avaliadas, podemos observar que os valores de P liberados nos ensaios de solubilização do fosfato de Araxá foram superiores aos detectados na solubilização de fosfato de ferro (Figura 1). De fato, o fosfato ligado ao cálcio, como no caso do fosfato de Araxá, apresenta maior solubilidade - do que o fosfato ligado ao ferro e ao alumínio (Viégas et al., 2010,). Este padrão de maior solubilização do fosfato de cálcio mediada por micro-organismos em ensaios *in vitro* já foi observado por outros autores (Silva-Filho & Vidor, 2000; Son et al., 2006; Chai et al., 2011; Silva et al., 2014). *S. marcescens* UFMG85 foi a bactéria que melhor solubilizou o fosfato de Araxá ($p < 0,05$) atingindo 269 mg L^{-1} de P ao final dos dois dias avaliados. Estes valores podem ser considerados altos quando comparados com o valor de $100,7 \text{ mg L}^{-1}$ de P liberado a a partir de 10 dias de contato com fosfato de Araxá pela bactéria *Burkholderia cepacea* isolada da rizosfera de milho em trabalhos anteriores (Gomes et al 2015). Contudo, dependendo do tipo de fosfato, valores maiores de solubilização podem ser encontrados, como no trabalho de Mardad e colaboradores (2014), que observaram a liberação de 866 mg L^{-1} de P após a otimização da solubilização do fosfato tricálcio por *Enterobacter hormaechei*. Para o fosfato de rocha de Yonghe, o fungo *Penicillium decumbens* solubilizou 956 mg L^{-1} de P a partir de fosfato tricálcio (Shi et al., 2014). Esta diferença na solubilização pode ocorrer devido às impurezas presentes nas rochas que interferem com o crescimento e capacidade de solubilização do micro-organismo, como já relatado por Mendes e colaboradores (2013). Ao investigarem a liberação simultânea de vários elementos químicos, potencialmente inibidores da solubilização do fosfato de Araxá por *Aspergillus niger*, os autores observaram que a liberação de fluoreto reduziu o processo em 55 %. Além da solubilização de P, houve correlação entre o teor de fluoreto liberado e a diminuição do crescimento fúngico e entre a produção de ácidos e a acidificação do meio. Geralmente, o abaixamento do pH correlaciona-se com o aumento dos níveis de P solubilizado a partir de fosfato ligados ao cálcio, como observado para algumas das bactérias em estudo (Figura 2). A acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos, pela liberação de íons H^+ durante a assimilação de NH_4^+ ou através de outras reações metabólicas que desencadeiam a excreção de prótons, como a respiração, são os principais mecanismos relatados como responsáveis pela disponibilização do P a partir de fontes insolúveis, como os fosfatos de rocha (Illmer & Schinner, 1995). Além disso, a eficiência dos ácidos orgânicos na solubilização de P está relacionada à formação de complexos e à quelatação de íons no meio que desencadeiam na liberação do P em solução (Mendes et al. 2014). Interessantemente, a bactéria *S. marcescens* UFMG85, que se destacou na solubilização do fosfato de Araxá nos ensaios sob agitação, foi a que apresentou o maior número de genes relacionados ao metabolismo de diferentes ácidos orgânicos, como os ácidos glucônico, cetoglucônico, láctico, cítrico e oxálico (Tabela 2). A presença

neste genoma de genes que codificam a enzima oxalato descarboxilase, por exemplo, poderia conferir uma maior capacidade de adaptação às condições de acidez geradas durante o processo de solubilização do P como verificado nos estudos com a bactéria *B. subtilis* (Tanner e Bornemann, 2000; MacLellan et al., 2009). Nos estudos, foi sugerido que a enzima atua na proteção das células contra o estresse por baixo pH ao consumir prótons via descarboxilação do ácido oxálico (Tanner e Bornemann, 2000; MacLellan et al., 2009). Dado que o ácido oxálico é um dos ácidos importantes produzidos pelos microrganismos durante a solubilização de fosfatos de rocha (Silva et al., 2014), pode-se inferir que o controle da concentração desse ácido no meio desempenhado pela oxalato-decarboxilase que leva ao efeito de tamponamento do meio extracelular pela formação de ácido fórmico e CO₂, juntamente com o consumo de prótons, levaria à manutenção de um ambiente ainda ácido, porém mais estável e menos tóxico para as bactérias. Isso possivelmente levaria a uma condição mais favorável para a solubilização controlada do fosfato de rocha.

No geral, a comunidade bacteriana apresentou padrão de solubilização de P variável com o gênero – gênero-independente-, sendo observado representantes de um mesmo gênero nos três grupos gerados pela análise de Kmeans dos dados desta variável. Foi observado também um maior potencial de solubilização de P do fosfato de Araxá pelas bactérias endofíticas em relação às rizosféricas (Figura 1a, $p < 0,05$). Este efeito do local de isolamento das bactérias associadas ao milho na solubilização de P ainda precisa ser melhor investigado, já que inúmeros trabalhos relatam este potencial tanto para bactérias isoladas de tecidos internos de milho (Ikeda et al., 2013, Oteino et al., 2015; Matos et al., 2017) quanto da rizosfera desta planta (Gomes et al., 2014).

Outro resultado interessante desse trabalho é a elevada capacidade de solubilização de fosfato de Araxá das bactérias *S. marcescens* UFMG44 e *S. marcescens* UFMG43 nos experimentos em placas de poliestireno, sem agitação, atingindo níveis de 124 e 122 mg L⁻¹ de P liberado no meio, respectivamente (Figura 1e). Esses valores são maiores do que os encontrados em outros trabalhos que avaliaram a capacidade de solubilização de P também por bactérias, sob condições de agitação (Mohammadi, 2012; Gomes et al., 2014). Provavelmente, neste trabalho estas condições resultaram em ambientes de anaerobiose ou microaerobiose que levaram a bactéria a alterar o seu metabolismo e desempenhar a solubilização de P, mesmo em condições de limitação de oxigênio. Isto porque *S. marcescens* é anaeróbia facultativa, podendo crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, usando, por exemplo, as vias fermentativas (Jung et al., 2007).

A partir da análise dos experimentos de avaliação de promoção de crescimento de milho pelos oito isolados selecionados (Figura 3), foi possível verificar que bactérias pertencentes ao grupo de melhor solubilizadores do fosfato de Araxá nos testes *in vitro* também promoveram o crescimento das plantas em casa de vegetação, como no caso de UFMG81, UFMG51 e UFMG54).

Representantes dos gêneros e/ou espécies que se destacaram na promoção do crescimento de milho cultivado com o fosfato de rocha (*Ochrobactrum* e *B. megaterium*) e superfosfato triplo (*S. marcescens*) já foram relatados em diversos estudos como promotores do crescimento de planta (Selvakumar et al., 2008; Kang et al., 2014, Mishra et al., 2017). *Ochrobactrum* promoveu o aumento da biomassa de raízes, parte aérea e número de folhas de plantas de milho, além de apresentar tolerância aos estresses abióticos de temperatura, salinidade e seca (Mishra et al., 2017). Muitos fatores de promoção do crescimento de plantas são atribuídos a este gênero como atividade de ACC desaminase, fixação de nitrogênio, solubilização de P, produção de ácido indol acético (AIA), capacidade de formação de biofilme e de indução de resistência sistêmica das plantas (Magalhães et al., 2001; Bal et al., 2013; Bogino et al., 2013; Sumayo et al., 2013; Meng et al. 2014). A inoculação de *B. megaterium* em mutantes de *Arabidopsis* deficientes na sinalização de auxina ou etileno contribuiu para um aumento do número de raízes laterais, crescimento de raízes laterais e comprimento de raiz, resultando num aumento da biomassa total da planta (López-Bucio et al., 2007). Esta bactéria tem sido usada também na formulação de bioinoculantes que visam o aumento no suprimento de N e P para as plantas juntamente com *Azotobacter chroococcum* (Kloepper et al., 1989; Rodríguez e Fraga, 1999). *S. marcescens* também aumentou o conteúdo de P no solo, a absorção de P e o crescimento de plantas em trabalhos de Gupta et al. (2012) e a inoculação em sementes de milho com esta bactéria aumentou em 85 % o rendimento de grãos cultivados em campo, em experimentos realizados por Hameeda et al. (2008). Interessantemente, estas bactérias apresentaram genes relacionados ao metabolismo de produção de fitohormônios AIA e citocininas (Tabela 2), que estão diretamente relacionados a expansão radicular (Marchant et al., 2002; Jang, et al., 2015), e genes relacionados a produção de ácidos orgânicos, importantes para a solubilização de fosfato de rocha (Ivanova et al., 2006; Prijambada et al., 2009). Estas características combinadas podem ter sido responsáveis pelo aumento no desenvolvimento das plantas de milho detectado neste estudo. Contudo, os efeitos da regulação gênica precisam ser considerados, uma vez que as demais bactérias, embora apresentem genes relacionados a tais funções, o perfil de promoção de crescimento do milho foi diferenciado entre elas.

CONCLUSÃO

Dessa forma, podemos concluir que o meio e as condições de cultivo usadas para o enriquecimento dos solos rizosféricos de milho com e sem adição de fosfato de araxá foram mais seletivos para o crescimento de bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, independentemente do tipo de solo utilizado como fonte de bactérias. Os resultados obtidos neste estudo também indicam que a eficiência de solubilização de P é uma característica que varia amplamente em nível de

linhagem. Utilizando uma amostra de 100 diferentes bactérias, foi possível observar que o local de isolamento de um microrganismo pode influenciar essa habilidade, sendo que as bactérias endofíticas foram mais eficientes na solubilização de fosfato de araxá do que bactérias isoladas de solo rizosférico. Das oito bactérias selecionadas no processo de solubilização de P *in vitro*, oito contribuíram para a melhoria de, no mínimo, um dos parâmetros de crescimento de milho, indicando que o método utilizado neste trabalho foi adequado para a seleção de bons candidatos a bioinoculantes para a promoção de crescimento e acúmulo de P no solo. Além disso, de acordo com a análise e detecção de genes PCP nos genomas estudados, pode-se sugerir que a produção de ácidos orgânicos, sistemas de aquisição de P e produção de fitohormônios sejam os mecanismos que estariam contribuindo diretamente para a promoção do crescimento do milho.

REFERÊNCIAS

- Abreu CS, Figueiredo JE, Oliveira CA, Dos Santos VL, Gomes EA, Ribeiro VP, Barros BA, Lana UG, Marriel IE (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genet Mol Res*. 16: 16.
- Bal HB, Nayak L, Das S and Adhya TK (2013) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366: 93-105.
- Barroso, C. B., & Nahas, E. (2008). Solubilization of hardly soluble iron phosphate in culture médium. *Pesq Agropec Bras*, 43: 529-535.
- Bogino PC, Oliva MDLM, Sorroche FG, Giordano W (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int J Mol Sci* 14: 15838–15859.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol Appl* 8: 559-568.
- Coelho, A.M. & Alves, V.M.C. (2003) Adubação fosfatada na cultura do milho. In: Simpósio sobre fósforo na agricultura brasileira. Anais. Piracicaba, Potafos/anda, 31 p.
- Coutinho, E. L., Natale, W., Nova, A. S. V., and Sitta, D. S. (1991) Eficiência agrônômica de fertilizantes fosfatados para a cultura da soja. *Pesq Agropec Bras* 26: 1393-1399.
- Estrada, Paulina et al. (2002). A N₂-Fixing Endophytic *Burkholderia* sp. Associated with Maize Plants Cultivated in Mexico. *Can J Microbiol* 48: 285–94.
- Fallik, Elazar, Shlomo Sarig, Yaacov Okon. (1994). Morphology and Physiology of Plant Roots Associated with Azospirillum. *Azospirillum/plant associations*: 77–85.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agropec* 35: 1039-1042.
- Goedert, W. J., & Lobato, E. (1980) Eficiência agrônômica de fosfatos em solo de cerrado. *Pesq Agropec Bras* 15: 311-318.
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol res* 167: 358-363.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol res* 163: 234-242.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis *Palaeontol. Electronica* 4: 1–9.
- Husen, E. (2016). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. *Indonesian J Agricultural Sci* 4: 27-31.
- Illmer P & Schinner F (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates-Solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* 27: 257-263.
- Ivanova, R. P., Bojinova, D. Y., Gruncharov, I. N., Damgaliev, D. L. (2006). The solubilization of rock phosphate by organic acids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 181: 2541-2554.
- Jang, G., Lee, J. H., Rastogi, K., Park, S., Oh, S. H., Lee, J. Y. (2015). Cytokinin-dependent secondary growth determines root biomass in radish (*Raphanus sativus* L.). *J experim bot* 66: 4607-4619.
- Jarosz-Wilkolazka A & Gadd G (2003) Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere* 52: 541-547.
- Johnston Monje, D. M. (2011). Microbial Ecology of Endophytic Bacteria in *Zea* Species as Influenced by Plant Genotype, Seed Origin, and Soil Environment (Doctoral dissertation).
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., Lee, K. E., Kim, J. H. (2014). Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mjl212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian J Microbiol* 54: 427-433.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, K., Zablotowicz, R. M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39–43.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microb Int* 20: 207-217.
- MacLellan, S. R., Helmann, J. D., Antelmann, H. (2009) The YvrI alternative δ factor is essential for acid stress induction of oxalate decarboxylase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191:931–939

- Mardad, I., Serrano, A., Soukri, A. (2014) Effect of carbon, nitrogen sources and abiotic stress on phosphate solubilization by bacterial strains isolated from a Moroccan rock phosphate deposit. *J Adv Chem Eng.* 1:102.
- Magalhães, Cruz. L., de Souza, E. M., Weber, O., Baldani, J. I., Dçbereiner, J., Oliveira, Pedrosa. F. (2001) 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl Environ Microbiol* 67:2375–2379
- Magnuson J & Lasure L (2004) Organic Acid Production by Filamentous Fungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*, (Tkacz J & Lange L, eds.), p. 307-340.
- Manzoor, M., Abbasi, M. K., Sultan, T. (2017). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiol J* 34: 81-95.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell* 14: 589-597.
- Massenssini, A. M., Tótola, M. R., Borges, A. C., Costa, M. D. (2016). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from *Eucalyptus* sp. rhizosphere. *Rev Árvore* 40: 125-134.
- Matos, A. D., Gomes, I. C., Nietsche, S., Xavier, A. A., Gomes, W. S., dos Santos Neto, J. A., Pereira, M. C. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Ac Bras Ciên* 89: 2945-2954.
- Mendes, G. O., Vassilev, N. B., Bonduki, V. H. A., da Silva, I. R., Ribeiro, J. I., Costa, M. D. (2013) Inhibition of *Aspergillus niger* Phosphate Solubilization by Fluoride Released from Rock Phosphate. *Appl Environ Microb* 79: 4906-4913.
- Mendes, G. D. O., Silva, N. M. R. M., Anastácio, T. C., Vassilev, N. B., Ribeiro, J. I., Silva, I. R., Costa, M. D. (2015). Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial biotech* 8: 930-939.
- Meng, X., Yan, D., Long, X., Wang, C., Liu, Z., Rengel, Z. (2014) Colonization by endophytic *Ochrobactrum anthropi* Mn1 promotes growth of Jerusalem artichoke. *Microb Biotechnol* 7: 601–610.
- Mishra, S. K., Khan, M. H., Misra, S., Dixit, V. K., Khare, P., Srivastava, S., Chauhan, P. S. (2017). Characterisation of *Pseudomonas* spp. and *Ochrobactrum* sp. isolated from volcanic soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110: 253-270.
- Mohammadi, K. (2012). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resour Environ* 2: 80-85.
- Novais, R. F. & Smyth, T. J. (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 399 p.
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front microbiol*, 6.
- Palus, James. A., James, Borneman., Paul, W. Ludden., Eric, W. Triplett. 1996. A Diazotrophic Bacterial Endophyte Isolated from Stems of *Zea Mays* L. and *Zea Luxurians* Iltis and Doebley. *Plant and soil* 186: 135–42.
- Panhwar, Q. A., Radziah, O., Zaharah, A. R., Sariah, M., Razi, I. M. (2011). Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl env microbio* 67: 3325-3327.
- Pontes, A. P., Souza, R. D., Granada, C. E., Passaglia, L. M. (2015). Screening of plant growth promoting bacteria associated with barley plants (*Hordeum vulgare* L.) cultivated in South Brazil. *Biota Neotropica*, 15.
- Prijambada, I. D., Widada, J., Kabirun, S., Widiyanto, D. (2009). Secretion of organic acids by phosphate solubilizing bacteria isolated from oxisols. *Jurnal TANAH TROPIKA (Journal of Tropical Soils)*, 14.
- R Development Core Team (2008) R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rodrigues, A. A., Forzani, M. V., Soares, R. D. S., Sibov, S. T., Vieira, J. D. G. (2016). Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Pesq Agropec Tropical*, 46: 149-158.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol adv* 17:319-339.

- Sagoe CI, Ando T, Kouno K & Nagaoka T (1998) Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Sci Plant Nut* 44: 617-625.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B., Vani, S. S. (2017). Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6: 2133-2144.
- Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A. D., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, H. S. (2008). Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Lett appl microbiol* 46: 171-175.
- Shi, F., Yin, Z., Jiang, H., Fan, B. (2014). Screening, identification of P-dissolving fungus P83 strain and its effects on phosphate solubilization and plant growth promotion. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 54: 1333-1343.
- Silva, Ubiana, C et al. (2014). Fluoride-Tolerant Mutants of *Aspergillus Niger* Show Enhanced Phosphate Solubilization Capacity. *PLoS one* 9: e110246.
- Silva, U. C., Medeiros, J. D., Leite, L. R., Morais, D. K., Cuadros-Orellana, S., Oliveira, C. A., ... & Dos Santos, V. L. (2017). Long-Term Rock Phosphate Fertilization Impacts the Microbial Communities of Maize Rhizosphere. *Front microbiol* 8: 1266.
- Smith, J. H., Allison, F. E., Soulides, D. A. (1962). Phosphobacteria as a soil inoculant. *Tech US Dept Agricult Bul* 1:63-70.
- 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. *J appl microbiol* 111: 683-692.
- Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., Heo, M. S. (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Biores Techn* 97:204-210.
- Souza, R. D., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Gen mol biol* 38: 401-419.
- Stauffer, M. D. & Sulewski, G. (2004) Fósforo essencial para a vida. In: Yamada, T.; Badalla, S.R.S. (ed) *Anais do simpósio sobre o fósforo na agricultura brasileira: Fósforo na agricultura brasileira*. Piracicaba: Potatos. pp.1-11.
- Sumayo, M., Hahm, M. S., Ghim, S. Y. (2013). Determinants of plant growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tobacco leaves. *The plant Pathol J* 29:, 174.
- Sultenfuss, J. H. & Doyle, W. J. (1999). Functions of phosphorus in plants. *Better Crops*, 83: 6-7.
- Tanner, A., Bowater, L., Fairhurst, S. A., Bornemann, S. (2001) Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity. Overexpression and characterization of *Bacillus subtilis* YvrK and YoaN. *J Biol Chem* 276:43627- 43634
- Vieira, J. A.; Alves, N. L.S; Paiva, C. A. O., Santos, V.L. (2015) Maize roots endophytic bacteria and their potential as plant growth promoters and biological control agents. In: *Rhizosphere 4*, Maastricht. , 2015.
- Wang, Z., Xu, G., Ma, P., Lin, Y., Yang, X., Cao, C. (2017). Isolation and Characterization of a Phosphorus-Solubilizing Bacterium from Rhizosphere Soils and Its Colonization of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). *Front microbiol* 8: 1270

Material suplementar

Quadro S1: Resumo dos resultados com diferença significativa para os parâmetros de avaliação do crescimento vegetal.

Bactéria	Identificação	Tamanho da planta	Área foliar	Biomassa da planta	Biomassa da raiz
UFMG50	<i>Bacillus</i> sp.	*ST (7%)	*RP (16%)		*RP(20%)
UFMG51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				*ST
UFMG54	<i>Pantoea</i> sp.		*ST (48%)		
UFMG61	<i>Microbacterium</i> sp.				
UFMG81	<i>Pseudomonas</i> sp.		*RP(21,8%)		*ST
UFMG85	<i>Serratia marcescens</i>				*ST
CNPMS2088	<i>Ochrobactrum</i> sp.	*ST (5,2%)		*RP(30%)	*RP (27%)
CNPMS2112	<i>Serratia marcescens</i>		*RP (26%) *ST (10%)		*ST

RP: tratamento adicionado de fosfato de rocha. ST: tratamento adicionado de Super Fosfato Triplo. O * indica diferença significativa pela análise de variância seguida do teste Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Quadro S2 – Agrupamento das bactérias quanto à eficiência de solubilização de fosfato de Araxá em meio sob agitação. A identificação das linhagens do grupo 1 é indicada em vermelho.

	Grupo 1 (alta solubilização)		Grupo 2 (média solubilização)		Grupo 3 (baixa solubilização)	
	ENDO	RIZO	ENDO	RIZO	ENDO	RIZO
<i>Acinetobacter</i>	1 UFMG62		1		2	
<i>Arthrobacter</i>			1		2	
<i>Bacillus</i>		1 UFMG34			10	3
<i>Brevibacillus</i>					1	
<i>Burkholderia</i>				1		
<i>Curtobacterium</i>			1		1	1
<i>Enterobacter</i>		2 UFMG18 UFMG30	5	2	3	4
<i>Erwinia</i>		1 UFMG04				
<i>Flavobacterium</i>					2	
<i>Klebsiella</i>	1 UFMG51	6 UFMG01 UFMG02 UFMG06 UFMG14 UFMG20 UFMG21	2	2	3	6
<i>Lactococcus</i>					2	
<i>Lysinibacillus</i>						1
<i>Microbacterium</i>	1 UFMG61				2	

<i>Obseumbacterium</i>					1	
<i>Ochrobactrum</i>					1	
<i>Pantoea</i>	2 UFMG83 UFMG54	1 UFMG38	4	2	3	1
<i>Pseudomonas</i>	1 UFMG81				1	
<i>Raoultella</i>	1 UFMG69					
<i>Rhizobium</i>					1	
<i>Serratia</i>	3 UFMG85 UFMG48 UFMG44		5			
<i>Staphylococcus</i>					3	
TOTAL (101)	10	11	19	7	38	16

ENDO – bactérias endofíticas; RIZO – bactérias originárias de rizosfera

O agrupamento das bactérias endofíticas e rizosféricas de acordo com a solubilização de fosfato de Araxá é mostrado na Figura 1^a

Quadro S3 – Agrupamento das bactérias quanto à eficiência de solubilização de fosfato de ferro. A identificação das linhagens do grupo 1 é indicada em vermelho. A identificação das linhagens do grupo 1 é indicada em vermelho.

	Grupo 1 (alta solubilização)		Grupo 2 (média solubilização)		Grupo 3 (baixa solubilização)	
	ENDO	RIZO	ENDO	RIZO	ENDO	RIZO
<i>Acinetobacter</i>					4	
<i>Arthrobacter</i>					3	
<i>Bacillus</i>			2		10	4
<i>Brevibacillus</i>					1	
<i>Burkholderia</i>						1
<i>Curtobacterium</i>			1		1	1
<i>Enterobacter</i>			4		3	8
<i>Erwinia</i>		1 UFMG04				
<i>Flavobacterium</i>			1		1	
<i>Klebsiella</i>		6 UFMG14 UFMG16 UFMG20 UFMG21 UFMG29 UFMG33	2	3	4	5
<i>Lactococcus</i>					2	
<i>Lysinibacillus</i>						1
<i>Microbacterium</i>					2	
<i>Obseumbacteriu</i>					1	

<i>m</i>						
<i>Ochrobactrum</i>						
<i>Pantoea</i>	2 UFMG54 UFMG83	1 UFMG38	4	1	3	2
<i>Pseudomonas</i>					3	
<i>Raoultella</i>			1			
<i>Rhizobium</i>			1			
<i>Serratia</i>			3		5	
<i>Staphylococcus</i>			1		2	
TOTAL (101)	2	8	20	4	45	22

ENDO – bactérias endofíticas; RIZO – bactérias originárias de rizosfera

Quadro S3 – Agrupamento das bactérias quanto à eficiência de solubilização de fosfato de Araxá sem agitação (células sésseis).

	Grupo 1 (alta solubilização)		Grupo 2 (média solubilização)		Grupo 3 (baixa solubilização)	
	ENDO	RIZO	ENDO	RIZO	ENDO	RIZO
<i>Acinetobacter</i>					2	
<i>Arthrobacter</i>					1	
<i>Bacillus</i>			1		3	
<i>Burkholderia</i>		1 UFMG26				
<i>Enterobacter</i>	1 UFMG45		1	2	4	2
<i>Erwinia</i>					1	
<i>Flavobacterium</i>					1	1
<i>Klebsiella</i>	1 UFMG39	5 UFMG33 UFMG32 UFMG29 UFMG39 UFMG23	1	5	2	2
<i>Microbacterium</i>					1	
<i>Pantoea</i>		1 UFMG40	1	2	5	
<i>Pseudomonas</i>					1	
<i>Raoultella</i>					1	
<i>Serratia</i>	2 UFMG43 UFMG44				4	
<i>Staphylococcus</i>					1	
TOTAL (56)	4	7	4	9	27	5

ENDO – bactérias endofíticas; RIZO – bactérias originárias de rizosfera

MOLECULAR ECOLOGY

Comparative study of the genome of endophyte *Serratia marcescens* isolated from *Zea mays* with the genomes of *Serratia* strains isolated from different lifestyles

Journal:	<i>Molecular Ecology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Ubiana; Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiology Silva, Daliane; Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiology Leite, Laura; Centro de pesquisa René Rachou Research, Grupo de pesquisa em Genômica e Informática de Biosistemas Medeiros, Julliane; Centro de Pesquisas Rene Rachou, Biosystems Informatics and Genomics Group Felestrino, Érica; Federal University of Ouro Preto, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - Biotecnologia canesch, washington; Universidade Federal de Ouro Preto, Centro de pesquisa em Ciências Biológicas Moreira, Leandro; Universidade Federal de Ouro Preto, Department of Biological Sciences Almeida, Nalvo; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Computação Silva, Robson ; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Computação Oliveira, Christiane; Embrapa Milho e sorgo Santos, Vera; Universidade Federal de Minas Gerais, Microbiology
Keywords:	endophytes, comparative genomics, pan-genome, maize
Note: The following files were submitted by the author for peer review, but cannot be converted to PDF. You must view these files (e.g. movies) online.	
Figura5.zip	

1 **Comparative study of the genome of endophyte *Serratia marcescens* isolated from *Zea***
2 ***mays* with the genomes of *Serratia* strains isolated from different lifestyles**
3 ***Serratia marcescens* genomes from *Zea mays***

4 U.C. Silva ¹; D. R. C da Silva ¹; L. R. Leite ²; J. D. Medeiros ³; E. B. Felestrino ⁴; W. L.
5 Caneschi ⁴; L. M. Moreira^{4,5}; N. F. Almeida⁶; R. S.Silva ⁶; C. A. Oliveira ⁷; V.L.Santos ^{1*}

6
7 ¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
8 MG - Brazil; ² Grupo de pesquisa em Genômica e Informática de Biosistemas, Centro de
9 pesquisa René Rachou Research, Fiocruz, Belo Horizonte, MG - Brazil; ³ Laboratório de
10 Genética e Fisiologia Bacteriana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
11 Juiz de Fora. ⁴ Centro de pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro
12 Preto, Ouro Preto, MG - Brazil. ⁵Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal
13 de Ouro Preto, Ouro Preto, MG - Brazil ⁶ Faculdade de Computação, Universidade Federal de
14 Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS - Brazil; ⁷ Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG
15 - Brazil

16
17 ***Corresponding author:** VLS, Departamento de Microbiologia, Universidade de Minas
18 Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brazil. Zip
19 Code: 31270901. Phone: +55 (31) 34092741. E-mail: verabio@gmail.com

20
21 **Abstract**

22 In this study, we compared the draft genome of two endophyte *Serratia marcescens*
23 (SmCNPMS2112 and SmUFMG85) isolated from *Zea mays* with 19 *Serratia* species isolated

24 from distinct environments to identify genes indicative of the endophytic lifestyle, plant
25 growth promotion (PGP), and pathogenicity. We observed a high conserved proportion in all
26 the studied genomes for features related to colonization and PGP, suggesting that the
27 differences of a given lifestyle among the *Serratia* species evaluated are probably more
28 related to variations in gene expression than those related to genome content *per se*. In
29 addition, investigation of prophages and genomic islands showed insertion of three prophages
30 in the genome of SmUFMG85 and two prophages in the genome of SmCNPMS2112.
31 Moreover, a large part of the single and accessory regions of SmUFMG85 and
32 SmCNPMS2112 were localized into genomic islands. For example, in the SmCNPMS2112
33 genome, type III secretion system (T3SS), protease, chitinase, fimbriae, siderophore, and β -
34 lactamase singleton genes were detected in genomic islands, whereas in SmUFMG85,
35 singletons that code type IV secretion system (T4SS) apparatus, protease, hemolysin, iron
36 acquisition, and rhamnolipid production were located in genomic islands. These results helped
37 to better understand the adaptation of genomes to specific ecological niches relative to other
38 genomes of related species. Moreover, our results also describe a more precise and broad
39 view of the characteristics of the candidate strains for the development of bioinoculants to
40 accelerate the use of these bacteria in more sustainable agriculture models of important plants,
41 such as maize.

42

43 **Keywords:** endophytes, comparative genomics, pan-genome, maize.

44 **Introduction**

45 *Serratia marcescens* is an ubiquitous inhabitant of soil, water, plant surfaces and
46 internal tissues and found to be form a beneficial association with these habitats, e.g., in the

47 growth promotion of several plants (Jackson & Zimmermann, 1996; Chakraborty,
48 Chakraborty, & Chakraborty, 2010; Xu, Liu, & Guo, 2011; Orruño et al., 2014; Devi et al.,
49 2016; Barboza et al., 2017; Khan et al., 2017) or in a deleterious association acting as a causal
50 agent of disease of vines, food spoilage, and most recently in corn whorl rot (Wang, Bi, Li,
51 Zhang, & Lu, 2015; Besler & Little, 2017). Since the 60s of the last century, this species has
52 been recognized as an important nosocomial pathogen capable of causing ocular and urinary
53 tract infections, pneumonia, osteomyelitis, endocarditis, and intravenous catheter-associated
54 infections (Van der Vorm & Woldring-Zwaan, 2002; Mahlen, 2011; Khan, Khan, &
55 Aggarwal, 2013; Ishii, Adachi, Hamamoto, & Sekimizu, 2014). The ability to cause
56 diseases is primarily due to its resistance to antimicrobial agents and production of numerous
57 virulence factors, such as lipopolysaccharide (LPS), hemolysin, iron (Fe) uptake, biofilm
58 formation as well as secretion of toxins, adhesins, and hydrolytic enzymes (Kurz et al., 2003;
59 Gerlach & Hensel, 2007; Abbas & Hegazy, 2017).

60 However, many of these factors are also reported to be crucial for colonization of
61 vegetable tissues and PGP (López-Fernández et al., 2015). Some studies have already
62 reported the presence of *S. marcescens* in the endophytic and rhizospheric microbiota of
63 plants (Gyaneshwar et al., 2001; George, Gupta, Gopal, Thomas, & Thomas, 2013; Silva et
64 al., 2017) and have described traits involved in PGP (Devi et al., 2016; Singh & Jha, 2016;
65 Khan et al., 2017), biocontrol of soil-borne fungal pathogens and insects (Wei, Kloepper,
66 Tuzun, 1996), and eliciting induced systemic resistance against diverse plant pathogens (Wei,
67 Kloepper, Tuzun, 1991; Liu, Kloepper, Tuzun, 1995). However, the possibility of infections
68 in humans and plants has limited the researches on this species as an inoculant to stimuli plant
69 growth or for use as a pathogen biocontrol. Moreover, this genus may be a source of genes

70 related to proteins, toxins, and other virulence factors that could help in reducing crop
71 damage, insect control, and for PGP (Chakraborty et al., 2010; Li et al., 2015; Devi et al.,
72 2016; Besler & Little, 2017; Khan et al., 2017). In recent years, genome sequencing has
73 improved our understanding on the evolution of features involved in interactions between
74 bacteria and their hosts, which are important for the establishment of lifestyles, such as
75 endophytic, epiphytic, and pathogenic, in humans or plants (Mira, Martín-Cuadrado, D'Auria,
76 & Rodríguez-Valera, 2010; Chaudhry & Patil, 2016; Lòpez-Fernàndez et al., 2015).
77 Furthermore, genome comparison among strains of same the species from diverse
78 environments allows to find the differences amongst them that can explain diverse adaptation
79 patterns and virulence phenotypes (Ricard et al., 2006). In this context, mobilome analysis is
80 also an important tool to detect the degree of recent adaptations that a particular genome has
81 undergone as horizontal gene transfer (HGT) is an important mechanism of genetic variability
82 in prokaryotes (Raz & Tannenbaum, 2010). Despite this, few studies have used this tool to
83 analyze the similarities and/or differences between endophytic and pathogenic bacteria at the
84 level of chromosome organization to identify potential production of virulence and
85 colonization factors and resistance to biotic and abiotic factors (Chaudhry & Patil, 2016;
86 Lòpez-Fernàndez et al., 2015). Determination of the virulence characteristics shared among
87 the strains can be a milestone for understanding the adaptation to different hosts and to
88 generate data for the development of products and/or processes for control of pathogenic
89 agents or to improve the efficacy of beneficial bacteria.

90 For use as a bioinoculant in plants, it is desirable for the bacteria to exhibit, in addition
91 to PGP mechanisms, the ability to colonize the rhizosphere and/or plant internal tissues, viz.,
92 rhizosphere and endophytic competence, respectively. High-density rhizosphere colonization

93 requires the expression of genes related to motility, surface adhesion, siderophores and
94 polysaccharide production, utilizing a wide range of organic compounds, antibiotic
95 production, and catabolism of root exudates (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Lugtenberg,
96 Dekkers, & Bloemberg, 2001; Capdevila, Martínez-Granero, Sánchez-Contreras, Rivilla, &
97 Martín, 2004; Haas & Défag, 2005; Rodríguez-Navarro, Dardanelli, M. S., & Ruíz-Sáinz, et
98 al., 2007; Mavrodi, et al., 2011; Ghirardi et al., 2012). To achieve endophytic competence, the
99 bacterium should present many of the characteristics required for rhizosphere competence and
100 other characteristics, such as the production of plant polymers, hydrolytic enzymes, protein
101 secretion systems, quorum sensing, and reactive oxygen species (ROS) detoxification
102 (Sessitsch., et al., 2012; Silva et al., 2016). Another important issue is the safety of the
103 inoculant. For this, it is necessary to determine the pathogenic potential of the candidate
104 strains to guarantee the health of the plant and the safety of people involved in the cultivation
105 and consumption of the vegetable produce.

106 Thus, in this study, we sequenced the genomes of two endophytic *S. marcescens*
107 (SmUFMG85 and SmCNPMS2112) previously isolated from maize root (Vieira, 2015;
108 Ribeiro et al., 2015) in prospecting studies of bacteria capable of PGP. SmUFMG85 and
109 SmCNPMS2112 strains were highlighted in *in vitro* experiments aimed at evaluation of the
110 production of several PGP characteristics and *in vivo* trials using millet as a plant model in
111 greenhouse experiments (unpublished data). We then compared the genomes of the isolates
112 SmUFMG85 and SmCNPMS2112 with the available genomes of *Serratia* spp. isolates of
113 different lifestyles to describe their pan-genomes, primarily for characteristics related to PGP
114 and pathogenesis, in addition to mobilome investigation. Our aim was to understand whether

115 SmUFMG85 and SmCNPMS2112 genomes were either similar to those of other lifestyles or
116 exhibited unique characteristics responsible for endophytism.

117

118 **Material and methods**

119

120 **Strains and culturing conditions**

121

122 SmUFMG85 and SmCNPMS2112 were previously isolated from the internal tissue of
123 maize roots (Vieira, 2015; Ribeiro et al., 2015) and are deposited at the collection at the
124 Laboratory of Applied Microbiology of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
125 and also at the collection of multifunctional and phytopathogenic microorganisms of Embrapa
126 Maize and Sorghum. Maize plants used for bacterial isolation were grown in dystrophic dark
127 red latosol with clay texture from the Brazilian savanna (Cerrado) located at Embrapa Maize
128 and Sorghum Research Center, Sete Lagoas city (19° 27' 57" S; 44° 14' 49" W), Minas Gerais
129 State, Brazil. The climate is characterized by highland tropical climate (hot and warm
130 summers and dry winters) of savanna type according to the Köppen–Geiger classification
131 (Peel, Finlayson, & McMahon, 2007), with average annual rainfall of 1.403 inches and
132 average annual temperature of 22–27°C. Bacterial strains were previously characterized in
133 terms of phosphate (P) solubilization and mineralization, indole-3-acetic acid, siderophore
134 production, and root colonization capacity (unpublished data). Bacteria were stored at –80°C
135 in Tryptic soy broth (TSB; HiMedia, Mumbai, India) with 15% (v/v) glycerol, and the
136 reactivation was performed by streaking on Tryptic soy agar (TSA; HiMedia, Mumbai, India)
137 plates, followed by incubation for 24 h at 28°C.

138 **Genomic DNA isolation, sequencing, assembly, and genome annotation**

139

140 Genomic DNA was extracted from SmUFMG85 and SmCNPMS2112 cultures,
141 obtained after incubation on TSB for 24 h at 28°C, by agitation at 180 rpm using the Promega
142 Genomic DNA Purification Kit™ (Madison, USA) according to the manufacturer's
143 instructions. SmUFMG85 and SmCNPMS2112 genomes were sequenced on Illumina MiSeq
144 platform™ using the paired-end strategy. Libraries were prepared using Nextera XT DNA
145 Library Preparation Kit™ (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequenced reads were assembled
146 using the software A5 for filtering the adapters, quality analysis, and error correction for
147 contig and scaffold generation (Coil, Jospin, & Darling, 2014). In addition, the CAP3
148 software was used to improve scaffold assembly, revising low-quality regions, and correcting
149 possible erroneous connections among the contigs (Huang & Madan, 1999). These pre-
150 assembled genomic sequences were then annotated using the Prokaryotic Genome Annotation
151 System (PROKKA) (Seemann, 2014) and a modular and extensible implementation of the
152 Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) algorithm (RAST-TK) with the Seed
153 database (Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015) using PATRIC platform. For eliminating the
154 bias of the annotated genomes using PROKKA, test and reference genomes were all
155 submitted to the online platform RAST version 2.0.

156

157 **Genome comparison**

158 Comparative analysis was performed initially between SmUFMG85 and
159 SmCNPMS2112 genomes to determine the shared and unique features and to predict possible
160 gene clusters associated with biosynthesis of secondary metabolites using the program

161 antiSMASH bacterial version (Medema et al., 2011). Comparison between these genomes
162 with other 19 complete genome sequences of the *Serratia* genera bacteria deposited at NCBI
163 until April of 2017 (Table S1) was also performed. Eleven isolates associated with plants, *S.*
164 *fonticola* GS2, *S. plymuthica* S9, *S. plymuthica* 4Rx13, *S. plymuthica* S13, *S. plymuthica*
165 3Re418, *S. plymuthica* 3Rp8, *S. plymuthica* PRI2c, *S. liquefaciens* ATCC27592, *S.*
166 *proteamaculans* 568, *S. marcescens* RSC14, and *S. marcescens* B3R3; three clinical isolates,
167 *S. marcescens* SmUNAM836, *S. marcescens* SM39, and *S. marcescens* CAV1492; *S.*
168 *marcescens* DB11 isolated from insect; *S. marcescens* FGI94 an endosymbiont fungus; *S.*
169 *marcescens* WW4 isolated from machine biofilm; *S. ureilytica* Lr54 isolated from a water
170 geothermal spring; and *S. fonticola* DSM4576 isolated from water sample were selected. The
171 genomics characteristics of these strains are summarized in Table 1 and in Supplementary
172 Table S1.

174 **Phylogenomic analysis**

175 To compare all the *Serratia* genomes at the protein level, we used OrhtologSorter
176 (Farias & Almeida, 2013), a customized web search tool to list orthologous protein families
177 among the genomes. By making specific searches, e.g., selecting all families with exactly one
178 representative in each genome, except for the out-group genome of *Escherichia coli* (which
179 was allowed to have zero or one gene in each family), it was possible to build a phylogenetic
180 species tree. To construct the tree, MUSCLE (Edgar, 2004) was used to align each chosen
181 family. Then, we removed non-informative positions using Gblocks (Castresana, 2000). All
182 alignments were concatenated, and the resulting alignment was used as input of RAxML rapid
183 bootstrapping algorithm (Stamatakis, 2006) with PROTCATWAGF substitution model. A

184 matrix based on the MUMi genome distance index (Deloger, Karoui, & Petit, 2009) was used
185 by NEIGHBOR method (Felsenstein, 1989) for construct another tree considering diversity
186 criteria, such as average nucleotide identity and proportions of DNA shared by the two
187 genomes. All the tools described here and their results are available at
188 <http://jau.facom.ufms.br/serratiaUFMG/>.

189

190 **Pan-genome analysis**

191 From orthologous protein family analysis, we described the pan-genome of the clade
192 formed by SmUFMG85 and SmCNPMS2112 and other seven *S. marcescens* strains and one
193 *S. ureilytica* strain. The core genome comprised all common protein families of this clade, the
194 accessory genome comprised protein families present between the two or n-1 strains of this
195 clade, and singleton genes comprised genes present only in a single strain. Then, we assigned
196 the number of orthologous gene families in each COG (Clusters of Orthologous Groups of
197 proteins) category and predicted coding sequences (CDSs) for functions related with PGP and
198 virulence/pathogenicity. For this, we filtered a list of keywords to query within the group
199 classified as core, accessory, and singleton of the 10 genomes belonging to this clade.

200

201 **Circular map, mobilome, and synteny analysis**

202 We performed a multiple whole-genome alignment using the alignment algorithm
203 implemented in MAUVE (Darling, Mau, Blattner, & Perna, 2004) for gene synteny
204 investigation. Then, we constructed circular genome maps of SmUFMG85 and
205 SmCNPMS2112 genomes with other *Serratia* species belonging to the same clade of the
206 *Serratia* species of this study using the BLAST ring image generator (BRIG) version 0.95

207 software (Alikhan, Petty, Ben Zakour & Beatson, 2011). Circular genome maps were
208 generated using reference and query genome sequences in a set of concentric rings colored for
209 each genome. Regions of interest were re-annotated using RAST-TK pipeline. Circular
210 genome maps also included information on GC skew and GC content. Then, the IslandViewer
211 and Phast programs were used for detection of genomic island and putative phage sequences
212 in the annotated genomes (Zhou, Liang, Lynch, Dennis, & Wishart, 2011; Bertelli et al.,
213 2017), respectively. Moreover, we investigated clustered regularly interspaced short
214 palindromic repeat (CRISPR) arrays that were identified in genomes using the CRISPRFinder
215 tool (Grissa, Vergnaud, & Pourcel, 2007). Cas proteins and CRISPR-Cas types were
216 identified using the CRISPR-Cas classification system developed by Makarova et al. (2015).
217 The spacers found in the CRISPR arrays were compared using an in-house Perl script
218 described by Medeiros et al. (2017) available on [https://github.com/big-](https://github.com/big-cpqr/scripts/blob/master/compare_spacer.pl)
219 [cpqr/scripts/blob/master/compare_spacer.pl](https://github.com/big-cpqr/scripts/blob/master/compare_spacer.pl). All the spacers were searched for their similarity
220 to other sequences in GenBank nucleotide sequence database using BLASTN (with the word
221 size of 7). Matches were considered significant if they exhibited coverage of 100% and
222 identity higher than 90%.

223

224 **Results**

225 **Overview of the SmCNPMS2112 and SmUFMG85 genomes**

226 The characteristics of the draft genomes sequenced in this study are summarized in
227 Table 1. The genomes of SmCNPMS2112 and SmUFMG85 comprised 5.28 Mbp and 5.22
228 Mbp, respectively. The GC content was 59.49% for SmCNPMS2112 and 59.22% for
229 SmUFMG85. After CDSs prediction and annotation using RAST, we obtained 5105 and 5166

230 CDSs from SmCNPMS2112 and SmUFMG85, respectively. From these CDSs, 4256 and
231 4203 putative genes with assigned functions were detected in SmCNPMS2112 and
232 SmUFMG85, respectively. According to the functional categories defined by RAST, we
233 clearly observed proximity of the CDSs number present in the both genomes in different
234 functional categories (Figure 1A). Cellular functioning categories presented a higher number
235 of CDSs, such as those related to carbohydrates as well as amino acids and derivatives.

236 Although these two genomes exhibited a very similar functional profile, there were
237 some unique characteristics in each genome, e.g., 652 proteins of SmCNPMS2112 and 614
238 proteins of SmUFMG85 (Figure 1B; Table S2). In the SmCNPMS2112 genome, important
239 proteins related to aromatic hydrocarbons degradation, such as protocatechuate 3,4-
240 dioxygenase alpha and beta chains, *p*-hydroxybenzoate hydroxylase, 4-hydroxybenzoate
241 transporter PcaK, and phenolic acid decarboxylase subunit C and D; arsenic detoxification
242 genes such as arsenate reductase and arsenical pump membrane protein; endoglucanase and
243 chitinase, which perform the degradation of plant polymers and fungi wall, respectively, were
244 identified. As for the SmUFMG85 genome, proteins related to oxalic acid assimilation and
245 rhamnolipid biosynthesis were identified (Table S2).

246 In both genomes, several features related to Fe uptake receptors, transport system, and
247 siderophores were observed, such as ferri-bacillibactin (in SmCNPMS2112) and vibriobactin
248 and catecholate (in SmUFMG85). Also, these genomes had T1SS, T2SS, and T6SS, whereas
249 T3SS was detected only in SmCNPMS2112 genome and T4SS in SmUFMG85. Another
250 important function found in both genomes was defense mechanisms, such as is bacteriocin
251 production, multidrug resistance, antibiotic resistance, efflux pump, and hemolysin expression
252 (Table S2).

253 Additionally, we characterized the CRISPR-Cas system in both genomes (Figure
254 1C). Based on their architecture, SmUFMG2112 genome harbored CRISPR-Cas Type I-E, in
255 which the Cas operon was composed of *cas3*, *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1*, and *cas2*. We
256 identified a repeat sequence that was conserved in all three CRISPR arrays. Array 1 had 35
257 spacers, followed by array 2 with 45 spacers, and array 3 with 21 spacers. The genome of
258 SmUFMG85 had two CRISPR arrays, but it was not possible to recover the *cas* operon. The
259 repeats of array 1 were different from the repeats of array 2. However, the repeats of array 2
260 were shared among the SmUFMG85 and SmUFMG2112 genomes. Array 1 had five spacers,
261 whereas array 2 had 44 spacers. We observed that they were not shared by the genomes
262 and the major targets, including regions of prophage, were sequences from other *Serratia* sp.
263 genomes. We also observed spacers targeting the *Serratia* phage Eta (KC460990.1). *S.*
264 *marcescens* SmUFMG2112 had one spacer targeting plasmids found in *Klebsiella*
265 *pneumoniae* and *E. coli* KPC.

266 Another important finding was the wide range of genes related to secondary
267 metabolites present in the genomes (Table S2). Most secondary metabolite CDSs were shared
268 with other *Serratia* genomes (Table 2), e.g., siderophore molecules, such as enterobactin,
269 aerobactin, enterochelin, and bacterioferritin. Moreover, bacteriocins, such as colicin, and
270 antibiotics, such as gramicidin, tyrocidine, and surfactin, were found only in the *S.*
271 *marcescens* RSC14 genome (Table S3), and a feature for rhamnolipid biosynthesis was found
272 only in the SmUFMG85 genome. Also, all the genomes evaluated showed features for the
273 production of acetoin, phytohormone (such as indole acetic acid), virulence factors (such as
274 serralyisin and hemolysin), and some organic acids, vitamin K, polyketides, and polyaromatic
275 hydrocarbon catabolism as well as molecules for biofilm dispersion. Biosynthetic gene

276 clusters (BGCs) also related to the production of secondary metabolites were identified using
277 the antiSMASH tool (Figure 2). We found 30 BGCs in the SmCNPMS2112 genome and 27 in
278 the SmUFMG85 genome. Of these, 18 were shared between genomes, three of which were
279 associated with fatty acids, such as a lipodepsipeptide (taxllaid), and other two BGCs were
280 associated with unknown functions; two clusters were associated with saccharide
281 biosynthesis, including capsular polysaccharide and LPS; and one was a thiopeptide cluster
282 (sulfur-rich peptides). Moreover, 12 putative clusters for biosynthesis of several molecules,
283 such as polysaccharide B, β -carboline alkaloid (marinacarboline), O&K antigen macrolides
284 (PM10017/PM100118), vitamin K2 (menaquinone), bacillomycin, and six more clusters were
285 not identified.

286 Nine BGCs singletons of SmUFMG85 were found, of which three were associated
287 with nonribosomal peptides (NRPs), including the siderophore turnerbactin (a cluster of the
288 type I polyketide synthase enzyme) and other unidentified BGCs. Other BGCs were
289 associated with small lipid molecules biosynthesis, such as homoserine lactone, another
290 cluster that was not classified, and four putative clusters. With respect to BGC singletons of
291 SmCNPMS2112, four were associated with NRPs, including synthesis of the siderophores
292 turnerbactin and enterobactin and the antibiotic xantholipin, with other unknown BGCs.
293 Furthermore, this genome harbored eight putative clusters related to the synthesis of the
294 antibiotic lankacidin, O-antigen, O&K-antigen, prodigiosin, and four unknown clusters.

295

296 **Comparative and phylogenetic analysis of the bacteria of *Serratia* genus**

297 The core genome of the 21 species of *Serratia* comprises 2658 families of orthologous
298 proteins that correspond to 40.05% of the pan-genome (Figure 3A). There was a variation in

299 the number of singleton (unique) among the genomes, with 41 in the *S. plymuthica* (3Re418)
300 genome and up to 556 in the *S. fonticola* (GS2) genome. Two phylogenetic trees were
301 constructed; the first tree was constructed using comparison of the whole genome, and the
302 second tree was constructed based only on the orthologous gene families shared by the
303 genomes (a total of 2658 families). Interestingly, both trees showed a very similar topology
304 (Figures 3B and 3C). We observed clade formation comprising all species of *S. marcescens*
305 and *S. ureilytica*, except for *S. marcescens* FGI94. A second clade comprised *S. plymuthica*, *S.*
306 *liquefaciens*, and *S. proteamaculans*, and another clade comprised *S. fonticola*.

307 From the clade comprising the most numbers of *S. marcescens* (nine *S. marcescens*)
308 and one *S. ureilytica* specie (Figures 3 B and 3 C), we sought to investigate the functions
309 present in the genomes according to host/habitat or lifestyle. This clade included four plant-
310 isolated bacteria (*S. marcescens*: CNPMS2112, UFMG85, RSC14, and B3R3), three clinical
311 isolates (*S. marcescens*: CAV1492, SM39, and SmUNAM836), an isolate from geothermal
312 spring water (*S. ureilytica*), an isolate from an insect (*S. marcescens* DB11), and an isolate
313 from machine biofilm (*S. marcescens* WW4). Functional analysis was performed using COG
314 categories within each level of the pan-genome, viz., core, accessory, and singletons (unique
315 genes) (Figure 4). As expected, the core genome comprised most CDSs related to basal
316 cellular functioning, such as E: amino acid transport and metabolism; R: general function
317 prediction only; G: carbohydrate transport and metabolism; K: transcription; and J:
318 translation, ribosomal structure, and biogenesis. The highest number of accessory genes were
319 found for the transcription (K) category, followed by mobilome [prophages and transposons]
320 (B), in which the highlighted genomes were *S. marcescens* CAV1492, *S. ureilytica* Lr54, *S.*
321 *marcescens* SmCNPMS2112, *S. marcescens* SmUFMG85, and *S. marcescens* B3R3. With

322 respect to singletons, the function unknown category (S) presented the highest values,
323 particularly for the genomes of *S. marcescens* B3R3, *S. marcescens* CAV1492, and *S.*
324 *marcescens* SmUFMG85, followed by the transcription (K) category of the *S. marcescens*
325 CAV1492 genome. The genome CAV1492 was also distinct for the singletons of the defense
326 mechanisms (V) category, including β -lactamases SHV-2 and OXA-1, carbapenem-
327 hydrolyzing β -lactamase KPC, multidrug transporter EmrE, and cation efflux system protein
328 CusB. Moreover, this genome showed a high number of singletons for other categories, such
329 as M: cell wall/membrane/envelope biogenesis; Q: secondary metabolite biosynthesis,
330 transport, and catabolism; and L: replication, recombination, and repair. For the U category
331 (intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport), *S. marcescens* CAV1492 and
332 SmCNPMS2112 were distinct for the higher proportion of singletons. Singletons for category
333 B included genes of transposase Tn916, three putative prophage CPS-53 integrase, DNA
334 primase TraC, PI protein, and 20 hypothetical proteins for *S. marcescens* CAV1492 genome.
335 SmUFMG85 only presented hypothetical proteins in the singleton for this category as well as
336 *S. marcescens* B3R3 that also presented more than 20 hypothetical proteins.

337 **PGP factors and pathogenesis within *Serratia* pan-genome with different lifestyles**

338 From trait analysis related to PGP factors and virulence/resistance within the *Serratia*
339 pan-genome with different lifestyles, we verified that for all evaluated functions, the genomes
340 shared several proteins (Table 2 and Table S3), regardless of their isolation origin. The
341 functions related to a higher number of shared proteins were cell motility and adhesion, Fe
342 uptake, and P metabolism. These genomes harbor many proteins for the formation of flagella
343 and chemotaxis. Siderophores as enterobactin, aerobactin, and bacterioferritin were detected

344 in all genomes. For P metabolism, high-affinity P transport system and the enzymes, alkaline
345 and acid phosphatases, associated to the mineralization of organic P were highlighted.

346 Furthermore, we observed that some functions for plant colonization (endophytic
347 competence), such as degradation of plant polymer and ROS detoxification, or for PGP, such
348 as production of phytohormone and volatile organic compounds (VOCs), were found in all
349 genomes. As for the accessory and singleton features of the genomes, there was not a strong
350 correlation with the isolation source. However, features such as secretion system and drug
351 resistance showed a high number of accessory/singletons proteins, e.g., some proteins of
352 T2SS that were not found in the SmUFMG85, *S. marcescens* DB11, and *S. marcescens* WW4
353 genomes. Proteins related to T4SS were found only in the SmUFMG85 and CAV1492
354 genomes, whereas proteins related to T3SS were detected only in the SmCNPMS2112
355 genome. However, all the genomes showed resistance genes to some antibiotics, such as
356 streptomycin, tetracycline, phenazine, fosfomicin, and chloramphenicol, and other genes
357 related to resistance to several antibiotics belonging to the groups of aminoglycosides,
358 quinolones, fluoroquinolones, macrolides, and β -lactams. With respect to β -lactams, only *S.*
359 *marcescens* CAV1492 showed carbapenem resistance. Organic acid production was also
360 shared by all genomes, but only the SmUFMG85 and SmCNPMS2112 genomes harbored a
361 couple of enzymes related to ketogluconate production, and only SmUFMG85 harbored
362 enzymes related to oxalate metabolism. Finally, other functions related to competition
363 capacity were detected in all genomes, such as production of LPS and bacteriocins, antibiotic
364 resistance, efflux pump, and virulence factors.

365 **Comparison of SmUFMG85 and SmCNPMS2112 with other *Serratia* genomes**

366 Accessory and singleton region distribution of *S. marcescens* (SmUFMG85 and
367 SmCNPMS2112) isolated from maize aligned to the genomes of other *Serratia* species from
368 different habitats is shown in the ring graphics (Figure 5 A, B). It was also possible to
369 visualize the distribution of the mobilome of these two genomes. In general, the regions of
370 singletons (unique features) and accessory (not shared by all genomes) were located in
371 genomic islands. In the SmUFMG85 genome, 27 genomic islands were detected, of these nine
372 were present on accessory or singleton regions. Moreover, these genomic islands also
373 contained integrase, transposase, and four prophages. We also located genes related to ability
374 of vegetable tissue colonization, such as production of extracellular protease and fimbriae
375 (Figure 5A), in addition to features related to PGP and competition ability, such as
376 rhamnolipid production and cyanate transport. An operon for Fe acquisition, localized on the
377 accessory region, was also shared by *S. marcescens* RSC14 (isolated from plant) and *S.*
378 *ureilytica* (isolated from geothermal spring water). Genes related to the conjugation system
379 also were detected in this genome, including VirB operon and conjugal transfer protein TraA.
380 Proteins related to T1SS and some virulence factors, such as hemolysin, lipoprotein Wza
381 required for capsular polysaccharide translocation, tripartite multidrug resistance system, and
382 toxin–antitoxin system, were also observed.

383 The SmCNPMS2112 genome showed a total of 28 genomic islands, 16 of which also
384 harbored genes from both accessory and singleton regions and two of which corresponded to
385 prophage (Figure 5B). In the genomic island regions, several proteins related to T2SS, T3SS,
386 and T4SS were found. Furthermore, features for vegetable tissue colonization, such as
387 production of fimbriae, extracellular protease, and proteins linked to biofilm formation, as
388 well as features related to PGP, such as Fe uptake proteins, the siderophore aerobactin, and

389 proteins of ketogluconate metabolism, were detected. Proteins for bacterial competition and
390 adaptation capacity, such as colicin production, benzoate transporter, aromatic hydrocarbon
391 utilization transcriptional regulator, mannose resistant fimbriae, and chitinase and chitin
392 binding protein, were also found in this genome as well as other genes related to virulence
393 potential, highlighting genes for β -lactamase class C metabolism, drug/metabolite transporter
394 superfamily, and YpjF toxin.

395 According to the whole-genome multiple alignment of the two *S. marcescens* strains
396 of this study with other eight strains of this genus (Figure S1), we observed that there was a
397 variation in the organization of the conserved gene blocks among the genomes, with the
398 highest differences detected between *S. marcescens* WW4 and *S. ureilytica*. However, among
399 the species of *S. marcescens*, some genomes with large inverted gene blocks were also
400 observed, such as in the comparison between *S. marcescens* RSC14 and *S. marcescens* B3R3,
401 between *S. marcescens* SM39 and *S. marcescens* CAV1492, and between *S. marcescens*
402 CAV1492 and *S. marcescens* SmUNAM836. However, more similar gene organizations were
403 detected between the genomes of SmUNAM836 and *S. marcescens* DB11, followed by the
404 genomes of CNPMS2112 and *S. marcescens* UFMG85.

405

406 Discussion

407 We verified that although the profile of functional categories was very similar for both
408 the *S. marcescens* (SmUFMG85 and SmCNPMS2112) of this study (Figure 1A), some studies
409 have reported a high genotypic diversity of bacterial populations at the level of sequence
410 similarity among the shared genes and at the level of genetic content (Cordero & Polz, 2014).
411 In fact, in this study, at the level of exclusive functions, we detected some genes in each

412 genome, thus, reinforcing the importance of studying different strains from the same niche.
413 For example, in the SmCNPMS2112 genome, exclusive features related to the use of aromatic
414 hydrocarbons and arsenic were found (Table S2) in addition to the presence of the enzymes
415 chitinases and endoglucanases. All these characteristics may confer the ability to colonize
416 poor environments on readily available carbon sources as well as the ability to antagonize
417 fungi and to degrade plant polymers. In the SmUFMG85 genome, the enzyme oxalate
418 decarboxylase OxdC, associated with catabolism of oxalic acid, was found (Table S2). The
419 role of this enzyme is not yet fully understood, but studies with *Bacillus subtilis* have
420 suggested that it acts in protecting bacterial cells against low pH stress by consuming protons
421 during decarboxylation of oxalic acid (Tanner & Bornemann, 2000; MacLellan, Helmann, &
422 Antelmann, 2009). Because oxalic acid is one of the acids produced during rock phosphate
423 solubilization (Silva et al., 2014), the presence of this enzyme in the genome of SmUFMG85
424 can constitute a mechanism of adaptation to the conditions that require high activity showed
425 by this isolate in *in vitro* rock phosphate solubilization assays (unpublished data). Thus, the
426 expansion of the traditional concept of microbial population to ecological populations of
427 microorganisms in which the group structure exhibits a strong correlation with the ecological
428 differentiation has been suggested, although they present a variation among populations much
429 larger than those observed within the populations (Thompson et al., 2005; Kettler et al., 2007;
430 Fraser, Alm, Polz, Spratt, & Hanage, 2009; Cordero & Polz, 2014).

431 Another important finding of this study is the presence of the CRISPR system in the *S.*
432 *marcescens* genomes, with two arrays in SmUFMG85 and three arrays in SmCNPMS2112
433 (Figure S3). CRISPR and Cas enzyme constitute an adaptive immune system that protects the
434 bacterium from exogenous DNA of bacteriophages and plasmids (Hynes, Villion, & Moineau,

435 2014). CRISPR-Cas Type I–E system found in the genome of SmUFMG2112 is also one of
436 the most detected in Enterobacteriaceae (Medina-Aparicio, Dávila, Rebollar-Flores, Calva, &
437 Hernández-Lucas, 2018). The absence of *cas* operon in the genome of *S. marcescens*
438 SmUFMG85 may indicate that this system is not active in this bacterium as Cas proteins are
439 essential for the different stages of CRISPR activity (Makarova et al., 2015). A possible
440 explanation for the acquisition of CRISPR array is through horizontal gene transfer
441 (Chakraborty et al., 2010; Makarova et al., 2015). The spacer repertoire present in the genome
442 of SmUFMG2112 indicates that this bacterium is protected against the prophage integrated in
443 other *Serratia* sp. genomes. Furthermore, spacer-targeting plasmids from *K. pneumoniae* and
444 *E. coli* KPC are an evidence that SmUFMG2112 is immune against transfer of blaKPC-
445 harboring plasmids, which is a safer strain. This finding can favor their use as an inoculant to
446 promote maize growth.

447 Furthermore, the use of the antiSMASH tool allowed the identification of BGCs
448 associated with the biosynthesis of secondary metabolites of *Serratia* species (Figure 2).
449 SmCNPMS2112 and SmUFMG85 shared gene clusters associated with dependent or
450 independent ribosome bioactive molecule synthesis (Just-Baringo, Albericio, & Álvarez,
451 2014), such as the antibiotics macrolides and bacillomycin and some
452 polysaccharides. SmCNPMS2112 presented singleton BGCs associated with NRPs, such as
453 the siderophores enterobactin and antibiotic xantholipin. The siderophore turnerbactin was
454 found in both genomes. NRPs are molecules usually related to toxins, antibiotics,
455 bacteriocins, biosurfactants, siderophores, and pigments (Finking et al., 2004). These are
456 assembled by peptide synthetase enzymes, wherein the combination of different modules and

457 functional domains of this enzyme determine the structure and activity of the peptide product
458 (Neilan et al., 1999; Martínez-Núñez & López, 2016).

459 Moreover, based on singleton BGCs, SmUFMG85 harbored a cluster of homoserine
460 lactone (AHL) synthesis genes that be associated with quorum sensing control (Van Houdt,
461 Moons, Buj, & Michiels, 2006), which may contribute the plant to exhibit resistance against
462 pathogens (Klein, Von Rad, & Durner, 2009). For example, it has been reported that the
463 increased systemic resistance against tomato leaf pathogens was promoted by AHL released
464 in the rhizosphere by *S. liquefaciens* MG1 and *Pseudomonas putida* (Schuhegger et al., 2006).
465 SmCNPMS2112 harbors a cluster of prodigiosin synthesis genes (which confers the colonies
466 of this bacterium a reddish coloration) that exhibit antifungal, antibacterial,
467 immunosuppressive, and anti-proliferative activities (Khanafari, Assadi, & Fakhr, 2006;
468 Darshan et al., 2016), which was not observed in SmUFMG85. The gene cluster for this
469 pigment was also found in *Serratia* sp. strain ATCC 39006, a model bacterium for the
470 biosynthesis of prodigiosin (Fineran et al., 2013) and in *S. marcescens* FS14 and WW4
471 (Chung et al., 2013; Li et al., 2015).

472 According to analysis of orthologous protein families between the 21 strains of
473 *Serratia* with different lifestyles, we observed that microbial genome size undergoes the effect
474 of gene loss and gain (Figure 3 A). Bacteria in a high-diversity environment have a tendency
475 for gene-gain events, whereas some functions may become ineffective and eventually be lost
476 in the bacteria thriving in environments with few environmental fluctuations (Rouli, Merhej,
477 Fournier, & Raoult, 2015). Interestingly, we verified a very similar topology in the group
478 formation of both phylogenetic trees constructed with whole genome or only with core

479 genome (Figures 3 B and 3 C), indicating that the accessory part of the whole genome of
480 these bacteria does not contribute to any differentiation at the phylogenetic level.

481 We also observed a significant number of shared proteins for functions related to
482 endophytic or pathogenic niche in the genomes, independent of their lifestyle (Table 2). One
483 possible explanation for the high similarity among the phylogeny of the total and core genome
484 as well as to the large number of shared functions independent of their niche can be due the
485 important contribution of many of these features for both endophytic lifestyle and pathogenic.
486 For instance, functions that confer high competitive ability, such as Fe acquisition, adhesion,
487 cell motility, ROS detoxification, functions related to antibiotic resistance, and efflux pumps
488 are crucial for both endophytes and pathogenic microorganisms for competition with others
489 microbes and for host colonization (Letoffe, Ghigo, & Wandersman, 1994; Wiles, Kulesus, &
490 Mulvey, 2008; Taghavi et al., 2010; Ali, Duan, Charles, & Glick, 2014; Lòpez-Fernàndez et
491 al., 2015). Comparative genomics of clinical and environmental isolates of *P. aeruginosa* also
492 presented a high degree of genomic conservation among isolates of these different
493 environments (Grosso-Becerra et al., 2014). According to authors, this low genomic
494 variability could be explained if clinical strains constitute a subpopulation of this bacterial
495 species, which preferentially exhibit virulence due to their proximity to human populations.
496 Moreover, pathogenicity factor genes were also found in the core genomes of several
497 Enterobacteriaceae, which are human or plant pathogens, beneficial strains, and pathogens
498 isolated from different environments (Lòpez-Fernàndez et al., 2015; Chaudhry and Patil,
499 2016; Xie et al., 2016). However, there are some more specific characteristics linked with
500 their niches, such as phytohormone and VOCs production and degradation of plant polymer,
501 for endophytic or virulence factor-related pathogenic bacteria. Although these characteristics

502 are present in all genomes, they can undergo gene expression regulation effects as other
503 studies have pointed out the existence of a balanced antagonism wherein bacteria adapted to
504 the host can play different roles depending on their relationship with it (Schulz, Römmert,
505 Dammann, Aust, Strack, 1999; Lòpez-Fernàndez et al., 2015). For example, strains of *S.*
506 *marcescens* associated with cucurbit yellow vine disease showed proximity to rice endophyte
507 strains of this species. It has been suggested that phytopathogenic strains could have evolved
508 from the endophyte–plant relationships. So, it can be inferred a close relationship between
509 antagonistic and beneficial balance of the bacteria associated with plants (Besler & Little,
510 2017). Furthermore, we observed existence of a high number of singleton and accessory
511 proteins for transcription category (Figure 4), suggesting a possible variation in the gene
512 expression regulation between these genomes. We also verified that most of the singleton
513 regions for all genomes were annotated as unknown function (Figure 4), probably owing to
514 the limited reference database. This fact also makes it difficult to assign correlation to the
515 isolation source and to the functions observed in the bacterial genome.

516 Comparison of synteny variations among *Serratia* belonging to the clade composed of
517 nine *S. marcescens* species and one *S. ureilytica* was performed in this study by whole-
518 genome multiple alignment with Mauve program (Figure S1). Organization of the genes along
519 the genomes is subjected to event such as gene loss, acquisition by duplication or horizontal
520 transfers, and transposition. Gene position is important because it determines its expression
521 level and evolution in the bacterial population (Junier & Rivoire, 2013). The highest
522 difference in synteny detected between *S. marcescens* WW4 and *S. ureilytica* was expected,
523 considering that there is a lower stability of genomic organization in less related species
524 (Koonin & Wolf, 2008). In view of this fact, it can also be suggested that the strains

525 SmUNAM836 and *S. marcescens* DB11, followed by SmCNPMS2112 and SmUFMG85, are
526 more evolutionarily related as they present higher proximity synteny. However, the
527 organization of conserved genes in *S. marcescens* CAV1492 differed more than the
528 organization of the *S. marcescens* strains, suggesting that this genome has high variation rates
529 due to recombination over different chromosomal regions (Lawrence, 2003).

530 Pan-genome analysis of *Serratia* species provides a glimpse into the evolution and
531 diversity of this genera traced by detection of the core (conserved), accessory (dispensable),
532 and singleton (strain-specific) functions compared to the strains of different lifestyles. In
533 relation to the analysis of the clade formed by nine *S. marcescens* species and one *S.*
534 *ureilytica* (Figures 3 B and 3 C), accessory regions assigning function were distinct than those
535 related to secretion systems and drug resistance with a high CDS number (Table 2).

536 With respect to secretion systems, we observed that T4SS was found only in *S.*
537 *marcescens* SmUFMG85 and *S. marcescens* CAV1492 genomes and T3SS was found only *S.*
538 *marcescens* SmCNPMS2112. T4SS has the function of DNA and protein translocation
539 through the bacterial membrane usually on contact with the target cell and is primarily
540 involved in the conjugation process or effector translocator system (Christie, Whitaker &
541 González-Rivera, 2014). In this study, for example, we detected both features, the IncN group
542 plasmid involved in conjugation and VirB operon in the SmUFMG85 genome (Figure 5 A).
543 T3SS plays a role in bacterial communication with different organisms, such as plants and
544 animals. Both commensal and pathogenic bacteria express T3SS (Puhar & Sansonetti, 2014).
545 However, the type of effector proteins secreted by this system are distinct among symbiotics
546 and pathogens of plant or animal (Nakano, Iwadate, Umeyama, & Taguchi, 2014). For
547 instance, when bacteria use T3SS to inject effector molecules into susceptible plant cells,

548 detection of bacterial components activates a protective immune response, promoting target
549 cell survival. These effectors alternate cell physiology and act on the patterns of gene
550 expression. Depending on the defense mechanisms of plant or bacterial virulence, the
551 infection may or may not progress into a disease (Puhar & Sansonetti, 2014). As in many
552 other studies, we also detected a broad spectrum of antimicrobial resistance genes in the
553 *Serratia* genome (Iguchi et al., 2014; Vicente et al., 2012, 2016). Given the well-known,
554 widespread indiscriminate use of antibiotics, this high resistance exhibited by the bacteria
555 isolated from different sources can be associated with response to such selection mechanisms
556 (Ventola, 2015).

557 We found a high number of accessory regions and singletons in the genomic islands of
558 SmUFMG85 (Figure 5 A) and SmCNPMS2112 (Figure 5 B), indicating that these functions
559 are a result of horizontal gene transfer. Singletons have been usually associated with genomic
560 islands/mobilome in other genomes (Coleman et al., 2006; Basharat et al. 2016). These
561 islands are usually reported as carriers of a wide variety of functions, such as antibiotic
562 resistance, virulence factors, and fitness genes as well as catabolic enzymes that contribute to
563 metabolic and physiological adaptation (Hacker & Kaper, 2000). In this study, genomic
564 islands of SmUFMG85 showed features related to vegetable tissue colonization, conjugation,
565 Fe acquisition, rhamnolipid production, virulence potential as toxin–antitoxin system,
566 hemolysin, lipoprotein Wza of capsular polysaccharide translocation, and tripartite multidrug
567 resistance system. In genomic islands of SmCNPMS2112, we also found proteins related to
568 vegetable tissue colonization, Fe acquisition, chitinase and bacteriocin (colicin) production,
569 and virulence in addition to T2SS, T3SS, and T6SS. T6SS, when compared to other systems,
570 is the most recently discovered and is found widely in Gram-negative bacteria (Mougous et

571 al., 2006; Pukatzki et al., 2006). T6SS is present in both commensal and pathogenic bacteria
572 of plants, suggesting that this system is not restricted to virulence but can also offer fitness
573 advantages and plant colonization (Bernal, Allsopp, Filloux & Llamas, 2017). In relation to
574 T2SS, attention was focused on pathogenic bacteria; however, it has now also been detected
575 in non-pathogenic bacteria or bacteria that rarely cause diseases, for example, *Azoarcus*,
576 *Bradyrhizobium*, *Chromobacterium*, *Mesorhizobium*, *Caulobacter*, *Gluconacetobacter*,
577 *Marinobacter*, *Methylococcus*, *Pseudoalteromonas*, and *Pseudomonas* (Cianciotto & White,
578 2017). Of these bacteria, there are some that establish symbiotic relationships with plants,
579 whereas others inhabit soil, fresh water, and/or salt water (Arrieta et al., 2004; Evans, Egan,
580 & Kjelleberg, 2008; Le Blastier et al., 2010).

581 In conclusion, according to comparative genomic analysis of the *Serratia* genus, we
582 observed that there was a high conserved proportion in both the genomes of genes related to
583 colonization, PGP, and pathogenicity. Thus, we suggest that the differences taken into
584 account to define a given lifestyle among the *Serratia* species evaluated in this study are
585 probably more related to variations in gene expression than to genome content *per se*.
586 However, many proteins in singleton regions of these genomes could not be compared owing
587 to their annotation to unknown functions in the reference databases. In addition, we have
588 verified the importance of the mobilome of SmUFMG85 and SmCNPMS2112, particularly
589 those associated with genomic islands, for the acquisition of several functions that confer
590 adaptive fitness to the host plant as well as to other environments. These results helped to
591 better understand the adaptation of genomes to specific ecological niches by comparing
592 species from other environments. Moreover, the study helps to provide a more precise and

593 broad view on the search of bacterial strain candidates for the development of bioinoculants in
594 sustainable agriculture models.

595

596 **Conflicts of interest**

597 The authors have no conflicts of interest to declare.

598 **Funding**

599 This work was supported by the agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
600 Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
601 (CNPq) grants N° 477349/2013-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas
602 Gerais (FAPEMIG) grants N° APQ-01819-13, and Pró-Reitoria de Pesquisa of UFMG for
603 financial support.

604 **Author's contributions**

605 UCS, DRCS, CAO, and VLS: designed the work and selected the microbial samples.

606 UCS, LRL, EBF, WLC, LMM, NFA, SRS, and JDM: performed genome comparison
607 analysis.

608 UCS, EBF, WLC, LMM, NFA, CAO, and VLS: interpreted the findings.

609 UCS, LMM, CAO, VLS, and JDM: wrote the paper.

610 DRCS, LRL, EBF, WLC, LMM, NFA, and CAO: contributed to additional interpretations
611 and general manuscript comments.

612 **Data Accessibility**

613 The sequences of the genome were deposited in GenBank under BioProject Accession
614 PRJNA517540

615 **Reference**

- 616 Abbas, H. A. & Hegazy, W. A. (2017). Targeting the virulence factors of *Serratia*
617 *marcescens* by ambroxol. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 76, 27-32.
- 618 Ali, S., Duan, J., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). A bioinformatics approach to
619 the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *Journal*
620 *theoretical biology*, 343, 193-198. doi:10.1016/j.jtbi.2013.10.007
- 621 Alikhan, N. F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., & Beatson, S. A. (2011). BLAST
622 Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* , 12,
623 402. doi: 10.1186/1471-2164-12-402
- 624 Arrieta, J. G., Sotolongo, M., Menendez, C., Alfonso, D., Trujillo, L.E., Soto, M.,
625 Ramirez, R., & Hernandez, L. (2004). A type II protein secretory pathway required for
626 levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology*, 186,
627 5031–5039. doi: 10.1128/JB.186.15.5031-5039.2004
- 628 Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Dis. Z. T., Edwards, R. A. ...
629 Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology.
630 *BMC Genomics*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- 631 Basharat, Z., & Yasmin, A. (2016). Pan-genome Analysis of the Genus *Serratia*. *arXiv*
632 *preprint arXiv:1610.04160*.
- 633 Barboza, N. R., Morais, M. M., Queiroz, P. S., Amorim, S. S., Guerra-Sá, R., & Leão,
634 V. A. (2017). High Manganese Tolerance and Biooxidation Ability of *Serratia marcescens*
635 Isolated from Manganese Mine Water in Minas Gerais, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 8,
636 1946. doi: 10.3389/fmicb.2017.01946
- 637 Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., & Llamas, M. A. (2017). The *Pseudomonas*
638 *putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME journal*, 11, 972. doi:
639 10.1038/ismej.2016.169
- 640 Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Simon, F., Lau, B. Y., Hoad, G., ...
641 Brinkman, F. S. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-
642 scale datasets. *Nucleic Acids Research*, 45, W30-W35. doi: 10.1093/nar/gkx343
- 643 Besler, K. R., & Little, E. L. (2017). Diversity of *Serratia marcescens* Strains
644 Associated with Cucurbit Yellow Vine Disease in Georgia. *Plant disease*, 101, 129-136.
645 <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0618-RE>
- 646 Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth
647 promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4, 343-350.
648 doi:10.1016/S1369-5266(00)00183-7
- 649 Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., ... & Shukla,
650 M. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for
651 building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*,
652 5, srep08365. doi:10.1038/srep08365
- 653 Capdevila, S., Martínez-Granero, F. M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., &
654 Martín, M. (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar
655 filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology*, 150, 3889-
656 3897. 10.1099/mic.0.27362-0
- 657 Castresana J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their
658 use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 540-552. doi:
659 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334

- 660 Cianciotto, N. P., & White, R. C. (2017). The Expanding Role of Type II Secretion in
661 Bacterial Pathogenesis and Beyond. *Infection and immunity*, IAI-00014.
662 doi:10.1128/IAI.00014-17
- 663 Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., & Chakraborty, A. P. (2010). Influence of
664 *Serratia marcescens* TRS-1 on growth promotion and induction of resistance in *Camellia*
665 *sinensis* against *Fomes lamaoensis*. *Journal of Plant Interactions*, 5, 261-272.
666 doi.org/10.1080/17429140903551738
- 667 Chaudhry, V., & Patil, P. B. (2016). Genomic investigation reveals evolution and
668 lifestyle adaptation of endophytic *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific Reports*, 6, 19263.
669 doi: 10.1038/srep19263
- 670 Christie, P. J., Whitaker, N., & González-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure
671 of the bacterial type IV secretion systems. *Biochemistry et Biophysic Acta (BBA)-Molecular*
672 *Cell Research*, 1843, 1578-1591. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.019
- 673 Chung, W. C., Chen, L. L., Lo, W. S., Kuo, P. A., Tu, J., & Kuo, C. H. (2013).
674 Complete genome sequence of *Serratia marcescens* WW4. *Genome announcements*, 1,
675 e00126-13. doi: 10.1128/genomeA.00126-13
- 676 Coil D, Jospin G, & Darling AE (2014) A5-miseq: an updated pipeline to assemble
677 microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31, 587-589. doi:
678 10.1093/bioinformatics/btu661.
- 679 Coleman M. L., Sullivan M. B., Martiny A. C., Steglich C., Barry K., DeLong E. F., &
680 Chisholm, S. W. (2006). Genomic islands and the ecology and evolution of Prochlorococcus.
681 *Science*, 311, 1768–1770. doi:10.1126/science.1122050
- 682 Cordero, O. X., & Polz, M. F. (2014). Explaining microbial genomic diversity in light
683 of evolutionary ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 263-273. doi:
684 10.1038/nrmicro3218
- 685 Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple
686 alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*. 14, 1394–
687 1403. doi: 10.1101/gr.2289704
- 688 Darshan, N., & Manonmani, H. K. (2016). Prodigiosin inhibits motility and activates
689 bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. *AMB Express*,
690 6, 50. doi: 10.1186/s13568-016-0222-z
- 691 Devi, K. A., Pandey, P., & Sharma, G. D. (2016). Plant Growth-Promoting Endophyte
692 *Serratia marcescens* AL2-16 Enhances the Growth of *Achyranthes aspera* L., a Medicinal
693 Plant. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23, 173-180. doi: 10.1016/j.hjb.2016.12.006
- 694 Deloger, M, Karoui, M. E., & Petit, M. A. (2009). A genomic distance based on MUM
695 indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *Journal of Bacteriology*,
696 191, 91099. doi:10.1128/JB.01202-08
- 697 Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and
698 high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32,1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- 699 Evans, F. F., Egan, S., & Kjelleberg, S. (2008). Ecology of type II secretion in marine
700 gammaproteobacteria. *Environmental microbiology*, 10, 1101-1107. doi: 10.1111/j.1462-
701 2920.2007.01545.x
- 702 Farias, N. C., & Almeida, N. F. (2013) Orthologsorter: inferring genotyping and
703 functionality from ortholog protein families. Campo Grande, Brazil: Federal University of
704 Mato Grosso do Sul.

- 705 Felsenstein, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2).
706 *Cladistics*, 5, 164-166.
- 707 Fineran, P. C., Cans, M. C. I., Ramsay, J. P., Wilf, N. M., Cossyleon, D., McNeil, M.
708 B., ... & Brügger, K. (2013). Draft genome sequence of *Serratia* sp. strain ATCC 39006, a
709 model bacterium for analysis of the biosynthesis and regulation of prodigiosin, a carbapenem,
710 and gas vesicles. *Genome announcements*, 1, e01039-13. doi:10.1128/genomeA.01039-13
- 711 Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual*
712 *Review of Microbiology*, 58, 453-488. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123615
- 713 Fraser, C., Alm, E. J., Polz, M. F., Spratt, B. G., & Hanage, W. P. (2009) The bacterial
714 species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science*, 323,741-746.
715 doi: 10.1126/science.1159388
- 716 George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L., & Thomas, G. V. (2013). Multifarious
717 beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and
718 *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera*
719 L.). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29, 109-117. doi: 10.1007/s11274-012-
720 1163-6
- 721 Gerlach, R. G., & Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the
722 molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical*
723 *Microbiology*, 297, 401-415. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.017
- 724 Ghirardi, S., Dessaint, F., Mazurier, S., Corberand, T., Raaijmakers, J. M., Meyer, J.
725 M., & Lemanceau, P. (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains
726 of fluorescent pseudomonads. *Microbial ecology*, 64, 725-737. doi: 10.1007/s00248-012-
727 0065-3
- 728 Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify
729 clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 35, W52-
730 W57. doi: 10.1093/nar/gkm360
- 731 Grosso-Becerra, M. V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J. L.,
732 Delgado, G., Morales-Espinosa, R., ... & Soberón-Chávez, G. (2014). *Pseudomonas*
733 *aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high
734 phenotypic diversity. *BMC genomics*, 15: 318. doi: 10.1186/1471-2164-15-318
- 735 Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-Hurek, B., &
736 Ladha, J. K. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia*
737 *marcescens*. *Journal of bacteriology*, 183, 2634-2645. doi: 10.1128/JB.183.8.2634-2645.2001
- 738 Haas, D. & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by
739 fluorescent pseudomonads. *Nature Review of Microbiology*, 3, 307-319. doi:
740 10.1038/nrmicro1129
- 741 Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes.
742 *Annual Review of Microbiology*, 54, 641-679.
- 743 Huang, X., & Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome*
744 *Research*, 9, 868-877.
- 745 Hynes, A. P., Villion, M., & Moineau, S. (2014) Adaptation in bacterial CRISPR-Cas
746 immunity can be driven by defective phages. *Nature communications*, 5, 4399. doi:
747 10.1038/ncomms5399
- 748 Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K. ... Hayashi, T.
749 (2014) Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-

- 750 resistant nosocomial pathogen. *Genome Biology and Evolution*, 6, 2096–2110. doi:
751 10.1093/gbe/evu160
- 752 Junier, I., & Rivoire, O. (2013) Synteny in bacterial genomes: inference, organization
753 and evolution. *arXiv preprint arXiv:1307.4291*.
- 754 Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., & Sekimizu, K. (2014). *Serratia marcescens*
755 suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against
756 immuno surveillance cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 5876–5888. doi:
757 10.1074/jbc.M113.544536
- 758 Jackson, T. A., & Zimmermann, G. (1996). Is there a role for *Serratia* spp. in the
759 biocontrol of *Melolontha* spp.?. *Bulletin OILB SROP (France)*.
- 760 Just-Baringo, X., Albericio, F., & Álvarez, M. (2014). Thiopeptide antibiotics:
761 retrospective and recent advances. *Marine drugs*, 12, 317–351. doi: 10.3390/md12010317.
- 762 Kettler, G. C., Martiny, A. C., Huang, K., Zucker, J., Coleman, M. L., Rodrigue, S., ...
763 Chisholm, S. W. (2007) Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of
764 *Prochlorococcus*. *PLoS Genetics*, 3, e231. doi: 10.1371/journal.pgen.0030231
- 765 Khan A, A., Khan A, M., & Aggarwal, A. (2013). *Serratia marcescens*-a rare
766 opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients.
767 *Journal of clinic and diagnostic research*, 7, 243. doi: 10.7860/JCDR/2013/5010.2737
- 768 Khan, A. R., Park, G. S., Asaf, S., Hong, S. J., Jung, B. K., & Shin, J. H. (2017).
769 Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting
770 bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PloS one*, 12, e0171534.
771 doi:10.1371/journal.pone.0171534
- 772 Khanafari, A., Assadi, M. M., & Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin,
773 pigmentation in *Serratia marcescens*. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 6, 1–13.
774 doi:10.3844/ojbsci.2006.1.13
- 775 Klein, I., Von Rad, U., & Durner, J. (2009). Homoserine lactones: do plants really
776 listen to bacterial talk?. *Plant signaling & behavior*, 4, 50–51.
- 777 Koonin, E., V., & Wolf, Y., I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging
778 dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research*, 36:6688.
779 doi:10.1093/nar/gkn668
- 780 Kurz, C. L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G. P. &
781 Steinmetz, I. (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia*
782 *marcescens* identified by *in vivo* screening. *The EMBO journal*, 22, 1451–1460. doi:
783 10.1093/emboj/cdg159
- 784 Lawrence, J. G. (2003) Gene organization: selection, selfishness and serendipity.
785 *Annual Review of Microbiology*, 57, 419–440. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090816
- 786 Le Blastier, S., Hamels, A., Cabeen, M., Schille, L., Tilquin, F., Dieu, M. ... Matroule,
787 J.Y. (2010) Phosphate starvation triggers production and secretion of an extracellular
788 lipoprotein in *Caulobacter crescentus*. *PLoS One*, 5, e14198.
789 doi:10.1371/journal.pone.0014198
- 790 Letoffe, S., Ghigo, J. M., & Wandersman, C. (1994) Iron acquisition from heme and
791 hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proceedings of the National*
792 *Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9876–9880.
- 793 Li, P., Kwok, A. H. Y., Jiang, J., Ran, T., Xu, D., Wang, W., & Leung, F. C. (2015).
794 Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic
795 Potential. *PLoS ONE*, 10, e0123061. doi: 10.1371/journal.pone.0123061

- 796 Liu, L., Kloepper, J., Tuzun, S. (1995) Induction of systemic resistance in cucumber
797 against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85, 695–8.
798 doi:10.1094/Phyto-85-695
- 799 López-Fernández, S., Sonogo, P., Moretto, M., Pancher, M., Engelen, K., Pertot, I., &
800 Campisano, A. (2015) Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils
801 similarities and differences between endophytes and other symbiotic bacteria. *Frontiers in*
802 *Microbiology*, 6, 419. doi: 10.3389/fmicb.2015.00419
- 803 Lugtenberg, B. J., Dekkers, L., & Bloemberg, G. V. (2001). Molecular determinants of
804 rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 461-490.
805 doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.461
- 806 MacLellan, S. R., Helmann, J. D., & Antelmann, H. (2009) The YvrI alternative
807 δ factor is essential for acid stress induction of oxalate decarboxylase in *Bacillus subtilis*.
808 *Journal of Bacteriology* 191:931–939. doi: 10.1128/JB.01435-08
- 809 Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders SJ,
810 ... Koonin, E.V. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems.
811 *Nature Review Microbiology*, 13, 722–736. doi: 10.1038/nrmicro3569
- 812 Mahlen, S. D. (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current
813 practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 755-91. doi:10.1128/CMR.00017-11
- 814 Martínez-Núñez, M. A., & López, V. E. L. (2016) Nonribosomal peptides synthetases
815 and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*, 4, 13. doi:
816 10.1186/s40508-016-0057-6
- 817 Mavrodi, D. V., Joe, A., Mavrodi, O. V., Hassan, K. A., Weller, D. M., Paulsen, I. T.,
818 ... Thomashow, L. S. (2011) Structural and functional analysis of the type III secretion
819 system from *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Journal of bacteriology*, 193, 177-189. doi:
820 10.1128/JB.00895-10
- 821 Medeiros, J. D., Leite, L. R., Pylro, V. S., Oliveira, F. S. D., Almeida, V. M. D.,
822 Fernandes, G. R., ... & Cuadros-Orellana, S. (2017) Single-cell sequencing unveils the
823 lifestyle and CRISPR-based population history of *Hydrotaea* sp. in acid mine drainage.
824 *Molecular ecology*, 26, 5541-5551. doi: 10.1111/mec.14294
- 825 Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach
826 M. A., ... Breitling, R. (2011) antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of
827 secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 39, W339-W346.
828 doi:10.1093/nar/gkr466
- 829 Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E., & Hernández-Lucas,
830 I. (2018) The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and disease*, 1, 76. doi:
831 10.1093/femspd/fty002
- 832 Mira, A., Martín-Cuadrado, A. B., D'Auria, G., & Rodríguez-Valera, F. (2010). The
833 bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *International Microbiology*, 13, 45-
834 57. doi: 10.2436/20.1501.01.110
- 835 Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., ...
836 Mekalanos, J. J. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein
837 secretion apparatus. *Science*, 312, 1526-1530. doi:10.1126/science.1128393
- 838 Nakano, Y., Iwadate, M., Umeyama, H., & Taguchi, Y. (2014). Bacterial type III
839 secretion system effector proteins are distinct between plant symbiotic, plant pathogenic and
840 animal pathogenic bacteria. *Information and Media Technologies*, 9, 141-154. doi:
841 10.2197/ipsjtbio.7.2

- 842 Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., &
843 Börner, T. (1999). Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal*
844 *of Bacteriology*, 181, 4089-4097.
- 845 Orruño, M., Garaizabal, I., Bravo, Z., Parada, C., Barcina, I., & Arana, I. (2014)
846 Mechanisms involved in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* removal during activated
847 sludge wastewater treatment. *Microbiology Open*, 3, 657-667. doi: 10.1002/mbo3.196
- 848 Peel, M. C., Finlayson, B. L., & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the
849 Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and earth system sciences discussions*, 4,
850 439-473. doi: 10.5194/hess-11-1633-2007
- 851 Puhar, A., & Sansonetti, P. J. (2014). Type III secretion system. *Current Biology* 24:
852 R784-R791. Doi: 10.1016/j.cub.2014.07.016
- 853 Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., ...
854 Mekalanos, J. J. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in
855 *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National*
856 *Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1528-1533. doi:
857 10.1073/pnas.0510322103
858
- 859 Raz, Y., & Tannenbaum, E. (2010). The influence of horizontal gene transfer on the
860 mean fitness of unicellular populations in static environments. *Genetics*, 185, 327-337.
861 doi:10.1534/genetics.109.113613
- 862 Ribeiro, V., Gomes, E., Marriel, I., de Abreu, C. S., Lana, U. D. P., & Paiva, C.
863 (2015). Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-*
864 *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. 132, 27 p.
- 865 Ricard, G., McEwan, N. R., Dutilh, B. E., Jouany, J. P., Macheboeuf, D., Mitsumori,
866 M., ... & Newbold, C. J. (2006). Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates
867 indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC genomics*, 7:
868 22. doi: 10.1186/1471-2164-7-22
- 869 Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., & Ruíz-Saínz, J. E. (2007). Attachment
870 of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272, 127-136.
871 doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x
- 872 Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome
873 as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes and New infections*, 7, 72-85.
874 doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.005
- 875 Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., &
876 Hartmann, A. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine
877 lactone producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell & Environment*, 29, 909-918. doi:
878 10.1111/j.1365-3040.2005.01471.x
- 879 Schulz B., Römmert A.-K., Dammann U., Aust H.-J., Strack D. (1999). The
880 endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103, 1275-1283.
881 doi: 10.1017/S0953756299008540
- 882 Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30,
883 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- 884 Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., ... &
885 Hurek, T. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots
886 as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 25, 28-36. doi:
887 10.1094/MPMI-08-11-0204

- 888 Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-
889 13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum*
890 *aestivum* L.). *PloS one*, 11, e0155026. doi: 10.1371/journal.pone.0155026
- 891 Silva, U. de C., de Oliveira Mendes, G., Silva, N. M. R., Duarte, J. L., Silva, I. R.,
892 Tótola, M. R., & Costa, M. D. (2014). Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show
893 enhanced phosphate solubilization capacity. *PloS One*, 9, e110246. doi:
894 10.1371/journal.pone.0110246
- 895 Silva, U. de C., de Oliveira, C. A., de Paula Lana, U. G., Gomes, E. A., & dos Santos,
896 V. L. (2016). Growth Promotion Features of the Maize Microbiome: From an Agriculture
897 Perspective. In Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. *Springer*
898 *Singapore pp*, 345-374. doi: 10.1007/978-981-10-2854-0_16
- 899 Silva, U. C., Medeiros, J. D., Leite, L. R., Morais, D. K., Cuadros-Orellana, S.,
900 Oliveira, C. A., ... & Dos Santos, V. L. (2017). Long-term rock phosphate fertilization
901 impacts the microbial communities of maize rhizosphere. *Frontiers in microbiology*, 8, 1266.
902 doi: 10.3389/fmicb.2017.01266
- 903 Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic
904 analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688-2690. doi:
905 10.1093/bioinformatics/btl446
- 906 Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y. B., Walla, M. D.,
907 Vangronsveld, J., ... & Monchy, S. (2010). Genome sequence of the plant growth promoting
908 endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS genetics*, 6, e1000943. doi:
909 10.1371/journal.pgen.1000943
- 910 Tanner, A., & Bornemann, S. (2000). *Bacillus subtilis* YvrK is an acid-induced oxalate
911 decarboxylase. *Journal of bacteriology*, 182, 5271-5273. doi: 10.1128/JB.182.18.5271-
912 5273.2000
- 913 Thompson, J. R., Pacocha, S., Pharino, C., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Benoit
914 J., Sarma-Rupavtarm, R., ... Polz, M. F. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal
915 bacterioplankton population. *Science*, 307, 1311-1313. doi: 10.1126/science.1106028
- 916 Van der Vorm, E. R. (2002) Source, carriers, and management of a *Serratia*
917 *marcescens* outbreak on a pulmonary unit. *Journal of Hospital Infection*, 52, 263-267. doi:
918 10.1053/jhin.2002.1313
- 919 Van Houdt, R., Moons, P., Buj, M. H., & Michiels, C. W. (2006). N-acyl-L-
920 homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica*
921 RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. *Journal of bacteriology*, 188, 4570-4572. doi:
922 10.1128/JB.00144-06
- 923 Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.
924 *Pharmacy and Therapeutics*, 40, 277.
- 925 Vicente, C. S. L., Nascimento, F., Espada, M., Barbosa, P., Mota, M., Glick, B. R.,
926 Oliveira, S. (2012) Characterization of bacteria associated with pinewood Nematode
927 *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS ONE* 7:e46661. doi: 10.1371/journal.pone.0046661
- 928 Vicente, C. S., Nascimento, F. X., Barbosa, P., Ke, H. M., Tsai, I. J., Hirao, T., ... &
929 Mota, M. (2016). Evidence for an Opportunistic and Endophytic Lifestyle of the
930 *Bursaphelenchus xylophilus*-Associated Bacteria *Serratia marcescens* PWN146 Isolated from
931 Wilting *Pinus pinaster*. *Microbial Ecology*, 72, 669-681. doi: 10.1007/s00248-016-0820-y
- 932 Vieira, J. A. C., Alves, N. L. S., Silva, U. C., Lima, S. S., Santos, V. L. Maize
933 endophytic bacteria and their potential as plant growth promoters and biological control

934 agents. 28° Congresso Brasileiro de Microbiologia, Centro de Convenções de Florianópolis,
935 Florianópolis, SC, 18 a 22 de outubro de 2015.

936 Xie, J., Shi, H., Du, Z., Wang, T., Liu, X., & Chen, S. (2016). Comparative genomic
937 and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus*
938 *polymyxa* and its closely related species. *Scientific reports*, 6, 21329. doi: 10.1038/srep21329

939 Xu, X., Liu, H., & Guo, H. (2011). Separation, identification and growing
940 characteristics of the spoilage microorganisms in soymilk. In *Remote Sensing, Environment*
941 *and Transportation Engineering (RSETE), 2011 International Conference on* (pp. 7823-
942 7826). IEEE. doi: 10.1109/RSETE.2011.5966190

943 Wang, X. Q., Bi, T., Li, X. D., Zhang, L. Q., & Lu, S. E. (2015). First report of corn
944 whorl rot caused by *Serratia marcescens* in China. *Journal of Phytopathology*, 163, 1059-
945 1063. doi: 10.1111/jph.12366

946 Wei, G., Klopper, J. W., & Tuzun, S. (1991) Induction of systemic resistance of
947 cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting
948 rhizobacteria. *Phytopathology*, 81, 1508–12. doi: 10.1094/Phyto-81-1508

949 Wei, G., Klopper, & J., Tuzun, S. (1996) Induced systemic resistance to cucumber
950 diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field
951 conditions. *Phytopathology*, 86, 221–224. doi: 10.1094/Phyto-86-221

952 Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence
953 mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, 85,
954 11-19. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.007

955 Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: a
956 fast phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 39, W347-W352. doi: 10.1093/nar/gkr485

957

958 **Tables and Figures**

959 **Table 1:** Summary of the general characteristics of the genomes of SmCNPMS2112 and
960 SmUFMG85 strains

961

Genome feature	SmCNPMS2112	SmUFMG85
Collection number	CNPMS2112	RP3A-012
Scaffolds	33	24
N50 (bp)	429,639	357,908
Genome size (Mbp)	5.28	5.22
Coverage	32 x	36 x

GC content (%)	59.49	59.22
CDS number	5,105	5,166
Genes with assigned function	4,256	4,203
Genes without assigned function	849	963
rRNA genes	14	9
tRNA genes	90	81

962

For Review Only

963 **Table 2:** Functions related to Fe (iron) uptake, P (phosphate) metabolism, organic acids,
 964 phytohormone, volatile organic compounds, cell motility and adhesion, secretion system,
 965 degradation of plant polymer, lipopolysaccharides, bacteriocins, antibiotics, drug resistance,
 966 efflux pump, virulence, quorum sensing, reactive oxygen species (ROS) detoxification. The
 967 numbers represent the sum of orthologous proteins related to each function (see Table S3 for
 968 more details). Genome annotations were performed using PROKKA and RAST software, and
 969 OrthoMCL was used for defining orthologue families.

970

Functions	Pang ¹	Plant				Water	Clinic			Insect	Machine
		SmUF MG85	SmCNP MS2112	RSC 14	B3R3	Lr54	CAV 1492	SM39	SmUN AM836	DB11	WW4
Fe uptake	Core	51	50	51	47	51	47	47	46	46	49
	Acess ²	4	3	3	2	3	2	8	6	6	3
	Sing ³	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P metabolism	Core	38	39	36	37	36	36	37	37	37	36
	Acess	2	-	2	1	1	4	4	2	2	2
Organic acids	Core	28	27	28	78	27	27	27	28	27	27
	Acess	4	5	1	2	1	1	1	1	2	2
	Sing	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phytohormo ne	Core	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Acess	1	1	-	1	-	-	1	1	1	1
VOCs ⁴	Core	18	19	18	19	18	18	18	18	18	19
Cell Motility and	Core	57	57	55	56	53	52	55	56	53	58
	Acess	1	5	2	5	2	5	6	4	4	2

adhesion	Sing	4	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Secretion system	Core	12	15	10	9	10	6	8	8	7	9
	Acess	7	5	8	2	8	18	8	8	-	1
	Sing	-	3	-	-	-	1	-	-	-	-
Degradation of plant polymer	Core	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Acess	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lipopolysaccharide	Core	17	16	17	16	17	17	17	17	17	16
	Acess	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-
	Sing	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteriocins	Core	4	6	6	7	6	6	5	5	4	5
	Acess	1	3	-	1	-	2	-	1	2	3
Antibiotics	Core	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
	Acess	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Sing	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Drug resistance	Core	30	29	32	30	31	30	30	29	29	30
	Acess	5	6	6	7	6	6	2	5	5	7
	Sing	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Efflux	Core	18	17	19	23	19	19	22	25	18	18

pump	Acess	-	1	1	2	1	-	2	2	-	1
	Sing	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Virulence	Core	21	21	17	20	17	20	22	23	16	21
	Sing	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
Quorum sensing	Core	6	5	5	5	5	5	5	6	5	5
ROS detoxification	Core	27	25	26	27	26	27	25	25	28	25
Others secondary metabolites	Core	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	Acess	3	5	5	9	3	1	3	4	1	9

971

972 ¹ Pang: Pan-genome973 ² Acess: Accessory974 ³ Sing: Singleton975 ⁴ VOCs: volatile organic compounds

976

977

978

Only

979 Figure Captions

980

981 **Figure 1. Functional gene prediction and Crispr identification:** A. Distribution of the
 982 number of CDSs in SmCNPMS2112 and SmUFMG85 genomes by RAST B. Venn diagram
 983 of the SmCNPMS2112 and SmUFMG85 singleton and shared proteins. C. Crispr operon
 984 detected in the SmCNPMS2112 and SmUFMG85.

985

986 **Figure 2.** Secondary metabolite biosynthesis gene cluster prediction using antiSMASH. The
 987 Venn diagram highlights the numbers of gene clusters associated with the biosynthesis of
 988 secondary metabolites found in the genomes of SmUFMG85 (yellow) and SmCNPMS2112
 989 (blue) using the antiSMASH program (Marnix et al., 2011). The letters from A to H
 990 associated with singleton gene clusters of each genome detected by cluster finder (cf) and
 991 identify gene organization and motifs associated with nonribosomal peptides (NRPs) that are
 992 structurally different when compared to each other. I represents a cluster associated with
 993 prodigiosin biosynthesis, which is associated with characterization of the reddish pigment in
 994 colonies of SmCNPMS2112, which was not observed in SmUFMG85.

995

996 **Figure 3:** Core and singleton family prediction and phylogenomic analysis. A. Core families
 997 (central circle) and singleton genes of the 21 *Serratia* genomes. UFMG85 and CNPMS2112
 998 *S. marcescens* (plant isolate and draft genome, respectively); other genomes are full genome
 999 from GenBank: *S. marcescens* SmUNAM836 (clinical isolate), *S. marcescens* SM39 (clinical
 1000 isolate); *S. marcescens* (clinical isolate), *S. marcescens* RSC14 (plant isolate), *S. ureilytica*
 1001 Lr54 (geothermal spring isolate), *S. marcescens* DB11 (insect isolate), *S. marcescens* WW4
 1002 (machine biofilm isolate), *S. marcescens* B3R3 (plant isolate), *S. marcescens* FGI94
 1003 (endosymbiont fungus isolate), *S. fonticola* DSM4576 (water isolate), *S. fonticola* GS2 (plant
 1004 isolate), *S. plymuthica* AS9 (plant isolate), *S. plymuthica* 4Rx13 (plant isolate), *S. plymuthica*
 1005 S13 (plant isolate), *S. plymuthica* 3Re418 (plant isolate), *S. plymuthica* 3Rp8 (plant isolate), *S.*
 1006 *plymuthica* PRI2C (plant isolate), *S. liquefaciens* ATCC27592, and *S. proteamaculans* 568
 1007 (plant isolate). B. Description of the phylogenomic profile of the 21 genomes of *Serratia*
 1008 based on the comparison of whole genomes. C. Description of the phylogenomic profile of
 1009 the 21 genomes of *Serratia* based on the core genome.

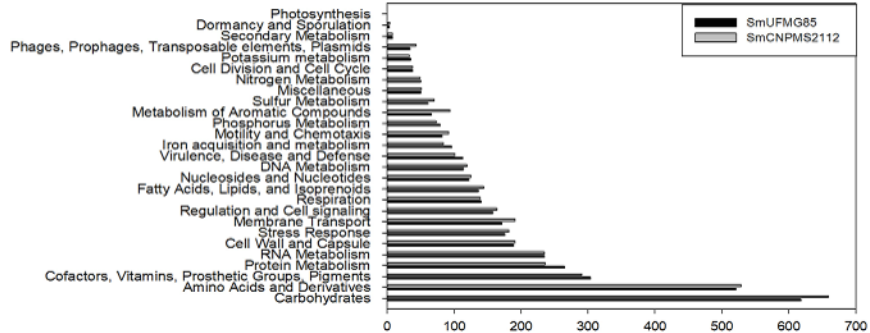
1010

1011 **Figure 4.** Heat map of the number of shared gene families (C: core, gathering all genes
 1012 common to all strains), A: accessory, containing genes present between two or $n-1$ strains
 1013 and S: singletons present only in a single strain) in each functional category (COG) of the
 1014 clade composed by ten *Serratia*. V, defense mechanism; K, transcription; O, posttranslational
 1015 modification, protein turnover, and chaperones; T, signal transduction mechanisms; I, lipid
 1016 transport and metabolism; G, carbohydrate transport and metabolism; M, cell
 1017 wall/membrane/envelope biogenesis; E, amino acid transport and metabolism; H, coenzyme
 1018 transport and metabolism; C, energy production and conversion; Q, secondary metabolite
 1019 biosynthesis, transport, and catabolism; R, general function prediction only; F, nucleotide
 1020 transport and metabolism; L, replication, recombination, and repair; U, intracellular
 1021 trafficking, secretion, and vesicular transport; P, inorganic ion transport and metabolism; B,
 1022 mobilome: prophages and transposons; J, translation, ribosomal structure, and biogenesis; N,
 1023 cell motility and extracellular structures; D, cell cycle control, cell division, and chromosome
 1024 partitioning; S, function unknown.

1025 **Figure 5:** Comparative circular map of SmUFMG85 and SmCNPMS2112 genomes with
1026 those of other *Serratia* genomes. A. SmUFMG85, blue circle and B. SmCNPMS2112, red
1027 circle genomes compared with *Serratia* isolated from different lifestyles (plant, RSC14 and
1028 B3R3; clinical, CAV1492, SM39, and SmUNAM836; insect, DB11; WW4, machine; water,
1029 *S. ureilytica*). The alignment was based on nucleotide identity; thus, the circles represent each
1030 genome assembled using the BRIG 0.95 program according to the color legend. The internal
1031 circle represents nucleotide sequence positions (Mb), followed by GC content and GC skew.
1032 Moreover, the regions of genomic islands (shaded gray or blue) and prophages (shaded red or
1033 blue) detected by IslandViewer (Bertelli et al, 2017) or Phast (Zhou et al, 2011), respectively,
1034 are shown. The gap regions belong to accessory genome or singletons of the reference
1035 genome.
1036

For Review Only

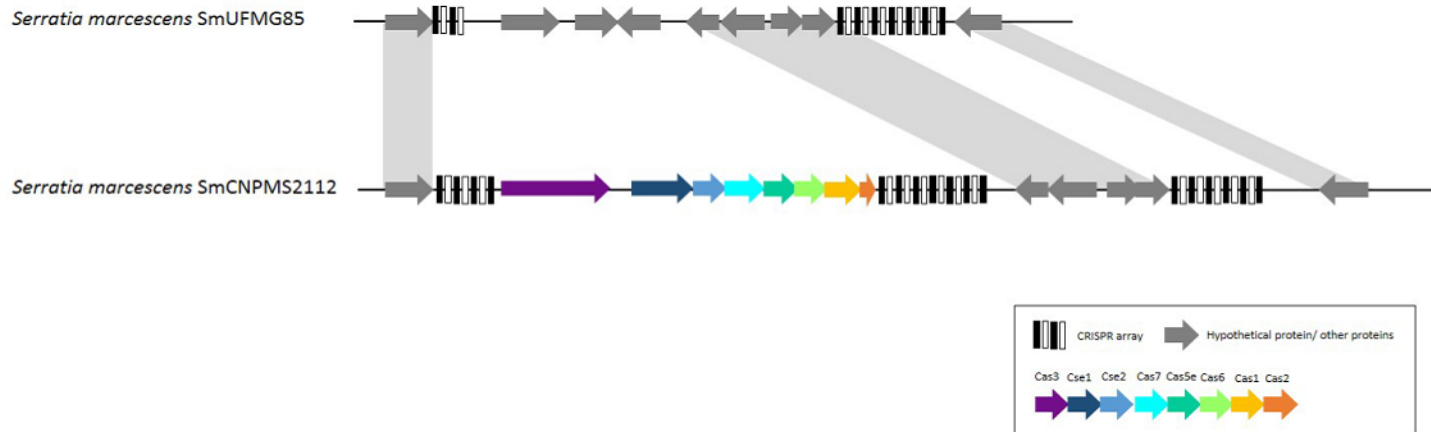
A.

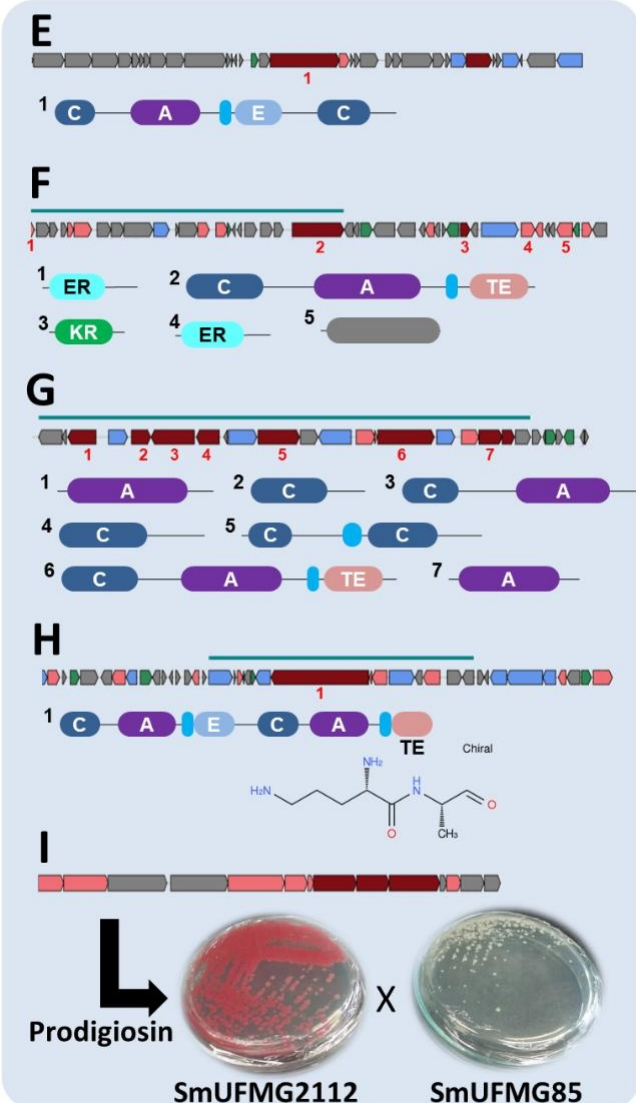
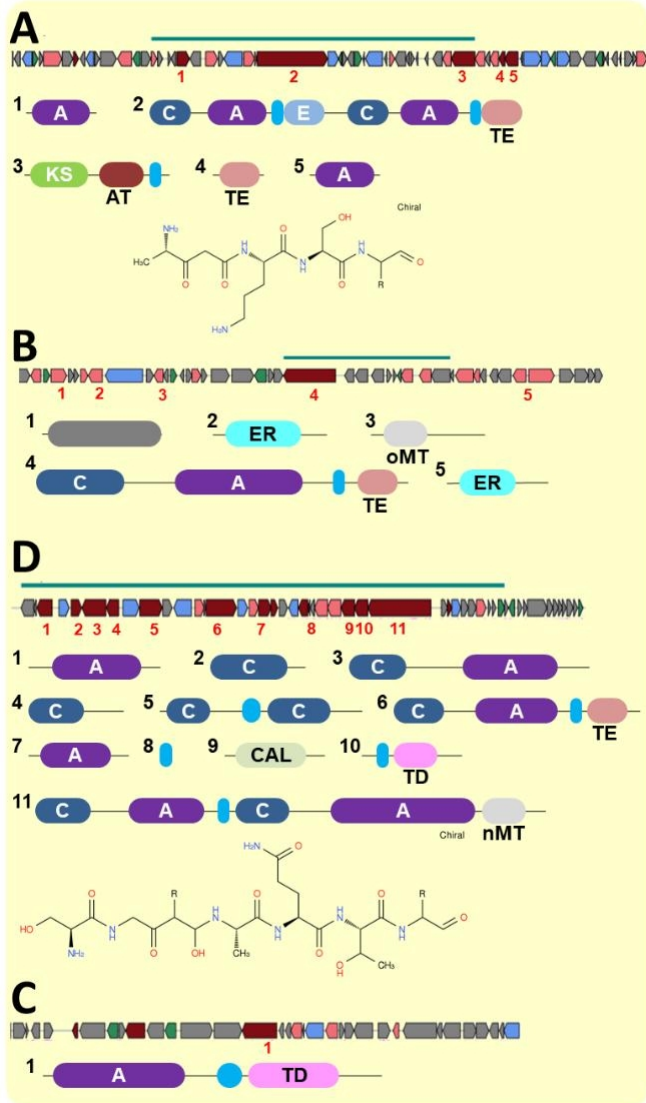
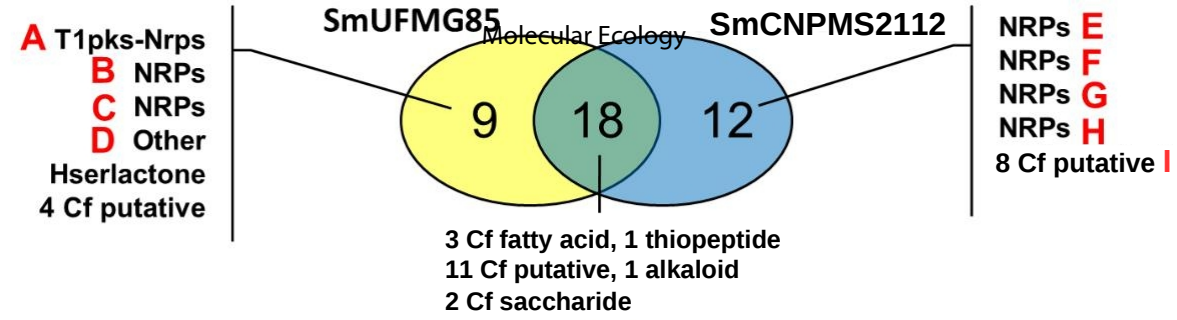


B.



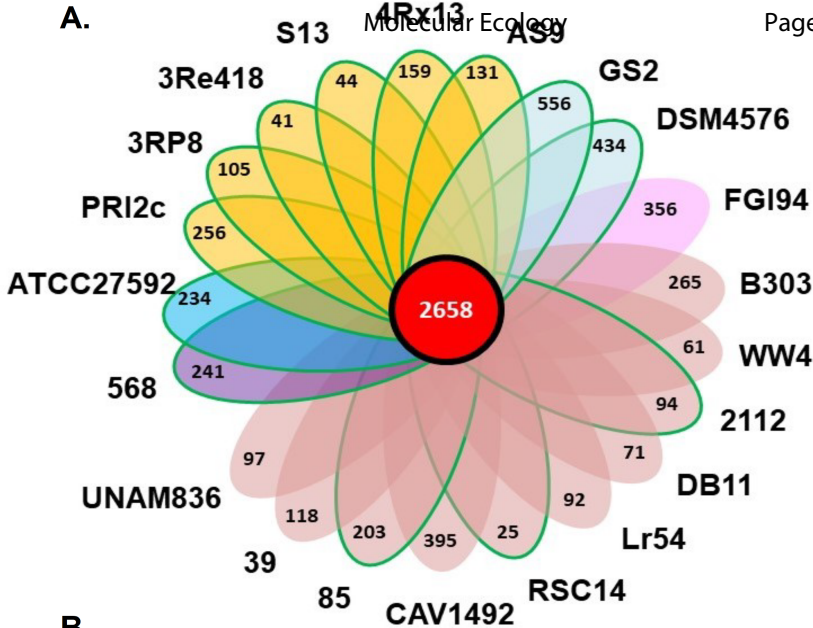
C.



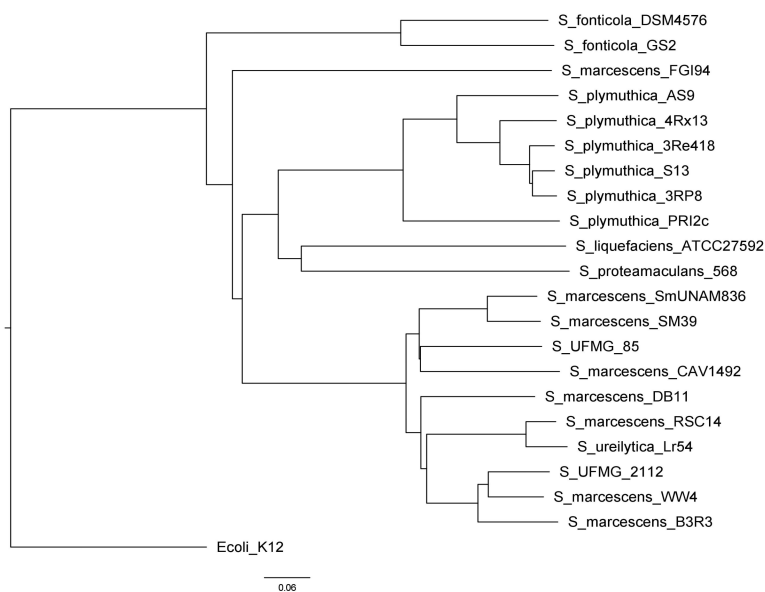


Core Biosynthetic Genes	Functions	Thioesterase	PKS-AT
Additional Biosynthetic Genes	Epimerization	oMT – Methyltransferase	PKS-KR
Transport Related genes	AMP-binding	Aminotransferase	PKS-ER
Regulatory Genes	Condensation	AMP-synthase/ligase	
Other genes	PCP		

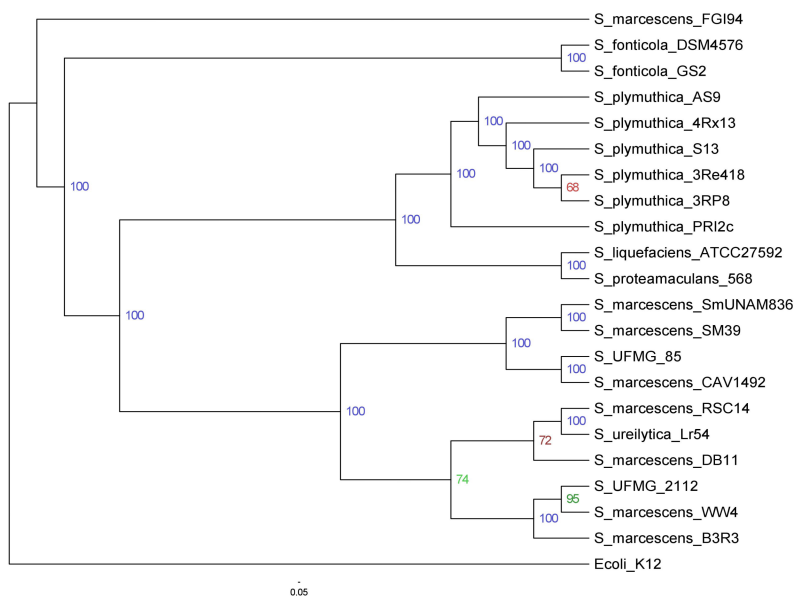
A.



B.



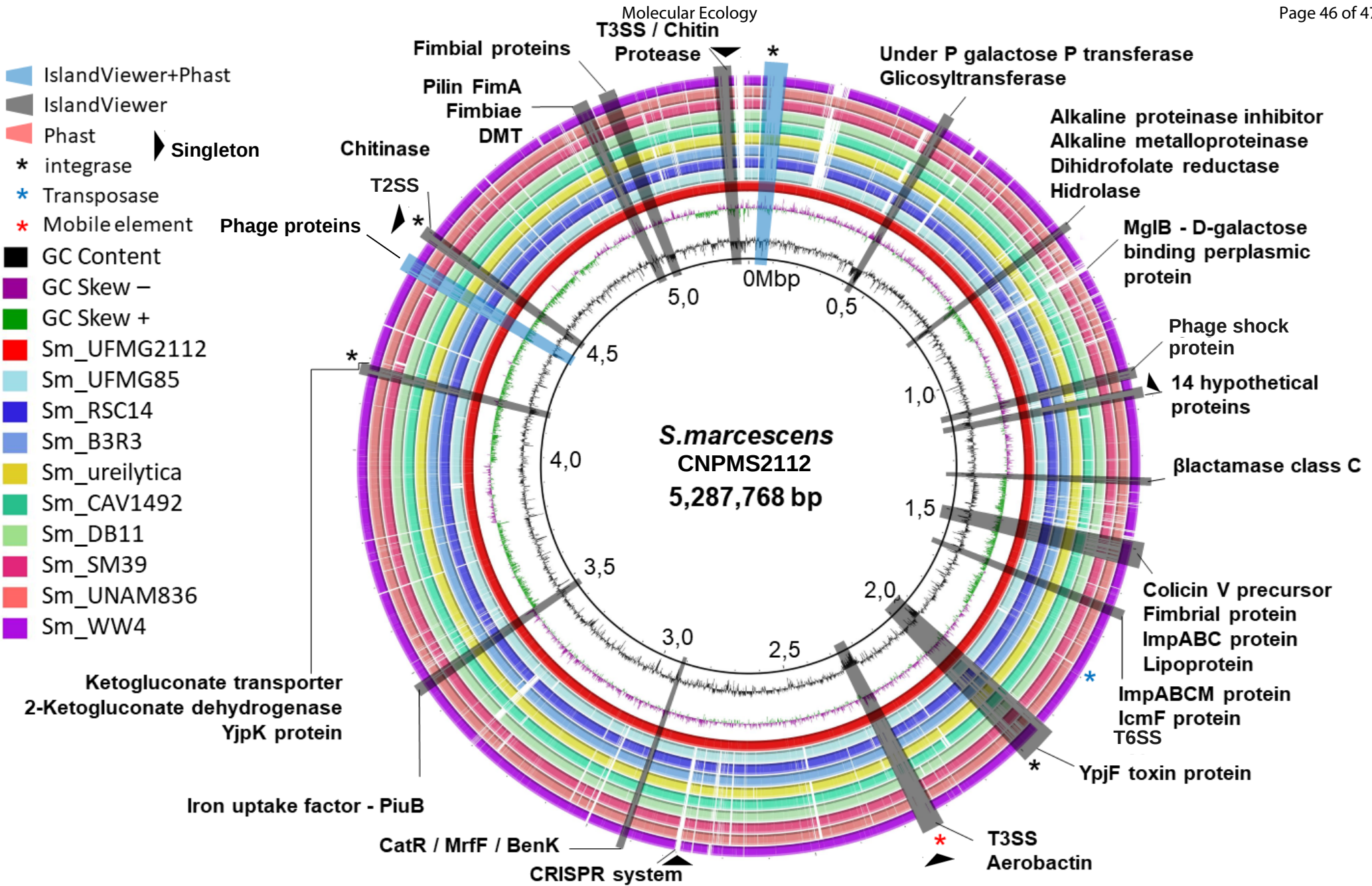
C.

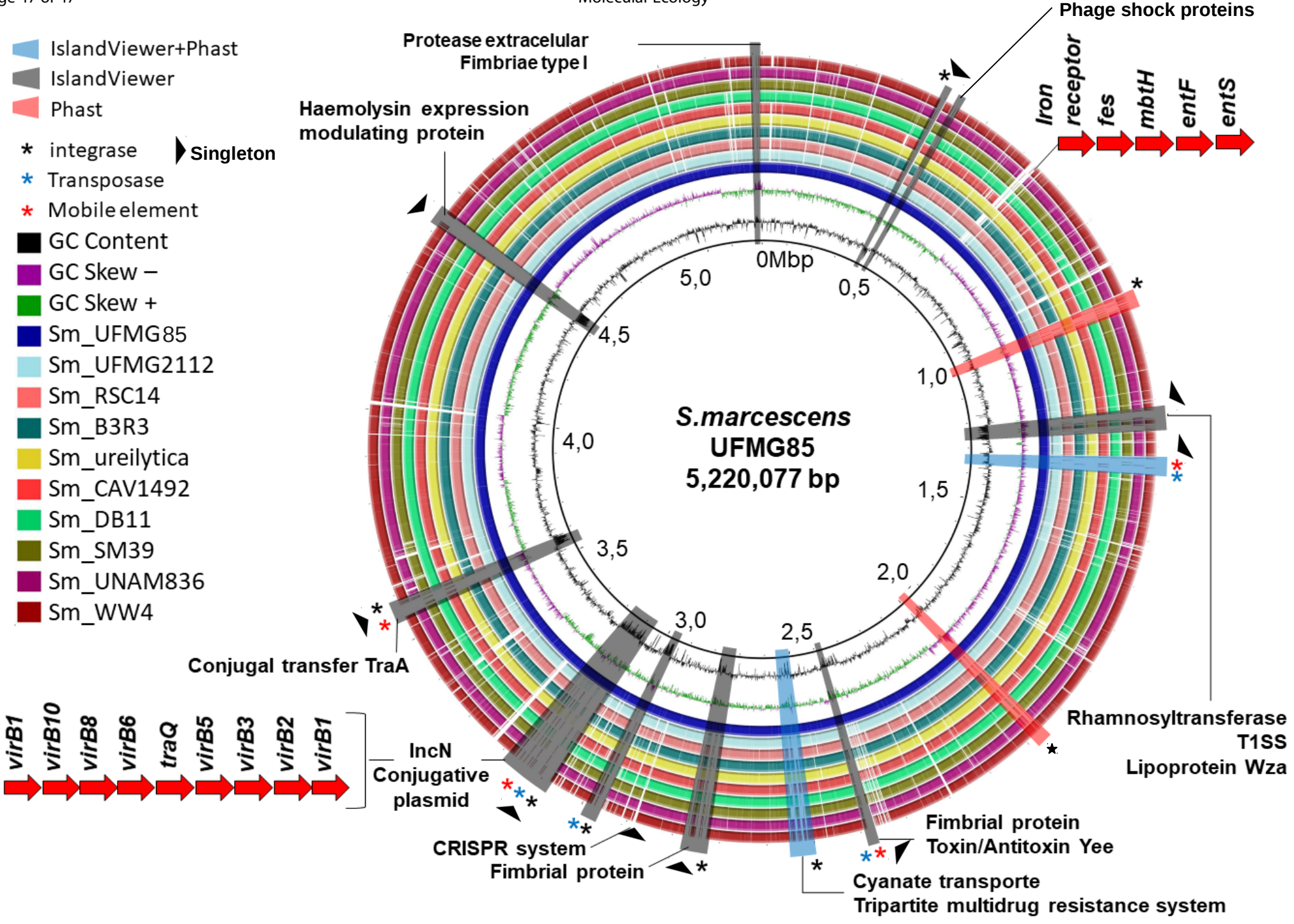


COG

		V	K	O	T	I	G	M	E	H	C	Q	R	F	L	U	P	B	J	N	D	S	
PLANT	CNPMS2112	S	4	10	1	7	2	5	5	1	1	1	2	9	1	2	12	1	1	0	2	1	72
		A	2	10	2	7	1	2	1	0	3	1	0	4	0	3	0	0	12	2	2	0	2
	UFMG85	S	3	17	2	3	7	9	7	9	0	7	12	23	0	4	3	14	9	2	3	0	143
		A	1	9	1	3	0	11	5	1	2	1	1	6	0	9	6	0	11	1	8	0	1
WATER	RSC14	S	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	19
		A	5	14	7	5	0	5	13	15	3	1	1	7	0	4	0	0	1	1	0	0	1
	B3R3	S	8	13	8	8	0	4	8	0	8	8	2	12	0	12	12	6	28	2	2	4	318
		A	7	4	4	0	1	3	2	2	1	0	4	8	1	5	0	1	10	2	6	0	8
CLINIC	Lr54	S	2	6	2	3	2	4	2	3	2	2	1	9	1	2	0	1	7	3	0	1	77
		A	4	20	7	5	0	6	12	15	3	2	0	8	0	10	0	1	17	2	2	2	5
	CAV1492	S	20	31	6	11	2	8	20	10	3	6	4	23	3	21	13	19	6	3	1	5	301
		A	10	9	2	6	2	6	7	5	6	2	2	5	0	12	8	2	20	3	3	2	5
INSECT	SM39	S	4	12	0	8	0	5	9	1	2	2	2	13	1	6	2	0	5	2	2	1	99
		A	3	16	2	1	3	2	4	4	4	6	2	10	0	9	2	3	9	1	2	1	6
	SmUNAM836	S	1	8	3	1	1	2	6	4	0	1	2	6	2	5	1	3	7	2	1	0	103
		A	2	11	0	2	0	2	3	4	4	4	2	9	0	7	2	1	8	1		1	10
MACHINE	DB11	S	2	10	1	0	13	2	4	6	1	3	8	13	0	3	0	1	0	2	2	1	33
		A	0	6	0	4	0	10	0	1	1	1	2	5	1	2	0	0	0	0	4	0	2
	WW4	S	2	23	0	3	2	4	3	1	1	2	1	9	0	3	0	0	2	1	1	1	43
		A	4	7	5	1	3	4	1	3	4	2	4	5	0	3	0	2	1	1	7	0	8
C		73	264	168	99	134	266	219	395	207	223	99	334	100	115	57	247	4	250	10	40	221	







Support information

Table S1: Dataset of the genomes used in the work obtained from the Genbank database

Genome feature	Origin	Genome size (Mb)	GC content (%)	Proteins	Replicon	Status
<i>Serratia fonticola</i> DSM4576	water	6.0	0.54	5,356	chr	complete
<i>Serratia fonticola</i> GS2	Plant	6.32	0.54	5,460	chr	complete
			0.50	167	pSF001	
			0.53	118	pSF002	
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC27592	Culture	5.28	0.55	4,858	chr	complete
	Collection		0.53	35	p1	
<i>Serratia marcescens</i> B3R3	Plant	5.59	0.59	5,078	chr	complete
			0.52	122	p1	
<i>Serratia marcescens</i> CAV1492	Clinic	5.82	0.59	5,019	chr	complete
			0.51	212	p199	
			0.56	4	p3223	
			0.53	6	p6393	
			0.53	94	p73	
			0.49	79	pKPC	
<i>Serratia marcescens</i> DB11	Insect	5.11	0.60	4,680	chr	complete
<i>Serratia marcescens</i> FGI94	Fungus	4.85	0.59	4,365	chr	complete
<i>Serratia marcescens</i> RSC14	Plant	5.12	0.6	4,684	chr	complete
<i>Serratia marcescens</i> SM39	Clinic	5.32	0.60	4,779	chr	complete
			0.61	54	pSMC1	
			0.52	67	pSMC2	
<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	Clinic	5.23	0.60	4,769	chr	complete
			0.44	36	p1	
<i>Serratia marcescens</i> WW4	Machine	5.24	0.60	4,827	chr	complete
			0.48	3	pSmWW4	
<i>Serratia plymuthica</i> 3Re418	Plant	5.44	0.56	4,941	chr	complete
<i>Serratia plymuthica</i> 3RP8	Plant	5.54	0.56	5,073	chr	complete
<i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	Plant	5.40	0.56	4,917	chr	complete
<i>Serratia plymuthica</i> AS9	Plant	5.44	0.56	4,975	chr	complete

<i>Serratia plymuthica</i> PRI2c	Plant	5.47	0.56	5,012	chr	complete
<i>Serratia plymuthica</i> S13	Plant	5.47	0.56	4,963	chr	complete
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	Plant	5.49	0.55	4,997	chr	complete
			0.49	75	pSPRO01	
<i>Serratia ureilytica</i> Lr54	Plant	5.39	0.59	4,982	chr	complete
<i>Escherichia coli</i> K12	_	4.64	0.51	4,318	chr	complete

Table S3: Details of the functions related to Fe (iron) uptake, P (phosphate) metabolism, organic acids, phytohormone, volatile organic compounds, cell motility and adhesion, secretion system, degradation of plant polymer, lipopolysaccharides, bacteriocins, antibiotics, drug resistance, efflux pump, virulence, quorum sensing, reactive oxygen species (ROS) detoxification. The numbers represent the sum of orthologous proteins related to each function. Genome annotations were performed using PROKKA and RAST software, and OrthoMCL was used for defining orthologue families.

Functions	CDS	Pang ¹	Plant		water			Clinic			Machine	
			UFMG 85	UFMG 2112	RSC14	B3R3	Lr54	CAV 1492	SM39	SmUNAM 836	DB11	WW4
Fe uptake	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA	CORE ²	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4
	Iron(3+)-hydroxamate system FhuB,C,D	CORE	6	5	5	5	5	4	4	4	4	5
	Isochorismate synthase EntC	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Enterobactin exporter EntS	CORE	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
	Enterobactin synthase component B, D, E, F	CORE	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4
	Enterobactin	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Putative cytoplasmic protein YbdZ in enterobactin biosynthesis operon	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Ferric enterobactin FepC, D, G	CORE	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Isochorismatase family protein YecD	CORE	5	8	6	6	8	6	5	5	5	8
	Ferrienterobactin-binding periplasmic	CORE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

	protein/receptor											
	Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA	CORE	6	5	6	4	5	4	5	4	5	4
	Putative TonB-dependent receptor	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Putative siderophore biosynthesis protein SbnA	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Phenylloxazoline synthase MbtB	CORE	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1
	Ferric aerobactin receptor	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Enterochelin esterase	CORE	3	2	2	2	2	1	3	3	2	2
	Bacterioferritin	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	TonB-dependent heme receptor A	ACCESS ³	2	1	1	1	1	-	2	2	2	1
	Ferrichrome receptor FcuA	ACCESS	2	-	-	-	-	1	1	1	-	-
	Fe(3+)-citrate-binding protein YfmC	ACCESS	-	-	1	-	1	-	2	1	2	1
	Aerobactin biosynthesis protein IucD	ACCESS	-	1	1	1	1	1	2	1	2	1
	Fe(3+)-pyochelin receptor	ACCESS	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-
	Catecholate siderophore receptor Fiu	SING ⁴	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Phosphonoacetaldehyde hydrolase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Operon PhnA,B,C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, T, V, U	CORE	19	20	19	19	19	19	19	19	19	19
	PstA, B, C, S	CORE	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	PhoU, H	CORE	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3
	Low-affinity inorganic phosphate transporter	CORE	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1
	Alkaline phosphatase	CORE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Inorganic pyrophosphatase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	ACCESS	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1
	Major phosphate-irrepressible acid phosphatase	ACCESS	1	-	1	-	-	3	3	1	1	1

Organic acid	Gluconate dehydrogenase	CORE	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	High-affinity gluconate transporter	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Low-affinity gluconate transporter	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Coenzyme PQQ synthesis	CORE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	CORE	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	Lactate dehydrogenase	CORE	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	L-lactate permease	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Citrate metabolism	CORE	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Maleate isomerase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Coenzyme PQQ synthesis protein A	ACCESS	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-
	2-ketogluconate reductase	ACCESS	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1
	ketogluconate transporter	ACCESS	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Keto-D-gluconate dehydrogenase	ACCESS	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Malate-2H(+)/Na(+)-lactate antiporter	ACCESS	-	1	-	1	-	1	1	1	1	1
Oxalate decarboxylase OxdD	SING	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phytohormone	Indole-3-pyruvate decarboxylase	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Tryptophan synthase beta, alpha chains	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Phosphoribosyl anthranilate isomerase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Indole-3-acetyl-aspartic acid hydrolase	ACCESS	1	1	-	1	-	-	1	1	1	1
Acetoin catabolism regulatory protein	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Acetolactate synthase isozyme 1,2,3 subunit	CORE	8	9	8	9	8	8	8	8	8	9	

VOCs⁵	Alpha-acetolactate decarboxylase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VIC⁶	Hydrogen cyanide synthase subunit HcnA, B, C	CORE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Cell Motility and Adhesion	Methyl-accepting chemotaxis protein I, III, IV	CORE	5	6	7	6	6	5	6	6	6	6
	Chemotaxis proteins	CORE	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Fimbrial proteins	CORE	9	6	5	7	4	4	6	7	4	9
	Flagellar proteins	CORE	36	38	36	36	36	36	36	36	36	36
	Filamentous hemagglutinin	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Major MR/P fimbria protein	ACCESS	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Common pilus major fimbriin subunit EcpA	ACCESS	-	1	-	-	-	1	1	1	-	-
	Major structural subunit of bundle-forming pilus	ACCESS	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
	S-fimbrial adhesin protein SfaS	ACCESS	-	-	1	1	1	-	-	1	-	-
	Fimbria adhesin EcpD	ACCESS	-	1	-	-	-	1	1	1	-	-
	Fimbria adhesin protein	ACCESS	-	1	-	1	-	1	2	-	2	-
	Fimbria A protein	ACCESS	1	1	-	2	-	-	-	-	1	1
	Fimbrial adhesin PapG	SING	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Putative fimbrial chaperone YraI	SING	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chaperone protein FimC	SING	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S-fimbrial protein subunit SfaG	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Pilin	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
CFA/I fimbrial subunit B, E	SING	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
Type I secretion system	CORE	6	4	4	4	4	2	4	4	4	4	
Type II secretion	CORE	2	4	3	2	3	3	3	3	2	2	

Secretion system	system protein E, F											
	ImpA, B, C, M type VI secretion-associated proteins	CORE	4	7	3	3	3	1	1	1	1	3
	Type II secretion system proteins D, H, I, J, K, L, M	ACCESS	-	4	8	2	8	9	8	8	-	-
	Type IV secretion system protein VirB1, 4, 9, 10, 11, PtlE	ACCESS	6	-	-	-	-	9	-	-	-	-
	IcmF-related protein	ACCESS	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1
	Type III secretion system protein S SpiA, PscF, SsaV	SING	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Type IV secretion system protein PtlF	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
Degradation of plant polymer	Mannanase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Pectin degradation repressor protein KdgR	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Endoglucanase	ACCESS	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Polysaccharide	Heptosyltransferase RfaG, Q	CORE	4	3	4	3	4	4	4	4	4	3
	Export system protein LptA, B, C, G, F	CORE	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Assembly protein A, B	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	ADP-heptose--LPS heptosyltransferase 2	ACCESS	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-
Bacteriocins	Colicin proteins	CORE	4	6	6	7	6	6	5	5	4	5
	Colicin-D	ACCESS	1	3	-	1	-	2	-	1	1	2
	Colicin-E7 immunity protein	ACCESS	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Antibiotics	Gramicidin synthase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
	Tyrocidine synthase	ACCESS	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Surfactin synthase	SING	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Drug	Streptomycin 3-adenylyltransferase	CORE	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1

Resistance	Phenazine antibiotic resistance protein EhpR	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Aminoglycoside N(6)-acetyltransferase type 1	CORE	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
	Metallothiol transferase FosB	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Beta-lactamase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Chloramphenicol acetyltransferase	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Multidrug resistance proteins	CORE	6	5	7	5	7	5	6	6	6	5
	Multidrug resistance protein MdtA, D, H, K, L, N	CORE	11	11	11	12	11	10	10	10	10	12
	Multidrug resistance-like ATP-binding protein MdlB	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Multidrug efflux pump subunit AcrA	CORE	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1
	Glutathione transferase FosA	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Metallothiol transferase FosB	CORE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Daunorubicin/doxorubicin resistance ATP-binding protein DrrA	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Tetracycline resistance protein, classA,B,C	ACCESS	2	3	2	2	2	4	-	-	2	2
	Beta-lactamase hydrolase-like protein	ACCESS	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1
	Metallo-beta-lactamase L1	ACCESS	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1
	Beta-lactamase TEM	ACCESS	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
	Multidrug resistance protein MexA	ACCESS	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1
	Putative multidrug resistance protein EmrK, Y	ACCESS	2	-	2	2	2	-	-	2	2	2
	Beta-lactamase SHV-2	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Beta-lactamase OXA-1	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-

		SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
			UFMG 85	UFMG 2112	RSC14	B3R3	Lr54	CAV 1492	SM39	SmUNAM 836	DB11	WW4	
	Multidrug resistance protein MdtE	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
Efflux pump	Toxin and drug export protein A	CORE	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	
	Macrolide export protein MacA, B	CORE	4	4	6	6	6	4	4	7	4	4	
	Multidrug efflux pump subunit AcrA, B, Z	CORE	5	6	5	6	5	5	6	7	5	5	
	Efflux pump BepE, F	CORE	4	2	2	5	2	4	5	5	4	4	
	Multidrug export protein EmrA, B, E	CORE	3	3	3	3	3	4	5	3	3	3	
	Putative multidrug-efflux transporter	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Multidrug export protein AcrF	ACCESS	-	1	1	1	1	-	1	1	-	1	1
	Toluene efflux pump outer membrane protein TtgI	ACCESS	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-
	Multidrug export protein AcrE	SING	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	Efflux pump periplasmic linker BepD	SING	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Virulence	Serralysin	CORE	4	4	4	5	4	4	5	5	4	5	
	Hemolysin	CORE	10	9	7	9	8	10	11	11	7	9	
	Lisozyme inhibitor	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Virulence sensor protein BvgS	CORE	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Virulence factors putative positive transcription regulator BvgA	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Virulence sensor histidine kinase PhoQ	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Type-1 fimbrial protein, A chain	CORE	3	3	2	2	1	2	2	3	1	3	
	Virulence regulon transcriptional activator VirF	SING	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Virulence regulon transcriptional activator VirB	SING	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Quorum sensing	Autoinducer 2 sensor kinase/phosphatase LuxQ	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Putative quorum-quenching lactonase YtnP	CORE	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	

	Quorum-sensing regulator protein G	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	HTH-type quorum sensing-dependent transcriptional regulator RpaR	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Catalase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Catalase-peroxidase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Superoxide dismutase	CORE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Putative deferrochelatase/peroxidase YfeX	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Non-heme chloroperoxidase	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Deferrochelatase/ peroxidase EfeB	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Thiol peroxidase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Glutathione S-transferase	CORE	7	6	6	7	6	7	6	6	7	6
	Thioredoxin reductase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Thioredoxin	CORE	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1
	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	CORE	4	3	3	4	3	4	3	3	4	3
	Organic hydroperoxide resistance protein OhrB	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Others secondary metabolites	Cyclic-di-GMP-binding biofilm dispersal mediator protein	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Histone deacetylase-like amidohydrolase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	(S)-1-Phenylethanol dehydrogenase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Homoprotocatechuate catabolism bifunctional isomerase/decarboxylase	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-keto-3-deoxy-L-fuconate dehydrogenase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-succinylbenzoate--CoA ligase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA hydrolase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Anthranilate 1,2-dioxygenase ferredoxin subunit	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Isochorismate synthase EntC	CORE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Phenylloxazoline synthase MbtB	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Imidazolonepropionase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ureidoglycolate lyase	CORE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trans-aconitate 2-methyltransferase	ACCESS	2	2	2	2	-	1	1	2	1	2	
Polyketide synthase PksM	ACCESS		1		1							1
2-hydroxy-7-methoxy-5-methyl-1-naphthoate--CoA ligase	ACCESS	1		1			1					
2-halobenzoate 1,2-dioxygenase	ACCESS				3							3
Catechol 1,2-dioxygenase	ACCESS				3							3

Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain	ACCESS	1	1	1	1	1	1	1			
Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain	ACCESS	1	1	1	1	1	1	1			
Thermostable monoacylglycerol lipase	ACCESS	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
Glyoxal reductase	SING	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Rhamnolipids biosynthesis 3- oxoacyl-[acyl- carrier-protein] reductase	SING	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Pang: Pan-genome

² Core: gathering all genes common to all strains

³ Access: Accessory, containing genes present between two or $n-1$ strains

⁴ Sing: Singleton, present only in a single strain

⁵ VOCs: volatile organic compounds

⁶ VICs: volatile inorganic compounds

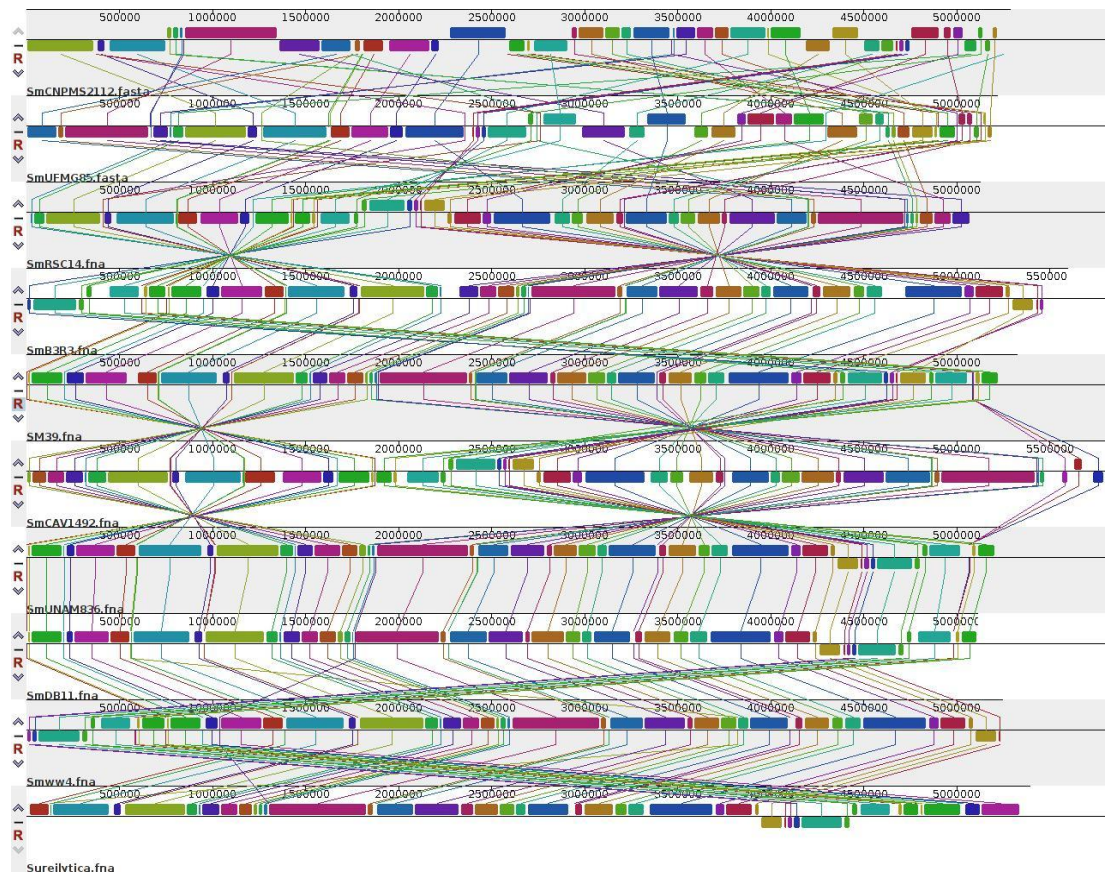


Figure S1: Gene synteny analysis of nine *S. marcescens* and one *S. ureilytica* made using Mauve software ((Darling et al., 2004).

DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, nós usamos de abordagem metataxonômica para caracterizar a estrutura da comunidade microbiana associada à rizosfera do milho cultivado em solo adicionado de FR, sem adição de P e com adição do superfosfato triplo. No geral, o tipo de fertilização de P modificou o perfil da comunidade microbiana (Figura 1, artigo 1). A abundância das OTUs da comunidade de bactéria sofreu maior efeito das fontes de P do que a riqueza, evidenciado pela separação significativa das comunidades dos diferentes tratamentos de P usando a métrica de Unifrac ponderada, que considera as afiliações filogenéticas e a abundância de OTUs (Figura 1a, b, artigo 1). Também, os índices de Shannon e Simpson, que consideram a abundância de OTUs, mostraram valores significativamente maiores para amostras adicionadas de P da comunidade bacteriana (FR- fosfato de rocha e SPT- superfosfato triplo) em relação ao controle não adicionado de P (Tabela 1, artigo 1). Estes resultados contrapõem estudos anteriores que descreveram um aumento da diversidade bacteriana no solo rizosférico que não recebeu fertilização fosfatada (da Silva & Nahas, 2002). Fatores como química do solo, genótipo das plantas, técnicas de manejo e o estágio de crescimento da planta também podem contribuir para as alterações na comunidade bacteriana associada ao milho. Tais fatores podem interferir na resposta e recuperação das bactérias do solo e da rizosfera às perturbações ambientais, principalmente após longos períodos de exposição a tais condições (Castellanos et al., 2009; Cavaglieri & Etcheverry, 2009; Aira et al., 2010; Li et al., 2014). Proteobacteria foi o filo dominante em todos os tratamentos (Figura 2a, artigo 1). Mas alguns táxons deste filo responderam de forma diferente aos tratamentos de P. Enquanto táxons pertencentes à família Enterobacteriaceae (classe Gammaproteobacteria) diminuíram com a adição de SPT e FR, Oxalobacteraceae e Burkholderiaceae (classe Betaproteobacteria) aumentaram com a adição de FR (Figura 2b e 3b, artigo 1). Bacillaceae (Firmicutes) também apresentou uma abundância, significativamente, maior em FR quando comparado ao solo fertilizado com SPT (Figura 3 b, artigo 1). Estes táxons estimulados em resposta ao cultivo com FR são semelhantes aos encontrados na rizosfera de *Phaseolus vulgaris*, como Oxalobacteraceae, Enterobacteriaceae, além de Actinobacteria, Comamonadaceae, Bradirhizobacteriaceae e Pseudomonodaceae (Trabelsi et al., 2017). *Klebsiella* sp., o gênero mais abundante de Enterobacteriaceae (Figura 2 c, artigo 1), tem sido frequentemente encontrado em associação com a cultura de milho (Bruseti et al., 2005; Arruda et al., 2013; Roesch et al., 2007) e compreende espécies capazes de melhorar a solubilização de P (Rajput et al., 2013; Walpola et al., 2014). Neste trabalho, também foram isoladas bactérias do gênero *Klebsiella* sp. da rizosfera de milho cultivado em solo com adição de FR ou sem adição de P (Tabela 1, artigo 2). *Massilia* e *Herbaspirillum* foram os gêneros mais abundantes da família Oxalobacteraceae e já foram descritos como bactérias solubilizadoras de P (Estrada et al., 2013; Wang et al., 2016). *Burkholderia* sp. (Burkholderiaceae) e *Bacillus* sp. (Bacillaceae) também já

foram relatados como agentes solubilizadores eficazes de FR, ambos em ensaios *in vitro* (Gomes et al., 2014; Ghosh et al., 2016) e de inoculação em plantas (Baig et al., 2014; Stephen et al., 2015; Wahid et al., 2016).

A respeito da comunidade fúngica, observou-se que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) sofreram efeito do tratamento de P (Figura S2, artigo 1). De fato, o filo Glomeromycota foi o que apresentou maior variação de abundância entre os tratamentos, sendo o filo mais abundante no solo adicionado do FR (Figura 2d, artigo 1). Entre as famílias de FMA, Gigasporaceae foi significativamente a mais abundante no solo adicionado de RP (Figura 2e, artigo 1). *Racocetra* e *Scutellospora* predominaram nesta família (Figura 2f, artigo 1). O nosso grupo de pesquisa tem isolado representantes de Gigasporaceae na rizosfera de milho cultivado em solos com baixo teor de P, especialmente do gênero *Racocetra* sp. (dados não publicados). A família Acaulosporaceae também apresentou um aumento significativo em sua abundância no solo adicionado de FR quando comparado ao solo com SPT ($p < 0,05$) (Figura 3 c, d, artigo 1). O crescimento do milho (Tabela S3, artigo 1) pode estar relacionado à maior absorção de P devido à presença de FMA no solo adicionado do FR, uma vez que a simbiose FMA-planta provê uma oferta maior de P para plantas em solos com baixa disponibilidade desse nutriente (Nouri et al., 2014). *Mortierella* sp. também apresentou grande abundância em solo fertilizado com FR (Figura 2 f, artigo 1) e já foi relatado como solubilizador de FR (Osorio & Habte, 2013; Vega et al., 2015). Além disso, efeitos sinérgicos da inoculação de *Mortierella* sp. e FMA para a absorção P e crescimento da planta também foram descritos (Zhang et al., 2011; Osorio & Habte, 2013).

Alguns estudos relataram bactérias como simbioses de hifas de FMA. Estas são denominadas de "bactérias helper" por estimularem o crescimento micelial e/ou inibirem organismos competidores e antagonistas (Frey-Klett et al., 2007, Offre et al., 2008; Scheublin et al., 2010). Diversos gêneros encontrados neste estudo já foram relatados como simbioses de FMA, incluindo *Massilia* sp. (Cruz et al., 2008), *Burkholderia* sp. e *Bacillus* sp. (Levy et al., 2003). Assim, a alta abundância desses gêneros no solo fertilizado com FR poderia estar associada à maior abundância de FMA neste tratamento (Figura 2c e 2f, artigo 1). Esses microrganismos podem estar contribuindo para o aumento do teor de P no solo fertilizado com o FR ao longo dos três anos de cultivo, assim como para a absorção de P pelas plantas, o que poderia explicar a correlação entre o crescimento do milho, o conteúdo de P no solo e a comunidade microbiana detectada tanto nos tratamentos adicionados tanto de SPT como de FR (Figura 4, artigo 1).

Assim como observado por meio dos métodos independentes de cultivo no artigo 1, nos resultados baseados em cultivo das bactérias isoladas do solo rizosférico de milho cultivado com FR e sem P, houve predominância do filo Proteobacteria, destacando-se os gêneros *Klebsiella* sp. no solo adicionado de FR e *Enterobacter* sp. no solo sem adição de P (Tabela 1, artigo 2). Estes

gêneros já foram relatados como solubilizadores de P (Ikeda et al., 2013) assim como neste trabalho (Figura 1, artigo 2). Os valores de P solubilizado à partir do FA (FA: fosfato de rocha da mineração de Araxá) foram superiores aos detectados no tratamento com fosfato de ferro (PFe), tanto para a comunidade de bactérias endofíticas quanto para as rizosféricas. De fato, os fosfatos ligados ao cálcio, como no caso do FA, apresentam maior solubilidade do que o fosfato ligado ao ferro e ao alumínio (Viégas et al., 2010). A bactéria SmUFMG85 apresentou os maiores valores de solubilização do FA ($p < 0,05$), liberando 269 mg L^{-1} de P ao final dos dois dias de incubação. Estes valores podem ser considerados altos quando comparados com o valor de $100,7 \text{ mg L}^{-1}$ de P liberado após 10 dias de contato com FA pela bactéria *Burkholderia cepacea*, também isolada da rizosfera de milho (Gomes et al., 2015). Contudo, dependendo do tipo de fosfato, valores maiores de solubilização podem ser encontrados, como no trabalho de Mardad e colaboradores (2014), que observaram a liberação de 866 mg L^{-1} de P após a otimização da solubilização do fosfato tricálcio P. A. por *Enterobacter hormaechei*. Outro achado importante foi a correlação entre o P solubilizado a partir do FA e a redução dos valores de pH no meio (Figura 2, artigo 2). A acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos ou pela liberação de íons H^+ são mecanismos relatados como responsáveis pela disponibilização do P a partir de fontes insolúveis, como os FRs (Illmer & Schinner, 1995). Além disso, a eficiência dos ácidos orgânicos na solubilização de P está relacionada à formação de complexos e à quelatação de íons no meio que deixam de se ligarem ao P liberando-o solução (Mendes et al., 2013). Interessantemente, a bactéria SmUFMG85, que se destacou em disponibilizar o P a partir do FA foi a que apresentou o maior número de genes relacionados ao metabolismo de diferentes ácidos orgânicos, como os ácidos glucônico, ketoglucônico, láctico, cítrico e oxálico (Tabela 2).

No caso do PFe, *Pantoea ananatis* UFMG54 foi a bactéria mais eficiente ($p < 0,05$), liberando $50,8 \text{ mg L}^{-1}$ de P no meio (Figura 1, artigo 2). Estes valores são maiores do que o encontrado para *Pantoea agglomerans* isolada da rizosfera de soja que liberou 28 mg L^{-1} de P do PFe (Son et al., 2006). Porém, são menores do que os valores encontrados para o fungo *Aspergillus niger* (Barroso & Nahas, 2008; Silva et al., 2014). A solubilização do PFe por *A. niger*, em meio de cultura, foi de cerca de 900 mg L^{-1} de P liberado no ponto máximo de solubilização do PFe após 11 dias de incubação (Barroso & Nahas, 2008). Em outro estudo, mutantes de *A. niger* solubilizam cerca de 70 mg L^{-1} de P a partir do PFe no período de 60 horas de incubação (Silva et al., 2014).

No geral, a comunidade bacteriana apresentou padrão de solubilização de P independente de taxonomia, sendo observado representantes de um mesmo gênero nos três grupos gerados pela análise de Kmeans considerando o P solubilizado. Foi observado também um maior potencial de solubilização de P (tanto no FA quanto no PFe) pelas bactérias endofíticas em relação às rizosféricas (Figura 1, artigo 2). Este efeito do local de isolamento das bactérias associadas ao milho

e a solubilização de P ainda precisa ser melhor investigado, já que inúmeros trabalhos relatam este potencial tanto para bactérias isoladas de tecidos internos de milho (Ikeda et al., 2013, Oteino et al., 2015; Matos et al., 2017) quanto da rizosfera (Massenssini et al., 2016; Wang et al., 2016), inclusive de milho (Gomes et al., 2014).

Dentre as nove bactérias avaliadas nos ensaios de promoção do crescimento de milheto, se destacaram os isolados *Ochrobactrum sp.* CNPMS2088, *B. megaterium* UFMG50 e *S. marcescens* CNPMS2112 (SmCNPMS2112) (Figura 3, artigo 2). Estas já foram relatadas em diversos estudos como promotoras do crescimento de plantas (Selvakumar et al., 2008; Kang et al., 2014, Mishra et al., 2017). *Ochrobactrum* promoveu o aumento da biomassa de raízes, parte aérea e número de folhas de plantas de milho, além de apresentar tolerância aos estresses abióticos de temperatura, salinidade e seca (Mishra et al., 2017). Muitos fatores de promoção do crescimento de plantas são atribuídos a este gênero, como atividade de ACC desaminase, fixação de nitrogênio, solubilização de P, produção de ácido indol acético (AIA), capacidade de formação de biofilme e indução da resistência sistêmica das plantas (Magalhães et al., 2001; Bal et al., 2013; Bogino et al., 2013; Sumayo et al., 2013; Meng et al. 2014). A inoculação de *B. megaterium* em mutantes de *Arabidopsis* deficientes na sinalização de auxina ou etileno contribuiu para um aumento do número de raízes laterais, crescimento de raízes laterais e comprimento de raiz, resultando num aumento da biomassa total da planta (López-Bucio et al., 2007). Esta bactéria tem sido usada também na formulação de bioinoculantes que visam o aumento no suprimento de N e P para as plantas, juntamente com *Azotobacter chroococcum* (Kloepper et al., 1989; Rodríguez & Fraga, 1999). *S. marcescens* também aumentou o conteúdo de P no solo, a absorção de P e o crescimento de plantas (Gupta et al., 2012), sendo que a sua inoculação em sementes de milho aumentou em 85 % o rendimento de grãos em cultivo de campo (Hameeda et al., 2008).

Interessantemente, estas nove bactérias avaliadas nos ensaios de promoção do crescimento de milheto apresentaram genes relacionados a produção de fitohormônios, como AIA e citocininas (Tabela 2), que estão diretamente relacionados a expansão radicular (Marchant et al., 2002; Jang, et al., 2015), e genes relacionados a produção de ácidos orgânicos que já foram descritos para a solubilização de FR (Ivanova et al., 2006; Prijambada et al., 2009). Estas características combinadas podem ser um dos mecanismos responsáveis pelo, significativo, aumento dos parâmetros de crescimento das plantas de milheto avaliadas neste estudo. Contudo, a regulação da expressão dos genes investigados precisa ser considerada, uma vez que entre as bactérias testadas, embora todas apresentem genes relacionados a tais funções, estas apresentaram distinto perfil de promoção do crescimento do milheto no sistema de inoculação solo-planta.

Tendo em vista os resultados dos experimentos baseados em cultivo, buscamos investigar mais detalhadamente os genomas de duas dessas bactérias: SmUFMG85, que se destacou na

solubilização do FA *in vitro*, e SmCNPMS2112, que promoveu o crescimento do milho nos ensaios de casa de vegetação, e compará-los com os genomas disponíveis de *Serratia* spp. isoladas de diferentes estilos de vida.

Verificamos que, embora o perfil das categorias funcionais seja muito semelhante para os dois genomas de *Serratia marcescens* avaliados neste estudo (SmUFMG85 e SmCNPMS2112) (Figura 1a, artigo 3), existem algumas funções importantes que são únicas para cada um desses genomas. Esse fato reforça a importância do estudo dessas duas linhagens, dado que uma alta diversidade genotípica de populações de bactérias ambientais tem sido encontrada tanto no nível de similaridade de sequência entre os genes compartilhados quanto no nível do conteúdo genético (Thompson et al., 2005; Kettler et al., 2007; Fraser et al., 2009; Cordero & Polz, 2014). Por exemplo, no genoma de SmCNPMS2112, foram encontradas características únicas relacionadas ao uso de hidrocarbonetos aromáticos e arsênico (Tabela S2, artigo 3) além da presença de enzimas quitinases e endoglucanases. Todas essas características podem conferir capacidade para colonizar ambientes com diferentes fontes de carbono, bem como a capacidade de competir com fungos e degradar polímeros vegetais. Já SmUFMG85 apresentou a enzima Oxalato decarboxylase OxdC, associada à capacidade de catabolizar o ácido oxálico (Tabela S2, artigo 3). O papel desta enzima ainda não é totalmente entendido, mas estudos com *B. subtilis* têm sugerido que ela atua na proteção das células bacterianas contra o estresse por baixo pH, ao consumir prótons via descarboxilação do ácido oxálico (Tanner & Bornemann, 2000; MacLellan et al. 2009). O ácido oxálico é um dos ácidos importantes produzidos por microrganismos durante a solubilização do FR (Silva et al., 2014). Dessa forma, a presença desta enzima no genoma de SmUFMG85 pode contribuir para o controle da concentração desse ácido no meio e assim minimizar sua ação antibacteriana, permitindo assim, que esta bactéria atinja altos teores de P solubilizado no meio como detectado nos ensaios de solubilização de P *in vitro* (Figura 1a, artigo 2). A produção de ramnolipídeos também foi detectada apenas no genoma de SmUFMG85. Esta é uma molécula com atividade antimicrobiana e está envolvida na motilidade, adesão à superfícies, formação de biofilmes, na absorção e biodegradação de substratos hidrofóbicos, além de atuar como moduladores imunológicos e como fator de virulência (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Outro achado importante, é a presença do sistema CRISPR nos genomas, sendo 2 conjuntos em SmUFMG85 e 3 no genoma de SmCNPMS2112. O sistema Crispr- Cas constitui uma imunidade adaptativa que protege as bactérias de DNA exógeno provenientes de bacteriófagos e plasmídeos (Hynes et al., 2014). Também com base nos clusters de genes únicos (Figura 2, artigo 3), o genoma de SmUFMG85 possui um conjunto para a síntese de homoserina lactona (AHL) que pode estar associada ao controle do sistema “quorum sensing” (Van Houdt et al., 2006), além de promover o crescimento de plantas e contribuir para a resistência vegetal contra patógenos (Klein et al., 2009).

Em contraste, SmCNPMS2112 apresenta um conjunto de genes para a síntese de prodigiosina, pigmento responsável pela coloração avermelhada de algumas colônias de *S. marcescens* e tem sido associada a atividade antifúngica, antibacteriana, imunossupressora e antiproliferativa (Khanafari et al., 2006; Duzhak et al., 2012).

De acordo com a análise comparativa de famílias ortólogas de proteínas, entre os 21 gêneros de *Serratia* observamos 2658 proteínas conservadas e o maior número de singletons foi encontrado para *S. fonticola* DSM4576 isolada de água e *S. fonticola* isolada de planta, correspondendo a 434 e 556, respectivamente (Figura 3a, artigo 3). O tamanho do genoma microbiano sofre o efeito da pressão de seleção exercida pelo ambiente. Quando a bactéria está em um ambiente que sofre inúmeras variações, eventos de ganho e perda de genes são mais esperados do que em condições estáveis (Rouli et al., 2015). Sendo que em condições mais estáveis, algumas funções podem se tornar desnecessárias e, eventualmente, serem perdidas, e esse saldo de perdas e ganhos das funções constituem o pangenoma um dado grupo de organismos (Rouli et al., 2015). Curiosamente, verificamos um perfil muito semelhante na formação de grupos das duas árvores filogenéticas construídas, uma com o genoma completo e outra utilizando apenas as regiões compartilhadas entre os genomas (Figura 3b, c). Isto indica que as regiões acessórias (variável entre os genomas) incluídas na análise utilizando os genomas completos não contribuíram para a diferenciação filogenética entre estas bactérias. Observamos também um número significativo de proteínas compartilhadas para todas as funções relacionadas aos nichos endofítico ou patogênico dos dez genomas investigados, independentes do estilo de vida de cada um (Tabela 1, artigo 3). Uma possível explicação para a alta semelhança entre as filogenias a partir do alinhamento de todo o genoma e do alinhamento apenas das proteínas compartilhadas pode ser devido a importante contribuição de muitas dessas características tanto para o estilo de vida endofítico quanto para o patogênico. Por exemplo, funções que conferem grande capacidade competitiva como aquisição de Fe, adesão, motilidade, inativação de espécies reativas de oxigênio (ERO), além de funções relacionadas à resistência aos antibióticos, são cruciais tanto para as bactérias que colonizam os espaços endofíticos como para os patogênicos (Letoffe et al., 1994; Wiles et al., 2008; Taghavi et al., 2010; Ali et al., 2014; López-Fernández et al., 2015). A genômica comparativa de isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*, também mostrou um alto grau de conservação entre isolados de diferentes ambientes (Grosso-Becerra et al., 2014). De acordo com os autores, a baixa variabilidade genômica poderia ser explicada se as cepas clínicas constituírem uma subpopulação da espécie, inicialmente de distribuição ambiental, que passou a expressar fatores de virulência devido à proximidade com populações humanas. Além disso, as regiões compartilhadas pelas linhagens de *P. aeruginosa* constituem uma grande proporção do pangenoma quando comparadas às regiões exclusivas (Grosso-Becerra et al., 2014). A presença de fatores de virulência também foi

encontrada em regiões compartilhadas nos pangenomas de diferentes táxons de enterobactérias, como espécies que representam importantes patógenos humanos e vegetais, mas também incluindo linhagens benéficas (López-Fernández et al., 2015).

Genes responsáveis por características mais específicas para a definição de nichos, como a produção de fitohormônios, COVs e degradação de polímeros de planta, para os endofíticos, ou de virulência e resistência a antimicrobianos para bactérias patogênicas, embora estejam presentes em todos os genomas, podem não ser expressos em todos os ambientes, por não serem de síntese constitutiva. Além disso, observamos a existência de um grande número de proteínas únicas (singletons) e acessórias (estão em dois ou mais genomas, mas não em todos) associadas a categoria (COG) de transcrição (Figura 4, artigo 3), sugerindo uma possível variação na regulação da expressão gênica entre esses genomas. Nós também verificamos que a maioria das regiões únicas estão anotadas como de função desconhecida, o que ocorreu para todos os genomas (Figura 4, artigo 3), provavelmente devido à limitação dos bancos de dados de referência. Esse fato também dificulta uma melhor resolução das comparações entre a fonte de isolamento e as funções encontradas nos genomas analisados.

Neste estudo, encontramos um grande número de regiões acessórias e singletons presentes em ilhas genômicas tanto para SmUFMG85 (Figura 5a, artigo 3) quanto para SmCNPMS2112 (Figura 5b, artigo 3). Outros estudos observaram este padrão, funções únicas associadas às ilhas genômicas e mobiloma (Coleman et al., 2006; Basharat et al., 2016). Essas ilhas são geralmente relatadas como portadoras de genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência, genes de fitness e de enzimas catabólicas que resultam em propriedades metabólicas e fisiológicas adaptativas (Hacker e Kaper, 2000). Neste estudo, as ilhas genômicas de SmUFMG85 apresentaram características relacionadas à colonização, conjugação, aquisição de Fe, produção de ramnolipídeos, além do potencial de virulência como o sistema de toxina-antitoxina, hemolisina, lipoproteína de translocação de polissacarídeos capsulares (Wza) e sistema tripartido de resistência a múltiplos fármacos. Nas ilhas do genoma SmCNPMS2112 também foram encontradas proteínas relacionadas à colonização de tecidos vegetais, aquisição de Fe, quitinase, bacteriocina e virulência, além do sistema de secreção Tipo 2 (T2SS), Tipo 3 (T3SS) e Tipo 6 (T6SS). O T6SS é um dos sistemas de secreção descobertos recentemente, encontrado amplamente em bactérias gram-negativas, podendo estar presente em bactérias com estilo de vida tanto comensal como patogêna de plantas (Bernal et al., 2017). Essa distribuição uniforme entre comensais e patógenos sugere que o T6SS não se restringe à virulência, mas também pode oferecer vantagens de fitness e colonização de plantas (Bernal et al., 2017). Em relação ao T2SS, observa-se maior frequência deste em bactérias patogênicas (Sandkvist, 2001). No entanto, recentemente, também foi detectado em bactérias não patogênicas ou que raramente causam doenças, como *Azoarcus*, *Bradyrhizobium*,

Chromobacterium, *Mesorhizobium*, *Caulobacter*, *Gluconacetobacter*, *Marinobacter*, *Methylococcus*, *Pseudoalteromonas* e *Pseudomonas* (Cianciotto e White, 2017). Entre essas bactérias, existem algumas que estabelecem relações simbióticas com plantas, outras que habitam solo, água doce e / ou água salgada (Arrieta et al., 2004; Evans et al., 2008; Hempel et al., 2009; Le Blastier et al., 2010). Outra característica exclusiva das linhagens deste estudo foi a ocorrência de algumas regiões associadas ao sistema CRISPR localizado em distintas regiões únicas de SmUFMG85 (Figura 5a, artigo 3) e SmCNPMS2112 (Figura 5b, artigo 3), sugerindo que o nicho ocupado por essas bactérias (raízes de milho) pode ter desencadeado essa adaptação contra a predação de diferentes fagos. Genes que mostram baixas frequências na população geralmente estão inseridos em regiões de alta variabilidade e podem conferir vantagem adaptativa durante uma rápida mudança nas interações ecológicas (Cordero & Polz, 2014).

CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados da análise de diversidade da comunidade microbiana associada ao milho cultivado em diferentes fontes de P observamos uma maior abundância de táxons fúngicos e bacterianos relacionados à solubilização/aquisição de P no solo fertilizado por FR. Os principais grupos encontrados nas comunidades bacteriana foram *Herbaspirillum* sp. e *Massilia* sp. pertencentes à família Oxalobacteraceae e os gêneros *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp. e *Klebsiella* sp.. Para a comunidade de fungos, encontramos principalmente *Scutellospora* sp. e *Racocetra* sp. da família Gigasporaceae e os gêneros *Acaulospora* sp. e *Mortierella* sp.. Esses microrganismos podem ter contribuído para o aumento do conteúdo de P no solo adicionado do FR avaliado no final dos três anos de cultivo e para a absorção de P pelas plantas, resultando em maior produção de biomassa e de grãos nas plantas de milho. Esses valores observados foram similares aos das plantas cultivadas em solo adicionado da fonte de P solúvel.

Com relação aos resultados da avaliação de bactérias isoladas da rizosfera e endofíticas quanto ao potencial de solubilização de P, observamos que a classe gamaproteobacteria foi predominante nas culturas obtidas após o enriquecimento com RP (cerca de 94 % do total) sendo representadas, principalmente, por bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*. Dentre as fontes de P avaliadas, o fosfato de Araxá foi mais solubilizado do que o fosfato de ferro; e independente da fonte de P, as bactérias endofíticas foram as mais eficiente no processo de solubilização de P. Além disso, oito das nove bactérias avaliadas quanto à capacidade de promoção do crescimento do milho *in vivo* contribuíram para a melhoria de no mínimo um dos parâmetros de crescimento desta planta, com destaque para os isolados *Bacillus megaterium* UFMG50, *Ochrobactrum* sp.

CNPMS2088 e SmCNPMS2112. Essas bactérias apresentaram genes relacionados ao metabolismo de P, produção de ácidos orgânicos e de fitohormônios.

De acordo com a análise de genômica comparativa dos genomas de bactérias do gênero *Serratia*, observamos uma conservação de características relacionadas à colonização e promoção do crescimento de plantas assim como de patogenicidade. Dessa forma, sugerimos que as diferenças que definem um determinado estilo de vida entre as *Serratia* avaliadas, provavelmente, estão mais relacionados às variações na expressão gênica do que no conteúdo genômico per se. No entanto, muitas proteínas em regiões únicas desses genomas não puderam ser comparadas devido ao desconhecimento de sua função nas anotações dos bancos de dados de referência. Além disso, verificamos a importância do mobiloma de SmUFMG85 e SmCNPMS2112, especialmente no associado às ilhas genômicas, para a aquisição de diversas funções que conferem capacidade de adaptação à planta hospedeira, bem como a outros ambientes. Esses resultados são importantes para uma melhor compreensão da adaptação genômica de linhagens de *S. marcescens* em relação a outras similares, em especial as que se associam às plantas.

REFERÊNCIAS – partes gerais

Abbott, L K, A D Robson, and G de Boer. 1984. “the effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*.” *New Phytologist* 97(3): 437–46.

Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1323-1336.

Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME journal*, 2(12), 1221.

Aira, Manuel et al. 2010. “Plant Genotype Strongly Modifies the Structure and Growth of Maize Rhizosphere Microbial Communities.” *Soil Biology and Biochemistry* 42(12): 2276–81.

Amijee, F, P B Tinker, and D P Stribley. 1989. “The Development of Endomycorrhizal Root Systems.” *New Phytologist* 111(3): 435–46.

Araujo, F. D. A., & de Vasconcelos, R. M. (2017) Conhecendo as exigências legais e técnicas aplicáveis às atividades de pesquisa e desenvolvimento de inoculantes. *Área de Informação da Sede-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)*.

Arrieta JG, Sotolongo M, Menendez C, Alfonso D, Trujillo LE, Soto M, Ramirez R, Hernandez L. (2004). A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol* 186:5031–5039. doi:10.1128/JB.186.15.5031-5039

Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., et al. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L) in Rio Grande do Sul State (south Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Appl. Soil Ecol.* 63, 15–22

Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.

Alvarez MI, Sueldo RJ, Barassi CA (1996) Effect of *Azospirillum* on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress. *Cereal Res Commun* 24:101–107

Baig, K. S., Arshad, M., Khalid, A., Hussain, S., Abbas, M. N., and Imran, M. (2014). Improving growth and yield of maize through bioinoculants carrying auxin production and phosphate solubilizing activity. *Soil Environ.* 33,159–168.

Bais, H. P.; Park, S.-W.; Weir, T. L.; Callaway, R. M.; Vivanco, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 1, p. 26–32, 2004.

Bal HB, Nayak L, Das S and Adhya TK (2013) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366:93-105.

Banat, I. M.; Rienzo, M. A. D.; Quinn, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 9915-9929, 2014.

Barroso, C. B., & Nahas, E. (2008). Solubilization of hardly soluble iron phosphate in culture médium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(4), 529-535.

Bedin I, Furtini Neto AE, Resende AV, Faquin V, Tokura AM & Santos JZL (2003) Fertilizantes fosfatados e produção da soja em solos com diferentes capacidades tampão de fosfato. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 639-646.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.

Bigham, J M et al. 1978. “Iron Oxide Mineralogy of Well-Drained Ultisols and Oxisols: II. Influence on Color, Surface Area, and Phosphate Retention.” *Soil Science Society of America Journal* 42(5): 825–30.

Blackwell, Meredith. 2011. “The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species?” *American Journal of Botany* 98 (3):426–38.

Bogino PC, Oliva MDLM, Sorroche FG, Giordano W (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int J Mol Sci* 14:15838–15859

Bolan, Nanthi S, R Naidu, S Mahimairaja, and S Baskaran. 1994. “Influence of Low-Molecular-Weight Organic Acids on the Solubilization of Phosphates.” *Biology and Fertility of Soils* 18(4): 311–19.

Bray, J Roger, and John T Curtis. 1957. “An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin.” *Ecological monographs* 27(4): 325–49.

Bruseti, L., Francia, P., Bertolini, C., Pagliuca, A., Borin, S., Sorlini, C., et al. (2005). Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant Soil* 266, 11–21.

Castellanos, T., Dohrmann, A. B., Imfeld, G., Baumgarte, S., and Tebbe, C. C. (2009). Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 383–393

Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ (1999) Screening for plant growth rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J* 63:1670–1680

Cavaglieri, L., Orlando, J., and Etcheverry, M. (2009). Rhizosphere microbialcommunity structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiol. Res.* 164, 391–399.

Chaves DP, Zucareli C & Junior AdO (2013) Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. *Ciências Agrárias* 34: 57-72.

Chaudhry, V., & Patil, P. B. (2016). Genomic investigation reveals evolution and lifestyle adaptation of endophytic *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific reports*, 6, 19263.

Chelius, M K, and E W Triplett. 2001. “The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea Mays* L.” *Microbial Ecology* 41(3): 252–63.

Chen, Jun et al. 2012. “Associating Microbiome Composition with Environmental Covariates Using Generalized UniFrac Distances.” *Bioinformatics* 28 (16): 2106–13.

Chu, Byron C et al. 2010. “Siderophore Uptake in Bacteria and the Battle for Iron with the Host; a Bird’s Eye View.” *Biometals* 23(4): 601–11.

Compant, Stéphane, Christophe Clément, and Angela Sessitsch. 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: 669–78.

- Cordero, O. X., and Polz, M. F. (2014). Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 263-273.
- Cruz, A. F., Horii, S., Ochiai, S., Yasuda, A., and Ishii, T. (2008). Isolation and analysis of bacteria associated with spores of *Gigaspora margarita*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1711–1717
- Dellagi, Alia et al. 2009. “Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status.” *Plant physiology* 150(4): 1687–96.
- Duzhak, A. B., Panfilova, Z. I., Duzhak, T. G., Vasyunina, E. A., & Shternshis, M. V. (2012). Role of prodigiosin and chitinases in antagonistic activity of the bacterium *Serratia marcescens* against the fungus *Didymella applanata*. *Biochemistry (Moscow)*, 77(8), 910-916.
- Estrada, Paulina et al. 2002. “A N₂-Fixing Endophytic Burkholderia Sp. Associated with Maize Plants Cultivated in Mexico.” *Canadian journal of microbiology* 48(4): 285–94.
- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., de Oliveira, D. M., Urquiaga, S., and Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* 369, 115–129.
- Evans, F. F., Egan, S., & Kjelleberg, S. (2008). Ecology of type II secretion in marine gammaproteobacteria. *Environmental microbiology*, 10(5), 1101-1107.
- Fallik, Elazar, Shlomo Sarig, and Yaacov Okon. 1994. “Morphology and Physiology of Plant Roots Associated with *Azospirillum*.” *Azospirillum/plant associations*: 77–85.
- Figueiredo, José Edson Fontes et al. 2009. “Molecular Analysis of Endophytic Bacteria from the Genus *Bacillus* Isolated from Tropical Maize (*Zea Mays* L.) .” *Brazilian Journal of Microbiology* 40 : 522–34.
- Fisher, P J, O Petrini, and H M Lappin Scott. 1992. “The Distribution of Some Fungal and Bacterial Endophytes in Maize (*Zea Mays* L.)” *New Phytologist* 122(2): 299–305. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb04234.x>.
- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70.
- Fraser, C., Alm, E. J., Polz, M. F., Spratt, B. G. and Hanage, W. P. (2009) The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* 323, 741–746.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. A., and Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36.
- Gagné, S.; Richard, C.; Rouseau, H.; Antoun, H. (1987) Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.*, 33: 996-1000
- Gans, Jason, Murray Wolinsky, and John Dunbar. 2005. “Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil.” *Science* 309(5739):1387–90.
- Gerke, J. (2015). Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. a review. *Plants*, 4: 253-266.
- Giagnoni, Laura et al. 2016. “Availability of Different Nitrogen Forms Changes the Microbial Communities and Enzyme Activities in the Rhizosphere of Maize Lines with Different Nitrogen Use Efficiency.” *Applied Soil Ecology* 98:30–38.
- Glick BR, Pasternak JJ (2003) Plant growth promoting bacteria. In: Glick BR, Pasternak JJ (eds) *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*, 3rd edn. ASM Press, Washington, pp 436–454
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Ghosh, R., Barman, S., Mukherjee, R., and Mandal, N. C. (2016). Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal. India. *Microbiol. Res.* 183, 80–91.
- Goldstein, Alan, Trevor Lester, and Jacquelyn Brown. 2003. “Research on the Metabolic Engineering of the Direct Oxidation Pathway for Extraction of Phosphate from Ore Has Generated Preliminary Evidence for PQQ Biosynthesis in *Escherichia Coli* as Well as a Possible Role for the

Highly Conserved Region of Quinoprotein Dehydrogenases.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1647(1): 266–71.

Goldstein AH (1996) Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria; Washington, DC. ASM Press. pp. 197–203.

Gomes, E. A., Silva, C. U., Marriel, I. E., Oliveira, C. A., and Lana, U. P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Rev. Bras. Milho Sorgo* 13, 69–81. doi: 10.18512/1980-6477/rbms.v13n1p 69-81

Gomes, Eliane A et al. 2015. “Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in the Roots of Maize Lines Contrasting for Al Tolerance Grown in Limed and Non-Limed Brazilian Oxisoil.” *Journal of microbiology and biotechnology* 25(7): 978–87.

Gomes, Newton C Marcial et al. 2003. “Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7): 3758–66. <http://aem.asm.org/content/69/7/3758.abstract>.

Goodfellow, Michael, and Erko Stackebrandt. 1991. *5 Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. J. Wiley.

Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., & Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological research*, 167(6), 358-363.

Haas, Hubertus, Martin Eisendle, and B Gillian Turgeon. 2008. “Siderophores in Fungal Physiology and Virulence.” *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 149–87.

Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., & Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*, 163(2), 234-242.

Hardoim, Pablo et al. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471.

Hardoim, Pablo R, Cristiane C P Hardoim, Leonard S Van Overbeek, and Jan Dirk Van Elsas. 2012. “Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages.” *PLoS One* 7(2): e30438.

Harrison AF (1987) Soil Organic Phosphorus—A Review of World Literature. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, p 257

Hempel, J., Zehner, S., Göttfert, M., & Patschkowski, T. (2009). Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of biotechnology*, 140(1), 51-58.

Hungria, Mariangela, Rubens José Campo, and I C Mendes. 2007. *A Importância Do Processo de Fixação Biológica Do Nitrogênio Para a Cultura Da Soja: Componente Essencial Para a Competitividade Do Produto Brasileiro*. Embrapa Soja Londrina.

Hynes, A. P., Villion, M., & Moineau, S. (2014). Adaptation in bacterial CRISPR-Cas immunity can be driven by defective phages. *Nature communications*, 5, 4399.

Ikeda, Angela Cristina et al. 2013. “Morphological and Genetic Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from Roots of Different Maize Genotypes.” *Microbial Ecology* 65(1): 154–60. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0104-0>.

Illmer, P, and F1 Schinner. 1995. “Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates—solubilization Mechanisms.” *Soil Biology and Biochemistry* 27(3): 257–63.

Ivanova, R. P., Bojinova, D. Y., Gruncharov, I. N., & Damgaliev, D. L. (2006). The solubilization of rock phosphate by organic acids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 181(11), 2541-2554.

James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P., Johnston Monje, David Morris. 2011. “Microbial ecology of endophytic bacteria in zea species as influenced by plant genotype, seed origin, and soil environment.”

Jang, G., Lee, J. H., Rastogi, K., Park, S., Oh, S. H., & Lee, J. Y. (2015). Cytokinin-dependent secondary growth determines root biomass in radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of experimental botany*, 66(15), 4607-4619.

- Johnston-Monje, David et al. 2016. "Bacterial Populations in Juvenile Maize Rhizospheres Originate from Both Seed and Soil." *Plant and Soil*: 1–19.
- Johnston-Monje, David, and Manish N Raizada. 2011. "Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology." *PLoS ONE* 6(6): e20396. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>.
- Jones, David L. 1998. "Organic Acids in the Rhizosphere—a Critical Review." *Plant and soil* 205(1): 25–44.
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., Lee, K. E., & Kim, J. H. (2014). Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian journal of microbiology*, 54(4), 427-433.
- Kettler, G. C. et al. (2007) Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genet.* 3: e231.
- Khan AR, Ullah I, Khan AL, Park GS, Waqas M, Hong SJ et al. (2015) Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22: 14032–42.
- Khan, A. R., Park, G. S., Asaf, S., Hong, S. J., Jung, B. K., & Shin, J. H. (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PloS one*, 12(2), e0171534.
- Khanafari, A., Assadi, M. M., & Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6(1), 1-13.
- Koehler, P., & Wieser, H. (2013). Chemistry of cereal grains. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 11-45). Springer, Boston, MA.
- Klein, I., von Rad, U., & Durner, J. (2009). Homoserine lactones: do plants really listen to bacterial talk?. *Plant signaling & behavior*, 4(1), 50-51.
- Klopper, Joseph W, John Leong, Martin Teintze, and Milton N Schroth. 1980. "Pseudomonas Siderophores: A Mechanism Explaining Disease-Suppressive Soils." *Current Microbiology* 4(5): 317–20.
- Klopper, Joseph W, Ran Lifshitz, and Robert M Zablutowicz. 1989. "Free-Living Bacterial Inocula for Enhancing Crop Productivity." *Trends in biotechnology* 7(2): 39–44.
- Koide, Roger T. 1991. "Nutrient Supply, Nutrient Demand and Plant Response to Mycorrhizal Infection." *New phytologist* 117(3): 365–86.
- Koide, Roger T, and Mingguang Li. 1990. "On Host Regulation of the Vesicular—arbuscular Mycorrhizal Symbiosis." *New Phytologist* 114(1): 59–74.
- Kpombrekou-a, K, and M A Tabatabai. 1994. "effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks." *Soil Science* 158(6): 442 – hyhen.
- Ladha, J. K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 894-906.
- Le Blastier S, Hamels A, Cabeen M, Schille L, Tilquin F, Dieu M, Raes M, Matroule JY. 2010. Phosphate starvation triggers production and secretion of an extracellular lipoprotein in *Caulobacter crescentus*. *PLoS One* 5:e14198. doi:10.1371/journal.pone.0014198.
- Levy, A., Chang, B. J., Abbott, L. K., Kuo, J., Harnett, G., and Inglis, T. J. (2003). Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6250–6256.
- Li, X. Z., Rui, J. P., Mao, Y. J., Yannarell, A., and Mackie, R. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol. Biochem.* 68, 392–401.
- Liu, Yang et al. 2012. "Study on Diversity of Endophytic Bacterial Communities in Seeds of Hybrid Maize and Their Parental Lines." *Archives of Microbiology* 194(12): 1001–12. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-012-0836-8>.

- Liu, Y., Zuo, S., Zou, Y., Wang, J., & Song, W. (2013). Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of microbiology*, 63(1), 71-79.
- Loaces, Inés, Lucía Ferrando, and Ana Fernández Scavino. 2011. "Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice." *Microbial ecology* 61(3): 606–18.
- Loper, J. E., & Gross, H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 265-278.
- Lopes AS, Silva CAP & Bastos ARR (2004) Reservas de fosfatos e produção de fertilizantes fosfatados no Brasil e no mundo. Fósforo na agricultura brasileira,(Yamada T & Badalla SRS, eds.), pp. 1-11. Potatos, Piracicaba.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 207-217.
- Lopez-Fernández, S., Sonogo, P., Moretto, M., Pancher, M., Engelen, K., Pertot, I., & Campisano, A. (2015). Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils similarities and differences between endophytes and other symbiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 419.
- Lozupone, Catherine, and Rob Knight. 2005. "UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities." *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 8228–35.
- Lundberg, Derek S et al. 2012. "Defining the Core *Arabidopsis Thaliana* Root Microbiome." *Nature* 488(7409): 86–90.
- MacLellan SR, Helmann JD, Antelmann H (2009) The YvrI alternative δ factor is essential for acid stress induction of oxalate decarboxylase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191:931–939
- Magalhães Cruz L, de Souza EM, Weber O, Baldani JI, Dçbereiner J, Oliveira Pedrosa F (2001) 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl and Environ Microbiol* 67:2375–2379
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell*, 14(3), 589-597.
- Mardad, I., Serrano, A. and Soukri, A. (2014) Effect of carbon, nitrogen sources and abiotic stress on phosphate solubilization by bacterial strains isolated from a Moroccan rock phosphate deposit. *J. of Adv. Chem. Eng.* 1,102.
- Marschner, Horst and G. Rimmington. 1988. "Mineral Nutrition of Higher Plants." *Plant Cell Environ* 11:147–48.
- Massenssini, A. M., Tótola, M. R., Borges, A. C., & Costa, M. D. (2016). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from *Eucalyptus* sp. rhizosphere. *Revista Árvore*, 40(1), 125-134.
- Matos, A. D., Gomes, I. C., Nietzsche, S., Xavier, A. A., Gomes, W. S., dos Santos Neto, J. A., & Pereira, M. C. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2945-2954.
- Mendes G O, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB & Costa MD (2013) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology* 64(1): 239–49.
- Mendes, Rodrigo, Paolina Garbeva, and Jos M Raaijmakers. 2013. "The Rhizosphere Microbiome: Significance of Plant Beneficial, Plant Pathogenic, and Human Pathogenic Microorganisms." *FEMS microbiology reviews* 37(5): 634–63.
- Meng X, Yan D, Long X, Wang C, Liu Z, Rengel Z (2014) Colonization by endophytic *Ochrobactrum anthropi* Mn1 promotes growth of Jerusalem artichoke. *Microb Biotechnol* 7:601–610.
- Melo, H. F. (2015). Adubação nitrogenada e inoculação de sementes com *Azospirillum* brasileiro na cultura do milho. <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/130349>

- Milléo, M. V. R.; Cristófoli, I. (2016). Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação de *Azospirillum* sp. na cultura do milho. *Scientia Agraria*, 17(3).
- Mishra, S. K., Khan, M. H., Misra, S., Dixit, V. K., Khare, P., Srivastava, S., & Chauhan, P. S. (2017). Characterisation of *Pseudomonas* spp. and *Ochrobactrum* sp. isolated from volcanic soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(2), 253-270.
- Mittal, Vani et al. 2008. "Stimulatory Effect of Phosphate-Solubilizing Fungal Strains (*Aspergillus Awamori* and *Penicillium Citrinum*) on the Yield of Chickpea (*Cicer Arietinum* L. Cv. GPF2)." *Soil Biology and biochemistry* 40(3): 718–27.
- Mitter, B., Petric, A., Shin, M. W., Chain, P. S., Hauberg-Lotte, L., Reinhold-Hurek, B., ... & Sessitsch, A. (2013). Comparative genome analysis of Burkholderia phytofirmans PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Frontiers in plant science*, 4, 120.
- Milton HSJ (2007) Beneficial bacteria and bioremediation. *Water Air Soil Pollut* 184:1–3
- Murphy, J, and J P Riley. 1962. "A Modified Single Solution Method for Determination of Phosphate in Natural Water." *Analytica Chimica Acta* 27: 31–36.
- Moreira, Fátima Maria de Souza. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, 2006.
- Murray, J.D. et al. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315, 101–104 (2007).
- Nakajima, Yoshimi, Masamitsu Shimazawa, Satoshi Mishima, and Hideaki Hara. 2007. "Water Extract of Propolis and Its Main Constituents, Caffeoylquinic Acid Derivatives, Exert Neuroprotective Effects via Antioxidant Actions." *Life Sciences* 80(4): 370–77.
- Nautiyal, C Shekhar. 1999. "An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms." *FEMS microbiology Letters* 170(1): 265–70.
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., and Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS ONE* 9:e90841.
- Offre, P., Pivato, B., Mazurier, S., Siblot, S., Berta, G., Lemanceau, P., et al. (2008). Microdiversity of Burkholderiales associated with mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 180–192
- Oliveira, Christiane A. et al. 2009. "Assessment of the Mycorrhizal Community in the Rhizosphere of Maize (*Zea Mays* L.) Genotypes Contrasting for Phosphorus Efficiency in the Acid Savannas of Brazil Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)." *Applied Soil Ecology* 41(3):249–58.
- Oliveira, S. C., de Oliveira Mendes, G., da Silva, U. C., da Silva, I. R., Júnior, J. I. R., & Costa, M. D. (2015). Decreased mineral availability enhances rock phosphate solubilization efficiency in *Aspergillus niger*. *Annals of microbiology*, 65, 745-751.
- Osorio, N. W., and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* 91, 274–281.
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Pal KK, Tilak KVBR, Saxena AK, Dey R, Singh CS (2001) Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium germinarium* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 156:209–223
- Palus, James A, James Borneman, Paul W Ludden, and Eric W Triplett. 1996. "A Diazotrophic Bacterial Endophyte Isolated from Stems of *Zea Mays* L. and *Zea Luxurians* Iltis and Doebley." *Plant and soil* 186(1): 135–42.
- Panhwar, Q. A., Radziah, O., Naher, U. A., Zaharah, A. R., Razi, M. I., & Shamshuddin, J. (2013). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and oxalic acid on phosphate uptake from different P fractions and growth improvement of aerobic rice using ³²P technique. *Australian Journal of Crop Science*, 7(8), 1131.

- Pathma, J., Rahul, G. R., Kamaraj, K. R., Subashri, R., & Sakthivel, N. (2011). Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *Journal of Biological Control*, 25(3), 165-181.
- Peiffer, Jason A et al. 2013. "Diversity and Heritability of the Maize Rhizosphere Microbiome under Field Conditions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (16): 6548–53.
- Pettit, Robin K, Christine A Weber, and George R Pettit. 2009. "Application of a High Throughput Alamar Blue Biofilm Susceptibility Assay to Staphylococcus Aureus Biofilms." *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 8(1): 1.
- Pitcher, D G, N A Saunders, and R J Owen. 1989. "Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate." *Letters in Applied Microbiology* 8(4): 151–56.
- Pothier, J. F., Prigent-Combaret, C., Haurat, J., Moëgne-Loccoz, Y., & Wisniewski-Dyé, F. (2008). Duplication of plasmid-borne nitrite reductase gene nirK in the wheat-associated plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(6), 831-842.
- Prijambada, I. D., Widada, J., Kabirun, S., & Widiyanto, D. (2009). Secretion of organic acids by phosphate solubilizing bacteria isolated from oxisols. *Jurnal TANAH TROPIKA (Journal of Tropical Soils)*, 14(3).
- Rai, Rhitu, Prasanta K Dash, B M Prasanna, and Aqbal Singh. 2007. "Endophytic Bacterial Flora in the Stem Tissue of a Tropical Maize (*Zea Mays* L.) Genotype: Isolation, Identification and Enumeration." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(6): 853–58.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
- Rajput, M. S., Naresh Kumar, G., and Rajkumar, S. (2013). Repression of oxalic acid-mediated mineral phosphate solubilization in rhizospheric isolates of *Klebsiella pneumoniae* by succinate. *Arch. Microbiol.* 195, 81–88
- Richardson, Alan E, and Richard J Simpson. 2011. "Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus." *Plant physiology* 156(3): 989–96.
- Rijavec, Tomaz, Aleš Lapanje, Marina Dermastia, and Maja Rupnik. 2007. "Isolation of Bacterial Endophytes from Germinated Maize Kernels." *Canadian journal of microbiology* 53(6): 802–8.
- Rodríguez, Hilda, and Reynaldo Fraga. 1999. "Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion." *Biotechnology advances* 17(4): 319–39.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., et al. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290
- Roos, I.M.M; Hattingh, M.J. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv: mors-pmnorm on sweet cherry leaves *Phytopathology Z*, 108 (1983), pp. 18-25
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New microbes and new infections*, 7, 72-85.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 134:1017-1026.
- Sagoe, Charles I, Tadao Ando, Kenji Kouno, and Toshinori Nagaoka. 1998. "Relative Importance of Protons and Solution Calcium Concentration in Phosphate Rock Dissolution by Organic Acids." *Soil science and plant nutrition* 44(4): 617–25.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:635–648
- Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infection and immunity*, 69(6), 3523-3535.
- Scheublin, T. R., Sanders, I. R., Keel, C., and Van der Meer, J. R. (2010). Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME J.* 4, 752–763

Schwyn, Bernhard, and J B Neilands. 1987. "Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores." *Analytical biochemistry* 160(1): 47–56.

Scott, R.I.; Chard, J.M.; Hocart, M.J.; Lennard, J.H.; Graham D.C. Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Res.*, 39 (1996), pp. 333-344

Seghers, Dave et al. 2004. "Impact of Agricultural Practices on the Zea Mays L. Endophytic Community." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1475–82. <http://aem.asm.org/content/70/3/1475.abstract>.

Selvakumar, G., Kundu, S., Gupta, A. D., Shouche, Y. S., & Gupta, H. S. (2008). Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of Kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. *Current microbiology*, 56(2), 134-139.

Sessitsch, A et al. 2005. "Burkholderia Phytofirmans Sp. Nov., a Novel Plant-Associated Bacterium with Plant-Beneficial Properties." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(3): 1187–92.

Shankar M, Ponraj P, Ilakiam D, Rajendhran J, Gunasekaran P (2012) Genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* GS1. *J Bacteriol* 194: 4479.

Silva, C U et al. 2014. "Fluoride-Tolerant Mutants of *Aspergillus Niger* Show Enhanced Phosphate Solubilization Capacity." *PloS one* 9(10): e110246.

Simpson PG, Sale PWG & Tennakoon SB (1998) An economic analysis of the field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the National Reactive Phosphate Rock Project. *Aust J Exp Agr* 37: 1061-1076

Smith, S. E., A. D. Robson, and L. K. Abbott. 1992. "The Involvement of Mycorrhizas in Assessment of Genetically Dependent Efficiency of Nutrient Uptake and Use." *Plant and Soil* 146(1):169–79. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/BF00012010>).

Smyth E. (2011) Selection and analysis of bacteria on the basis of their ability to promote plant development and growth. PhD Thesis, University College Dublin.

Smith, Sally E., Iver Jakobsen, Mette Grønlund, and F. Andrew Smith. 2011. "Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition." *Plant Physiology* 156 (3):1050–57. Retrieved (<http://www.plantphysiol.org/content/156/3/1050.short>).

Son HJ, Park GT, Cha MS and Heo MS (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Biores Techn* 97:204-210.

Song, G. C., & Ryu, C. M. (2013). Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9803-9819.

Stajner D, Kevrean S, Gasaic O, Mimica-Dudic N, Zongli H (1997) Nitrogen and *Azotobacter chroococcum* enhance oxidative stress tolerance in sugar beet. *Biol Plant* 39:441–445

Steiner F, Lana MdC, Frandoloso JF, Fey R & Zoz T (2009) Fosfato de Gafsa e fungos solubilizadores de fosfato e seus efeitos na cultura de milho. *Cultivando o saber* 2: 156-164.

Stephen, J., Shabanamol, S., Rishad, K. S., and Jisha, M. S. (2015). Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions. *Biotech* 5, 831–837

Szilagyi-Zecchin, Vivian Jaskiw. 2012. "Microrganismos Endofíticos de Milho (*Zea Mays* L.)."

Sumayo, M., Hahm, M. S., & Ghim, S. Y. (2013). Determinants of plant growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 involved in induction of systemic resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tobacco leaves. *The plant pathology journal*, 29(2), 174.

Tanner, A., and S. Bornemann. 2000. *Bacillus subtilis* YvrK is an acid-induced oxalate decarboxylase. *J. Bacteriol.* 182:5271-5273.

- Thompson, J. R. et al (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307: 1311–1313.
- Toledo MCMd & Pereira VP (2001) A Variabilidade de composição da apatita associada a carbonatitos. *Revista do Instituto Geológico* 27-64.
- Toljander, Jonas F et al. 2007. “Influence of Arbuscular Mycorrhizal Mycelial Exudates on Soil Bacterial Growth and Community Structure.” *FEMS microbiology ecology* 61(2): 295–304.
- Toljander, Jonas F, Juan C Santos-González, Anders Tehler, and Roger D Finlay. 2008. “Community Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Bacteria in the Maize Mycorrhizosphere in a Long-Term Fertilization Trial.” *FEMS microbiology ecology* 65(2): 323–38.
- Torsvik, Vigdis, Lise Ovreas, and Tron Frede Thingstad. 2002. “Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors.” *Science (New York, N.Y.)* 296(5570):1064–66.
- Trabelsi, D., Cherni, A., Zineb, A. B., Dhane, S. F., and Mhamdi, R. (2017). Fertilization of *Phaseolus vulgaris* with the Tunisian rock phosphate affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities. *Appl. Soil Ecol.* 114, 1–8.
- Turner BL, Papházy MJ, Haygarth PM, McKelvie ID (2002) Inositol phosphates in the environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 449–469
- Xie, J., Shi, H., Du, Z., Wang, T., Liu, X., & Chen, S. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific reports*, 6, 21329.
- Vassilev N, Medina A, Azcon R & Vassileva M (2007) Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Vol. 102 (Velázquez E & Rodríguez-Barrueco C, eds.), pp. 77-84. Springer Netherlands.
- Vassilev N, Mendes G, Costa M & Vassileva M (2013) Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. *Geomicrobiology Journal*.
- Van Houdt, R., Moons, P., Buj, M. H., & Michiels, C. W. (2006). N-acyl-L-homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. *Journal of bacteriology*, 188(12), 4570-4572.
- Van Loon LC, Bakker P, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453–483
- Vega, N. W. O., Habte, M., and León Peláez, J. D. (2015). Effectiveness of a rock phosphate solubilizing fungus to increase soil solution phosphate impaired by the soil phosphate sorption capacity. *Rev. Fac. Nacl. Agron.* 68, 7627–7636.
- Vessey, J Kevin. 2003. “Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers.” *Plant and soil* 255(2): 571–86.
- Viégas, Ricardo Almeida, Roberto Ferreira Novais, and Fernanda Schulthais. 2010. “Availability of a Soluble Phosphorus Source Applied to Soil Samples with Different Acidity Levels .” *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34 : 1126–36.
- Wahid, F., Sharif, M., Steinkellner, S., Khan, M. A., Marwat, K., and Khan, S. (2016). Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria in the presence of rock phosphate improves phosphorus uptake and growth of maize. *Pak. J. Bot.* 48, 739–747.
- Walpola, B. C., Arunakumara, K. K. I. U., and Yoon, M. H. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria (*Klebsiella oxytoca*) with enhanced tolerant to environmental stress. *Afr. J. Microbiol. Res.* 31, 2970–2978.
- Wang, F., Shi, N., Jiang, R., Zhang, F., and Feng, G. (2016). In situ stable isotope probing of phosphate-solubilizing bacteria in the hyphosphere. *J. Exp. Bot.* 67,1689–1701
- Weinert, Nicole et al. 2011. “PhyloChip Hybridization Uncovered an Enormous Bacterial Diversity in the Rhizosphere of Different Potato Cultivars: Many Common and Few Cultivar-Dependent Taxa.” *FEMS Microbiology Ecology* 75(3): 497–506.
- Yi, H. S., Ahn, Y. R., Song, G. C., Ghim, S. Y., Lee, S., Lee, G., & Ryu, C. M. (2016). Impact of a bacterial volatile 2, 3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. *Frontiers in microbiology*, 7, 993.

- Young, C C, Z Q Huang, and D F Lin. 2000. "Studies on Properties of Solubilizing Tricalcium Phosphate of Pseudomonas Cepacia Al-74 Strain." *J Agric Assoc China* 1: 150–58.
- Zahar Haichar, F., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., ... & Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139-150.
- Zhang, Huiming et al. 2009. "A Soil Bacterium Regulates Plant Acquisition of Iron via Deficiency-inducible Mechanisms." *The Plant Journal* 58(4): 568–77
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biol. Fertil. Soils* 47, 543–554.