

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Caraterização funcional do sistema dois componentes PhoB/PhoR na regulação da solubilização e mineralização de fósforo por *Pantoea agglomerans* 33.1**

**Aluno:** Renan Fantine

**Orientadora:** Maria Carolina Quecine

**Local de execução:** Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética – ESALQ/USP

**Piracicaba - SP**

**2024**

## RESUMO

O fósforo (P) é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, uma vez que é um componente importante na formação de membranas, adenosina trifosfato e ácidos nucleicos. No entanto, nem todo o fósforo presente nos solos está disponível para as plantas, pois elas absorvem apenas as suas formas aniônicas solúveis, correspondendo a aproximadamente 0,1% do total. Embora a utilização de fertilizantes fosfatados aumente a produtividade das culturas, eles são extraídos de fontes não-renováveis e causam sérios problemas ambientais e ecológicos. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são consideradas uma alternativa promissora para este problema, já que são capazes de aumentar a disponibilidade de fósforo para a absorção pelas plantas. Neste contexto, destacam-se as bactérias da espécie *Pantoea agglomerans*, que já foram relatadas como promotoras de crescimento de plantas e com capacidade de solubilização/mineralização de nutrientes. A linhagem *P. agglomerans* 33.1 tem sido amplamente estudada e tem mostrado grande potencial como promotora do crescimento, solubilizadora de P, produtora de exopolissacarídeos e biofilme. Em seu genoma, já foram identificados genes relacionados à mineralização e solubilização de fosfato como por exemplo o *phoB* e *phoR*, pertencentes ao Sistema Dois Componentes (SDC). O SDC é responsável por regular a expressão de diversos outros genes através da percepção de P ambiental, gerando sinalizações específicas a depender da sua disponibilidade no meio. Assim, o presente projeto visa caracterizar o SDC PhoB/PhoR e sua participação na regulação de outros genes relacionados à solubilização, mineralização, absorção e transporte de fosfatos por meio de nocaute dos genes *phoB* e *phoR* por meio da técnica de CRISPR-Cas9. O entendimento da regulação de genes relacionados à disponibilização de P às plantas é de suma importância para o desenvolvimento de tecnologias e manejos mais sustentáveis referentes ao uso dos fertilizantes minerais.

**Palavras chave:** fósforo, bactérias promotoras de crescimento, CRISPR-Cas9, Sistema Dois Componentes

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial, de acordo com a Revisão de Perspectivas da População Mundial de 2019 elaborada pela Divisão de População do Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais do Secretariado das Nações Unidas, deve atingir cerca de 10 bilhões de pessoas em 2050 (UNDESA, 2019). Como resultado, haverá uma demanda significativamente maior por produção agrícola, especialmente de alimentos, que deve aumentar em aproximadamente 100% e 110% até o mesmo ano (TILMAN et al., 2011; ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012). Para suprir esta demanda, existem duas principais estratégias: intensificar a produção nas áreas que atualmente são destinadas à agricultura e/ou expandir para áreas de vegetação nativa em detrimento da biodiversidade global (WITHERS et al., 2018).

Para intensificar a produção, espera-se que as regiões tropicais desempenhem um papel significativo na agricultura global (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012). No entanto, essas regiões alocam predominantemente solos altamente intemperizados e pobres em fósforo (P), que exigem alterações químicas substanciais para aumentar a produtividade das culturas (PALM et al., 2007). Com o aumento da demanda por alimentos, a pressão para intensificar a produção agrícola em solos pobres em nutrientes pode ser ainda maior, o que pode levar a uma maior utilização de fertilizantes fosfatados, e, conseqüentemente, a uma maior interferência no ciclo natural do fósforo (P) e a possíveis desequilíbrios ecológicos (PANTANO et al., 2016).

O P é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, pois participa de processos vitais, como a formação de adenosina trifosfato (ATP), a composição de membranas e ácidos nucleicos (MADRID-DELGADO et al., 2021). Segundo Jones & Oburger (2011), o P apresenta-se no solo de duas formas: inorgânica (Pi) e orgânica (Po). Cerca de 35-70% do total de P é representado pelo Pi, o qual é altamente reativo e está ligado a outros componentes minerais, tornando-se insolúvel. Por outro lado, o Po corresponde a 30-65% do P do solo, podendo chegar em casos raros até 90% dependendo da quantidade de matéria orgânica presente. O Po é encontrado no solo como fosfonatos, fosfatos de inositol, fosfolipídios e ácidos nucleicos (JONES & OBURGER, 2011).

Embora seja o 11º elemento mais comum na Terra (SCHWEDT, 2001), apenas uma pequena fração (0,1%) do fósforo presente no ambiente está disponível na forma solúvel ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), e, portanto,

acessível às plantas para absorção (ZOU et al., 1992; SHIN et al., 2004; REJMÁNKOVÁ et al., 2011). De acordo com Noetzold et al. (2019), a fertilidade reduzida em alguns solos é resultado da geologia física local, incluindo o material de origem e os processos de intemperismo, além de práticas excessivas de exploração. Alternativamente, os agricultores recorrem ao uso de compostos químicos para aumentar a produtividade de suas plantações (MACIEL & TUNES, 2021). Desde o surgimento dos fertilizantes NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) no século XIX, que substituíram os adubos orgânicos tradicionais, os fertilizantes fosfatados tornaram-se cada vez mais populares. Eles são fabricados a partir de diferentes tipos de rochas e sua extração interfere no ciclo natural do fósforo, levando à liberação do elemento no ambiente e causando desequilíbrios ecológicos, incluindo a eutrofização de rios e lagos (PANTANO et al., 2016).

O Brasil detém cerca de 25% de todas as áreas fixadoras de fósforo (P) usadas na agricultura em todo o mundo. Essa área corresponde a  $\frac{3}{4}$  de toda a diversidade de solos fixadores de P utilizados globalmente, sendo capaz de produzir a maioria das principais culturas agrícolas do mundo, como trigo, milho, soja e cana-de-açúcar (ROY et al., 2016). No entanto, o Brasil é altamente dependente da importação de P, já que as minas de rocha fosfática do país fornecem quantidades limitadas do composto devido à baixa solubilidade do P presente na rocha ígnea e aos altos custos de processamento (WITHERS et al., 2018).

Além disso, cerca de 60% dos fertilizantes inorgânicos de P utilizados na agricultura brasileira são importados (WITHERS et al., 2018). Essa dependência de importações aumenta a vulnerabilidade da produção agrícola do país, uma vez que os produtores ficam sujeitos às variações de preço dos fertilizantes fosfatados. Ademais, o P está classificado como um recurso natural não-renovável, e, devido à sua crescente utilização desenfreada pode vir ao esgotamento nas próximas décadas (CORDELL et al., 2009).

Nesse contexto, a fim de diminuir a aplicação de fertilizantes fosfatados no solo, existem diversos estudos que trazem o uso de microrganismos com capacidade de mineralização e solubilização de fosfato como uma alternativa ao uso de químicos, como as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (SHARMA et al., 2013; GOSWAMI et al., 2016).

As BPCPs são conhecidas como promotoras de crescimento vegetal, por conta da sua participação na ciclagem de nutrientes, síntese de fitohormônios, controle biológico de eventuais patógenos, e da liberação de ácido orgânico no solo (principalmente o ácido glucônico) que acarreta a solubilização do P,

e uma vez solubilizado, o P fica disponível para absorção vegetal (ZENG et al., 2015; SHAIENDRA et al., 2015). Já o mecanismo de mineralização ocorre por meio da conversão de um fosfato orgânico em inorgânico, através da liberação de fosfatases (REJMÁNKOVÁ et al., 2011; GOSWAMI et al., 2016).

As BPCPs, assim como as bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB: *Phosphate-solubilizing bacteria*) que também podem ser encontradas na rizosfera ou em tecidos vegetais (LIU et al., 2015; EMAMI et al., 2020) são consideradas biofertilizantes potenciais para fornecer P para as plantas a partir de fontes pouco disponíveis (ZAIDI et al., 2009). Dentre elas os gêneros que mais se destacam como solubilizadores de fósforo são *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Bacillus* (BHATTACHARYYA & JHA, 2012) .

As bactérias do gênero *Pantoea* são Gram-negativas, cosmopolitas e não formadoras de esporos (TAMBONG, 2019), sendo encontradas tanto em ambiente aquático, terrestre, e em associações com plantas e animais (MOSSO et al., 1994; DUTTA et al., 2014). Pertencem à família das Enterobacteriaceae, e inicialmente foram subdivididas em diversos grupos, como *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Erwinia*, mas, com avanços da biologia molecular, foram agrupadas no gênero *Pantoea*, no entanto, sua sistemática e filogenia ainda permanecem em discussão (WALTERSON & STAVRINIDES, 2015; TAMBONG, 2019). Várias linhagens do gênero *Pantoea* possuem relação direta com a solubilização de P e a promoção de crescimento em plantas, sendo um gênero de grande interesse agroeconômico (CHAKDAR et al., 2018; SUMAN et al., 2020), dentre elas destaca-se espécie *P. agglomerans*.

*P. agglomerans*, anteriormente identificada como *Enterobacter agglomerans* e *Erwinia herbicola*, pode ser encontrada em estudo de promoção de crescimento de plantas e estão associadas à rizosfera ou tecidas vegetais (LORENZI et al., 2022a). É uma espécie particularmente de grande interesse comercial para a produção de biofertilizantes, pois já foi relatada como mineralizadora de P, solubilizadora de potássio (K) e P, fixadora de nitrogênio (N), produtora de sideróforo e de ácido indolacético (AIA) (QUECINE et al., 2012; LORENZI et al., 2022a).

Além disso, Saadoli et al. (2021) demonstraram que *P. agglomerans* tem efeito interativo na comunidade microbiana do solo e na disponibilidade de P. Inicialmente, os autores caracterizaram *in vitro* a atividade de solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO})_4$  por *P. agglomerans* V8R67, e detectaram por PCR a presença de

genes envolvidos na expressão do ácido glucônico (conhecido previamente como solubilizadores de P). Em casa de vegetação, foi avaliada a curva de crescimento bacteriano após um inóculo de *P. agglomerans* V8R67 em um solo rico em fosfato tricálcico, e observando um aumento na produção de ácido glucônico, confirmando resultados prévios de que o pH abaixa e gera a solubilização do P. Os autores também observaram que há diversificação na comunidade bacteriana do solo controle e do que recebeu o inóculo, visto que este último apresentou uma maior quantidade de representantes de outras PSBs, como *Bacillus* e *Clostridia*. Quecine et al. (2012), estudou os mecanismos de promoção de crescimento da *P. agglomerans* 33.1 em cana-de-açúcar e a sua respectiva colonização pelo endófito através de gene-repórter.

Visando estudar os aspectos moleculares envolvidos nos mecanismos de promoção de crescimento, a linhagem *P. agglomerans* 33.1 foi sequenciada e está disponível no NCBI a partir do acesso ASM2014976v1. A partir deste genoma foram identificados genes relacionados ao P e a promoção do crescimento vegetal. Ainda pela análise deste genoma, foi possível observar a presença de operon PhoB/PhoR, previamente descrito na literatura como um mecanismo responsável pela resposta à falta de P disponível no solo. Este mecanismo composto principalmente por estas duas proteínas é denominado de sistema de dois componentes (SDC), sendo responsável por ativar e desativar inúmeros genes envolvidos na resposta direta e indireta da célula sob falta de fósforo, e, pouco ainda entendido em potenciais bioinoculantes à nível genético. Assim, pretende-se compreender de forma inédita como ocorre a regulação dos genes de P em *P. agglomerans* 33.1 mediado pelo SDC PhoB/PhoR por meio de edição gênica CRISPR-Cas9 e quais suas respostas frente à disponibilidade do nutriente, analisando sua expressão em diferentes estímulos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Dada a previsão de aumento populacional nos próximos anos, é imprescindível que a produção agrícola se intensifique para atender às futuras demandas por alimento e energia. Objetivando uma alternativa sustentável, o uso de BPCPs tornou-se uma alternativa a ser incluída no ciclo de produção para aumentar a produtividade sem precisar expandir para áreas de vegetação nativa e sem uso intensivo de fertilizantes químicos. Muitas destas bactérias são capazes de solubilizar P, disponibilizando esse nutriente

para as plantas que anteriormente estava em uma forma química não assimilável pelas raízes Assim, é imprescindível o entendimento à nível molecular da resposta de potenciais bioinoculantes ao P exógeno.

Dentre as BPCPs, destaca-se o gênero *Pantoea* com atividade conhecida de solubilização de P. Dentro deste gênero podemos destacar a linhagem *P. agglomerans* 33.1, uma bactéria isolada de *Eucalyptus grandis* (PROCÓPIO et al., 2009; QUECINE et al., 2012). Esta bactéria apresenta vários mecanismos de promoção de crescimento, dentre eles a solubilização e mineralização de fosfato, potássio, fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios (QUECINE et al., 2012; LORENZI et al., 2022a).

Estudos genéticos em bioinoculantes devem ser realizados visando o melhor entendimento dos mesmos bem como para otimizar a sua aplicabilidade. Nos últimos anos, houve um rápido desenvolvimento de estratégias de edição de genoma visando estudo genéticos. Nesse sentido, o sistema CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) tem sido amplamente utilizado como uma poderosa ferramenta de edição de genomas com intuito de estudar funções de genes e geração de produtos biotecnológicos com alta especificidade e eficiência e tecnicamente mais simples e prática quando comparada àquelas baseadas em nucleases “dedo de zinco” (ZFNs) e nucleases efetores fusionadas a ativadores de transcrição (TALEN) (CONG et al., 2013; JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013). A técnica de CRISPR-Cas9 permite realizar o nocaute gênico com o intuito de entender o funcionamento de determinados genes. Esta forma de estudo de funcionalidade é conhecida como genética reversa.

Baseado no que foi apresentado previamente, o presente projeto visa o entendimento do papel das proteínas PhoB e PhoR na disponibilização de P pela linhagem 33.1, por meio de nocaute gênico utilizando o sistema CRISPR-Cas9, justificado pela relevância do fósforo na agricultura como macronutriente essencial para as plantas e pela atual dependência de importação deste elemento.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste projeto é investigar o Sistema de Dois Componentes PhoB/PhoR, presente na linhagem 33.1 e sua participação na resposta de deficiência de fósforo. Para isso, serão alcançados os seguintes objetivos específicos:

- Realizar o nocaute dos genes *phoR* e *phoB*;
- Avaliar a capacidade das linhagens nocauteadas em solubilizar diferentes concentrações de fosfato solúvel;
- Analisar a expressão gênica e o perfil metabólico em resposta a diferentes concentrações de fosfato solúvel nas linhagens wt,  $\Delta phoR$  e  $\Delta phoB$ ;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Nocaute gênico de *phoB* e *phoR* da linhagem 33.1

#### 4.1.1 Linhagens bacterianas, DNA genômico, plasmídeos e condições de cultivo

Neste estudo, serão utilizadas as linhagens *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) e *Pantoea agglomerans* 33.1. Para obter colônias isoladas, elas serão cultivadas a partir de estoques mantidos a -80°C, em meio de cultura Luria Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 2001) a 37°C e 28°C, respectivamente. Plasmídeos e DNA genômico serão extraídos usando os kits *Qiaprep Spin Miniprep* (Qiagen) e *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), respectivamente.

O sistema de plasmídeos duplos será utilizado para aplicar a técnica CRISPR-Cas9 com o objetivo de direcionar a Cas9 e o sgRNA para o gene *phoR/phoB* da linhagem 33.1. Para isso, os plasmídeos pCas e pTargetF serão utilizados para separar a Cas9 e o sgRNA, respectivamente, conforme Jiang et al (2015).

Para realizar o nocaute gênico, serão empregados dois plasmídeos. O primeiro deles é o pCas, que contém a sequência que codifica a enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (MGAS5005), juntamente com seu promotor nativo P<sub>cas</sub>, o gene Kan<sup>R</sup> para resistência à canamicina, o replicon de sensibilidade à temperatura (*Temperature-sensitive*, Ts) repA101, ambos provenientes do plasmídeo pKD46 para autodepuração, o gene  $\lambda$ -Red para recombinação homóloga do cassete de DNA doador, sob o controle do promotor P<sub>arab</sub> (induzido por L-arabinose) e um sgRNA com uma sequência N<sub>20</sub> alvo no replicon pMB1 do plasmídeo pTargetF (sgRNA-pMB1) sob o controle de um promotor induzido por IPTG, P<sub>trc</sub> (JIANG et al., 2015). Já o segundo plasmídeo, o pTargetF, carrega sequências do sgRNA (tracrRNA:crRNA), regulado pelo promotor pJ23119, o gene *aadA* para resistência à espectinomicina, pMB1 e múltiplos sítios de restrição (JIANG et al., 2015).



#### 4.1.2 Transformação da linhagem 33.1 com o plasmídeo pCas

Culturas eletrocompetentes da linhagem 33.1 serão obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 mL de meio LB líquido, incubados a 28°C por 18 horas, sob agitação (250 rpm). Após o crescimento, 1 mL da cultura será transferido para 50 mL de meio LB líquido e incubados a 28°C e 180 rpm até atingir a densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>) de 0,7 medida em espectrofotômetro (*Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech*).

Em seguida, a cultura será centrifugada a 3.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante será descartado e o precipitado ressuspense em água deionizada esterilizada, e novamente centrifugado. Posteriormente o sobrenadante será descartado e o precipitado bacteriano ressuspense em glicerol 10% e centrifugado. O sobrenadante será mais uma vez descartado. Finalmente, o precipitado será ressuspense em glicerol 10% (DO<sub>600nm</sub> = 0,15) para diluição de 500X e distribuído em alíquotas de 100 mL estocadas a -80°C.

O plasmídeo pCas (100ng) será adicionado a 100 mL da cultura eletrocompetente e introduzidos por eletroporação (*Gene Pulser, BioRad* - 2,5 kV, 25µF, 200 W, cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas serão semeadas e incubadas por 18 horas a 28°C em meio sólido LB adicionado de Canamicina. As colônias obtidas serão contadas para determinação da eficiência de transformação (número de transformante por µg de DNA) e os clones resistentes a canamicina serão estocados a -80°C.

#### 4.1.3 Obtenção e seleção de sequências N<sub>20</sub> para o sgRNA

As sequências N<sub>20</sub> que compõem o sgRNA nos plasmídeos pTarget serão construídas com base na sequência dos genes *phoR* e *phoB* e direcionadas para um alvo no referido gene, no genoma da linhagem 33.1, flanqueado por uma sequência PAM (JIANG et al., 2015). Para gerar as sequências N<sub>20</sub> com base no gene *phoR* e *phoB* e identificação dos potenciais “*off-target sites*” serão utilizadas as ferramentas CRISPR RGEN Tools Cas-OFFinder vers. 2.4 (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) (BAE et al., 2014), CRISPOR vers. 4.2 (<http://tefor.net/crisporDev/crisporBeta/crispor.py>) (HAEUSSLER et al., 2016) utilizando o genoma da *P. agglomerans* 33.1 (ASM2014976v1) como referência.

A seleção das sequências obtidas nas plataformas para montagem do sgRNA será realizada com base nos seguintes critérios estabelecidos pelas próprias plataformas: conteúdo GC próximo a 40% ou

superior, escore de especificidade mais próximo de 100%, escore de out-off-frames  $\geq 50\%$  e baixo número de sítios *off-targets*.

#### 4.1.4 Construção dos plasmídeos da série pTarget<sub>phoR</sub> e pTarget<sub>phoB</sub>

Os plasmídeos pTarget<sub>phoR</sub> e pTarget<sub>phoB</sub> serão construídos a partir do plasmídeo pTargetF e possuirão a sequência de sgRNA, o promotor pJ23119, a sequência N<sub>20</sub> alvo no gene *phoR* e *phoB* respectivamente, o gene *aadA* resistente à espectinomicina, o replicon pMB1 e múltiplos sítios de restrição (JIANG et al., 2015).

Para tanto, o pTargetF será digerido com as enzimas *Bam*H1 e *Eco*R1 (NEB) em uma reação *double digest* de acordo com as especificações do fabricante.

Em seguida, será realizada a eletroforese do produto da digestão em gel de agarose a 1,2%, corado com SYBR<sup>®</sup>*green* (*Sigma-Aldrich*), e a banda de maior comprimento visualizada no gel será recortada e o DNA purificado usando *Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, para posteriormente ser usado como vetor para a clonagem do sgRNA.

Os insertos para construção do pTarget serão produzidos a partir da síntese de oligos com terminação 5' coesiva com *Bam*H1 e o terminal 3' coesiva com *Eco*R1, ambos contendo a sequência do promotor pJ23119, o sgRNA (fusão do trcrRNA:crRNA), e o N<sub>20</sub> alvo no gene *phoR* e *phoB* no genoma de *P. agglomerans* 33.1. Esses insertos serão diluídos em tampão TE (1M de Tris HCl pH 8.0 e 0,5M de EDTA pH 8.0) em alíquotas de 100  $\mu$ M,

A reação de fosforilação dos insertos será realizada com T4 polinucleotídeo Kinase (PNK) (NEB) em uma reação contendo 2 $\mu$ M de cada oligo; 1x do tampão T4 ligase Buffer (NEB) e 200 U mL<sup>-1</sup> da enzima T4 PNK em um volume total de 50 $\mu$ L. Em seguida, a reação será incubada em termobloco a 37°C por 30 minutos. Após este período, serão adicionados 2,5  $\mu$ L de solução de NaCl 1M a reação de fosforilação e novamente incubado a 95°C por 6 minutos para anelamento dos oligos. Posteriormente, as reações serão resfriadas à temperatura ambiente e purificadas com *Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e diluídas em H<sub>2</sub>O deionizada estéril.

A ligação dos insertos ao vetor será realizada por meio de reação de ligação contendo 1x do DNA Ligase Buffer (*Invitrogen*<sup>®</sup>); vetor e inserto em uma relação molar de 5:1; 0,005 MI<sup>-1</sup> da enzima T4 DNA Ligase (*Invitrogen*<sup>®</sup>) para um volume final de 20 µL e então será incubada *overnight* à 16°C. Após este período, 10 µL da reação serão utilizadas para eletroporação em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5α), sendo recuperadas por 1 hora de crescimento em agitador orbital (180 rpm). Após o crescimento, alíquotas de 100 µL das células recuperadas serão espalhadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar acrescido de antibiótico espectinomicina (90 µg mL<sup>-1</sup>).

#### 4.1.5. Construção e montagem do cassete de DNA doador

A construção do DNA doador que servirá como molde para a recombinação homóloga será realizada com dois moldes de fragmentos das sequências *upstream* e *downstream* presentes na região dos genes *phoR* e *phoB*. Estas sequências já foram obtidas a partir do genoma. Na primeira PCR, as regiões *upstream* e *downstream* serão amplificadas, separadamente, utilizando sequências dos *primers* modificados.

#### 4.1.6. Nocaute do gene *phoR* e *phoB* com a técnica de CRISPR-Cas9

A linhagem 33.1-pCas será crescida em meio LB contendo antibiótico sulfato de canamicina 100 µg mL<sup>-1</sup> e de L-arabinose (concentração final de 10 mM) para indução dos genes do complexo λ, facilitando a recombinação do cassete doador. A partir de então, células eletrocompetentes da linhagem 33.1-pCas, serão transformadas com 300 ng de pTarget<sub>*phoR*</sub> e pTarget<sub>*phoB*</sub> carregando o sgRNA com o N<sub>20</sub> alvo no gene *phoR* e *phoB*, que será eletroporado junto com 600 ng do cassete dos DNAs doadores (*dsDNA* ~ 900 pb). A eletroporação será realizada seguindo o mesmo procedimento descrito em 4.1.2.

Após a eletroporação, as células serão inoculadas em meio LB-ágar contendo canamicina (100 µg mL<sup>-1</sup>) e espectinomicina (500 µg mL<sup>-1</sup>), com o sem a adição de L-arabiose (10 mM) e em seguida incubadas *overnight* à 28°C. Após o crescimento, as colônias isoladas dos transformantes, serão crescidas em 10 mL de LB por 24 horas a 28°C em agitador orbital (180 rpm).

Os *amplicons* serão verificados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, e posteriormente, as bandas serão excisadas do gel, purificadas e enviadas para sequenciamento. A confirmação dos mutantes será feita

alinhando com as sequências obtidas dos amplicons à sequência do cassete doador e dos genes *phoR* e *phoB* da linhagem 33.1, pelo método *Multiple Sequence Alignment* (MSA).

#### **4.2. Verificação da habilidade dos mutantes *phoR* e *phoB* de solubilização em diferentes concentrações de fosfato solúvel**

Para avaliar a capacidade de solubilização de P, as linhagens 33.1 wt,  $\Delta phoR$  e  $\Delta phoB$  serão inoculadas em diferentes concentrações de P solúvel utilizando o meio de ágar e fosfato simples (SP) (10 g de glicose, 0,6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 g de KCl e 5 g de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 1 L de água destilada, meio solidificado com ágar a 1,5%) com fosfato de cálcio como fonte única de fosfato insolúvel. A solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100 mmol L<sup>-1</sup>) será usada em seis concentrações diferentes no meio (0, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 mmol L<sup>-1</sup>). Primeiramente, o inóculo será crescido em meio LB líquido, depois 1 mL (10<sup>8</sup>) do inóculo será centrifugado e lavado três vezes com solução salina. As células bacterianas serão ressuspensas em 1 ml de solução salina e 10 µL de suspensão bacteriana será pipetada no centro da placa de Petri contendo meio SP. A formação de halo será observada após cinco dias. Cada tratamento será feito em triplicata. A capacidade de solubilização de fosfato será determinada pela razão entre o diâmetro da zona clara e o diâmetro da colônia (ZENG et al., 2017).

#### **4.3. Análise da expressão gênica em resposta a diferentes concentrações de fosfato solúvel**

##### **4.3.1. Curva de crescimento**

Para detectar o nível de expressão gênica as linhagens wt,  $\Delta phoR$  e  $\Delta phoB$  serão cultivadas em meio líquido SP contendo diferentes níveis de P solúvel, conforme o item 4.2. Os inoculados serão cultivados a 28°C a 180 rpm. Periodicamente, serão retirados 1 mL de amostra para mensurar a OD<sub>600</sub> nm.

##### **4.3.2. Extração de RNA**

Para de extração de RNA, 500 µl de RNA *protect Bacteria Reagent* (Qiagen, USA) serão adicionados a 250µl das suspensões bacterianas, e imediatamente vortexadas por 5 segundos, incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugadas a 5000 g por 15 minutos e o *pellet* bacteriano armazenado a -80°C. O *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, USA) será adaptado para o uso em bactérias, e testado em concentrações estimadas de 10<sup>5</sup> e 10<sup>9</sup> de células. Os *pellets* serão ressuspensos em TE suplementado com 1 g.L<sup>-1</sup> de

lisozima por 5 minutos em temperatura ambiente. A partir deste processo as instruções do fabricante serão seguidas e o método de homogeneização empregado será: vórtex por 1 minuto para até  $10^5$  células e o uso do QIAshredder (Qiagen, USA) para as amostras com  $10^9$  células. A concentração do RNA obtido será analisada pelo espectrofotômetro NuDrop UVS-99 (Avans, Taiwan), e a integridade do RNA avaliada em gel de agarose 1%.

### 4.3.3. Síntese de cDNA

Será utilizado o *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante, incubando 11  $\mu$ L da amostra do RNA e 1  $\mu$ L dos hexâmeros a 65°C por 5 minutos, seguido da adição dos demais reagentes do kit e incubação a 25°C por 5 minutos, seguido de 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 70°C.

### 4.3.4. RT-qPCR

As reações serão preparadas com 12,5  $\mu$ l de *Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG*, 9,5  $\mu$ l água ultrapura tratada com DEPC, 1  $\mu$ l cDNA (1ª fita) e 1  $\mu$ l de cada par de *primer* 10mM. As amostras serão feitas em triplicata e em três diluições de 0,5,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  para a normalização e o cálculo da eficiência do *primer*, respectivamente. Serão utilizados controles para a padronização de cada reação quanto à pureza da amostra. A análise será realizada no aparelho IQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). As condições da PCR serão: 95°C, 15 minutos; e 95°C, 20 segundos, 55°C a 60°C dependendo do *primer*, 30 segundos, 72°C, 30s por 45 ciclos; seguidos de 95°C, 30 segundos e 60°C, 18 minutos. A eficiência das reações será analisada através do programa *LinRegPCR* 11.0 (RUIJTER et al., 2009). A análise dos resultados será realizada utilizando a metodologia proposta por Pfaffl et al. (2002) por meio dos genes endógenos *pyrG*, *recA* e *rpoB* já validados para a linhagem 33.1

## 4.4 Metabolômica das linhagens em diferentes concentrações de P solúvel

Para análise do metaboloma, as linhagens linhagens 33.1 wt,  $\Delta$ phoR e  $\Delta$ phoB crescidas em meio SP líquidos com duas concentrações de P solúvel, uma alta e uma baixa, definidas no item 4.2. Em seguida, serão coletados 1mL da suspensão bacteriana em três tempos (3h, 06h e 24h), que serão secados por liofilização. O resíduo da secagem resíduo da secagem será diluído com 500 $\mu$ l de uma solução de extração contendo metanol, clorofórmio e água ultrapura (3:1:1) e homogeneizadas sob agitação contínua em vórtex

por aproximadamente 1 min. Posteriormente, as amostras serão novamente liofilizadas para secagem total da solução de extração e encaminhadas para etapa de derivatização.

Para a derivatização foi adicionado 30 µL de metoxiamina (15 mg mL<sup>-1</sup>) em piridina, agitadas por 1 min e em seguida mantidas em repouso por 16 h à temperatura ambiente no escuro. A sililação será realizada com a adição de 30 µL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano). As amostras serão mantidas em repouso por 1 h, também no escuro. Posteriormente, serão adicionados 30 µL de Heptano. Nesta etapa, serão utilizadas uma série de alcanos (C12 – C40) que possibilitará o cálculo dos índices de retenção.

As amostras serão automaticamente injetadas no modo splitless em um cromatógrafo gasoso, com uma coluna de sílica fundida específica. As condições de temperatura de injeção e corrida são estabelecidas, seguidas pela introdução dos dados no equipamento GC-TOFMS. Os parâmetros do equipamento serão definidos posteriormente. O processamento dos dados de GC-MS será realizado utilizando o ChromaTOF for BT, incluindo correções de linha de base, deconvolução, obtenção do índice de retenção e correção do tempo de retenção, além da identificação de metabólitos com a biblioteca do NIST.

## 5. CRONOGRAMA

Atividades	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X
Nocautar gênico de <i>P. agglomerans</i> 33.1	X	X				
Caracterizar a atividade fisiológica de solubilização de P por $\Delta phoR$ e $\Delta phoB$		X	X			
Análise da expressão gênica por RT-qPCR		X	X	X		
Análise Metabolômica			X	X		
Escrita do TCC					X	X
Apresentação do TCC						X

## 6. REFERÊNCIAS

- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050. The 2012 revision. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 154, 2012.
- BAE, S.; PARK, J.; KIM, J. S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. **Bioinformatics**, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- CHAKDAR, H et al. Caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato mineral e promotoras de crescimento de plantas de solo de cupins de região árida. 3 **Biotech** 8, 463 2018.
- CHAN, F. Y.; TORRIANI, A. PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 13, p. 3974–3977, 1996.
- CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, 2013.
- CORDELL, D et al. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, [s. l.], v. 19, ed. 2, p. 292-305, 2009
- DUTTA, B et al. Transmission of *Pantoea ananatis* and *P. agglomerans*, Causal Agents of Center Rot of Onion (*Allium cepa*), by Onion Thrips (*Thrips tabaci*) Through Feces. **Phytopathology**®, v. 104, n. 8, p. 812-819, 2014.
- EMAMI, S. et al. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. **Rhizosphere**, v. 14, p. 100196, 2020.
- GOSWAMI D et al. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food Agric** 2:19, 2016.
- GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 2016.
- HAEUSSLER, M. et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. **Genome Biology**, 2016.
- JHA, C. K.; SARAF, M. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, 2015.
- JHA, V.; DAFALE, N. A.; PUROHIT, H. J. Regulatory rewiring through global gene regulations by PhoB and alarmone (p)ppGpp under various stress conditions. **Microbiological Research**, v. 227, p. 126309, 2019.
- JIANG, Y. et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015.
- JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, 2012.
- JONES, D. L.; OBURGER, E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In: [s.l: s.n.]. p. 169–198.
- LIU, Z. et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 217–224, 2015.
- LORENZI, A. S. et al. Opposite Sides of *Pantoea agglomerans* and Its Associated Commercial Outlook. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2072, 2022a.
- MACIEL, L. M.; TUNES, L. V. M. DE. A importância dos fertilizantes para a agricultura/ The importance of fertilizers for agriculture. **Brazilian Journal of Development**, 7(6), 58647–58658, 2021.
- MADRID-DELGADO, G. Pathways of Phosphorus Absorption and Early Signaling between the Mycorrhizal Fungi and Plants. **Phyton**, v. 90, n. 5, p. 1321-1338, 2021.
- MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, 2013.

MOSSO, MA et al. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. **J Appl Bacteriol**;77(4):370-81, 1994.

NOETZOLD, R et al. Variabilidade espacial da eficiência do uso de potássio e fósforo na cultura da soja. **Revista engenharia na agricultura**, Viçosa-MG, v. 27, n. 6, p. 529-541, 2019.

PALM, C. et al. Soils: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 32, n. 1, p. 99–129, 2007.

PANTANO, G et al. Sustentabilidade no uso do fósforo: uma questão de segurança hídrica e alimentar. **Química Nova**, v. 39, n. 6 pp. 732-740. ISSN 1678-7064, 2016.

PFAFFL, M. W et al. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36e36, 2002..

PROCÓPIO, R. E. L. et al. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1408–1422, 2009.

QUECINE, M. C. et al. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7511–7518, 2012.

REJMÁNKOVÁ, E et al. Patterns of activities of root phosphomonoesterase and phosphodiesterase in wetland plants as a function of macrophyte species and ambient phosphorus regime. **New Phytol** 190: 968–976, 2011.

ROY, E. D. et al. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, v. 2, n. 5, p. 16043, 2016.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, 2009.

SAADOULI, I. et al. The Impact of the Inoculation of Phosphate-Solubilizing Bacteria *Pantoea agglomerans* on Phosphorus Availability and Bacterial Community Dynamics of a Semi-Arid Soil. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1661, 4 ago. 2021.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. Cold Springer Harbor Laboratory Press, 3, 2344, 2001.

SCHWEDT, G. The Essential Guide to Environmental Chemistry; **Wiley-Blackwell**: Hoboken, NJ, USA, 2001.

SHAILENDRA SINGH, G. G. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 02, 2015.

SHARMA, SB et al. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus** 2, 1–14, 2013.

SHIN, H et al. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. **Plant J**. 4, 2004.

SUMAN, A et al. Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. **Journal of Environmental Biology**, v. 41, p. 987-994, 2020.

TAMBONG, J.T. Taxogenomics and Systematics of the Genus *Pantoea*. **Front. Microbiol.**, [s. 1.], 2019.

TILMAN, D. et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260 - 20264, 2011.

UNDESA. United Nation Desa Population Division. Probabilistic population projections based on the world population prospects: the 2019 revision. New York: United Nations, 2019.

WALTERSON, AM, STAVRINIDES, J., *Pantoea*: insights sobre um gênero altamente versátil e diversificado dentro das Enterobacteriaceae, **FEMS Microbiology Reviews**, Volume 39, Issue 6, Pages 968–984, 2015.

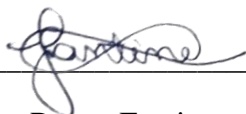
WITHERS, P. J. A. et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2537, 2018.



ZAIDI, A. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 56, n. 3, p. 263–284, 2009.

ZENG, Q. et al. Effects of Soluble Phosphate on Phosphate-Solubilizing Characteristics and Expression of *gcd* Gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2. **Curr Microbiol**, 72, 198–206, 2016..

ZOU, X et al. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. **Plant Soil** 1992, 147, 243–250.



---

Renan Fantine  
Aluno



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Carolina Quecine  
Orientadora



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

## CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP), Ad Referendum, **CERTIFICOU** a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Maria Carolina Quecine Verdi**, Departamento de Genética, pelo período de **26/05/2022** à **25/05/2025**.

Piracicaba, 26 de maio de 2022.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wanessa Melchert Mattos  
Presidente da CEAP/ESALQ/USP