

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ADRIANE DAS GRAÇAS SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus*
methylophilus EM RAÍZES DE SOJA**

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2021**

ADRIANE DAS GRAÇAS SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus*
methylophilus EM RAÍZES DE SOJA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador (a): Profa. Dra. Thaise
Gonçalves de Araújo**

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Adriane das Graças, 1995-
2021 Identificação e quantificação molecular de *Bacillus methylotrophicus* em raízes de soja [recurso eletrônico]
/ Adriane das Graças Silva. - 2021.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.14>

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-
, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Av. Getúlio Vargas, 230, 3º andar, Sala 308 - Bairro Centro, Patos de Minas-MG,
CEP 38700-128
Telefone: (34) 3823-3714 - Ramal 39 - www.ppgbiotec.ibtec.ufu.br -
ppgbiotec@ibtec.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	22 de dezembro de 2021	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:10
Matrícula do Discente:	41912BTC009				
Nome do Discente:	Adriane das Graças Silva				
Título do Trabalho:	Identificação e quantificação molecular de <i>Bacillus methylophilus</i> em raízes de soja				
Área de concentração:	Biotecnologia				
Linha de pesquisa:	Bioinformática e Biologia Molecular aplicada à genômica, transcriptômica e proteômica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Descoberta, caracterização e validação de marcadores e moléculas bioativas para o controle de doenças humanas, animais e vegetais				

Reuniu-se por Webconferência, Campus Patos de Minas, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Dra. Kelly Pazolini (Lallemand Plant Care Brasil), Profa. Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli (UFU) e Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo (UFU), orientadora da candidata. A reunião aconteceu pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre .

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Silva Siquieroli, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Pazolini, Usuário Externo**, em 23/12/2021, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3195420** e o código CRC **62997561**.

ADRIANE DAS GRAÇAS SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus*
methylophilus EM RAÍZES DE SOJA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
como requisito parcial obtenção de título de
Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Thaise Gonçalves de Araújo

Dra. Kelly Pazolini

Profa. Dra. Ana Carolina Siquieroli

Patos de Minas – MG

2021

DEDICATÓRIA

À Deus, família e amigos dedico os resultados deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de crescer e evoluir diante todos os desafios desta jornada acadêmica e pela vida daqueles que Ele permitiu que passassem comigo essa trajetória.

Aos meus pais, Alfredo e Valdete, pela vida e incansável amor. Obrigada por sempre me incentivarem a perseverar nos estudos. Vocês são minhas referências de resiliência e esta conquista é tão minha quanto de vocês. Vocês são a minha base e eu os amo além da vida!

Ao meu marido, Júnior, pelo apoio e por ser meu refúgio nos dias mais difíceis. O amor é o caminho para dias melhores! Vencemos, juntos, mais um desafio!

Aos meus irmãos, Álvaro, Adriel e Anne Gabrielle. Vocês são meus anjos aqui na Terra!

Aos meus sogros, Walterley e Helena, por todo acolhimento e orações nos dias mais desafiadores. O amor e cuidado de vocês nunca serão esquecidos!

À minha orientadora Thaise por acreditar no propósito deste trabalho e pelo incentivo em todos os momentos.

À minha amiga Débora por todo apoio e suporte nos experimentos, e principalmente, por toda amizade, amor e cuidado.

Às minhas amigas, em especial Fernanda e Isabelle, por estarem comigo nos dias mais difíceis e por todas as palavras de otimismo.

A Gizele, por toda dedicação e auxílio durante os experimentos.

Aos integrantes do grupo GBio e docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por todo conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal de Uberlândia por me permitir alcançar mais um objetivo na minha trajetória acadêmica.

À empresa e funcionários do Laboratório Lallemand Plant Care por todo suporte, apoio financeiro e contribuições para realização deste trabalho.

RESUMO

A soja (*Glycine max*) é a principal cultura agrícola do Brasil, o maior exportador mundial do grão. No entanto, a sua produtividade ainda é prejudicada por doenças desencadeadas por patógenos, nematoides e pragas. A bactéria gram-positiva, formadora de endósporos *Bacillus methylotrophicus* é definida como agente de biocontrole (ABC), ao produzir metabólitos com atividade antibiótica, especialmente contra fitonematoides encontrados nas raízes. As estratégias de manejo destes fitoparasitas envolvem a utilização concomitante de produtos à base de diferentes espécies de microrganismos. No entanto, devido à complexidade do ambiente rizosférico, torna-se desafiadora a predição da performance individual destes agentes. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar, por meio de ensaios moleculares, cepas de *B. methylotrophicus* em raízes de soja. Genes codificantes dessa cepa foram alinhados com os de outras espécies para a predição de regiões com polimorfismos únicos por meio de análises *in silico*. Para a diferenciação das espécies, foram selecionados os genes que codificam para as enzimas metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*) e proteína de germinação de esporos GerkB (*GerkB*) como prováveis marcadores quantitativos, uma vez que apresentaram dois polimorfismos únicos subsequentes na região 3' de alinhamento dos *primers*. Após a validação da especificidade dos *primers* por PCR convencional, duas combinações de oligonucleotídeos iniciadores para o gene *MtnB* discriminaram *B. methylotrophicus* das demais espécies com estrita relação filogenética. Uma das combinações foi utilizada na construção da curva-padrão absoluta para a quantificação de *B. methylotrophicus* em raízes de soja submetidas a tratamentos com diferentes ABCs. As análises de qPCR evidenciaram que a maior recuperação de DNA da bactéria de interesse foi obtida dos experimentos com *B. methylotrophicus* + *B. subtilis*, seguido de *B. methylotrophicus* + *B. subtilis* + *Trichoderma asperellum*. Não foi recuperado DNA dos controles não tratados, os quais não diferiram do tratamento com apenas *B. methylotrophicus*. Portanto, o marcador utilizado nesse estudo é específico a *B. methylotrophicus* e pode ser utilizado para inferir a influência de outros ABCs sob o desenvolvimento dessa cepa bacteriana.

Palavras-chave: Marcador molecular. *Bacillus methylotrophicus*. Controle biológico. SNPs. qPCR.

ABSTRACT

Soybean (Glycine max) is the main agricultural crop in Brazil, which is one of the world's largest exporters of this grain. However, soybean productivity is injured by diseases triggered by pathogens, nematodes and pests. The endospore-forming gram-positive bacteria Bacillus methylotrophicus is defined as a biocontrol agent (BCA), because this rhizobacteria produces metabolites with antibiotic activity, especially against nematodes found in root plants. The management strategies of these phytoparasites involve the concomitant use of products based on different microorganisms species. However, due to the complexity of rhizosphere environment, is challenging to predict the individual performance of these agents. Therefore, the present study aimed identify and quantify, through molecular assays, strains of B. methylotrophicus in soybean roots. Through in silico analysis genes of this strain were aligned with genes of other Bacillus strains to predict single nucleotide polymorphisms (SNPs) regions. For species discrimination, genes encoding the enzyme methylthioribulose-1-phosphate dehydratase (MtnB) and spore germination protein GerkB (GerkB) were selected as probable quantitative markers, since that two subsequent SNPs in region 3' of primer alignment were identified. The specificity of primers was validated by conventional PCR and two primers combinations for the MtnB gene able to discriminate B. methylotrophicus from other species with strict phylogenetic relationship was selected. Primer combination 1 (C1) was used to construct the absolute standard curve for B. methylotrophicus DNA quantification from soybean roots with treatments with different BCAs species. The qPCR analyzes showed that the highest DNA recovery of the bacteria of interest was obtained from the experiments with B. methylotrophicus + B. subtilis, followed by B. methylotrophicus + B. subtilis + Trichoderma asperellum. B. methylotrophicus DNA was not recovered from untreated controls (UTC) and there was no statistical difference between UTC and treatment with only B. methylotrophicus. Therefore, the molecular marker used in this study is specific to B. methylotrophicus and can be used to infer the influence of other BCAs on development of B. methylotrophicus.

Key-words: *Molecular Marker. Bacillus methylotrophicus. Biological Control. SNPs. qPCR.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Características morfológicas da soja e sua importância econômica	5
2.2 Decréscimo da produtividade de soja e sua relação com fitopatógenos de solo	6
2.2.1 Doenças causadas por fungos	6
2.2.2 Susceptibilidade da soja à fitonematoides.....	8
2.3 Desafios do manejo agroquímico da soja.....	11
2.4 Controle biológico como alternativa para manejo de doenças na soja	11
2.4.1 Espécies do gênero <i>Bacillus</i> spp. como agentes de biocontrole	12
2.5 Técnicas moleculares e sua aplicação no manejo biológico	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Análise <i>in silico</i> para seleção de marcadores moleculares	18
3.2 Obtenção das cepas e extração de DNA	19
3.3 Desenho e validação de <i>primers</i>	21
3.4 Construção da curva-padrão absoluta	21
3.5 Tratamento de sementes e semeadura em casa de vegetação	22
3.6 Extração de DNA de raízes e quantificação de <i>B. methylotrophicus</i> por qPCR	23
3.7 Análises Estatísticas	24
4 RESULTADOS	24
4.1 Predição de regiões com SNPs	24
4.2 <i>Primers</i> desenvolvidos para a detecção de <i>B. methylotrophicus</i>	25
4.3 Quantificação absoluta de <i>B. methylotrophicus</i> em raízes por qPCR	31
4.3.1 Eficiência de clonagem e recuperação do DNA plasmidial recombinante	31
4.3.2 Curva-padrão absoluta	32
4.3.3 Recuperação de <i>B. methylotrophicus</i> em raízes de soja	33
5 DISCUSSÃO	35

6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A – Figuras Suplementares	52

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das principais fontes de proteínas e óleo destinados à alimentação humana, nutrição animal e obtenção de biocombustíveis. O aumento da produção na safra 2021/22 é de 4,0 % em relação à safra 2020/21, o qual foi possível graças a expansão de 3,7% da área de cultivo da soja (CONAB, 2021). No entanto, o sistema de monocultivos expõe a cultura da soja ao ataque de pragas e patógenos, os quais, conseqüentemente, afetam diretamente o aumento do rendimento das lavouras (LIU et al., 2015).

Os fitopatógenos expressam diferentes genes envolvidos no estabelecimento da infecção. Em contrapartida, a planta hospedeira produz substâncias responsivas aos fatores de virulência, embora insuficientes para impedir o desenvolvimento de doenças (DIXON e LAMB, 1990). A utilização de pesticidas químicos no manejo de pragas e doenças é a estratégia mais empregada, porém amplamente questionada devido aos efeitos residuais deixados em plantas, grãos e no meio ambiente. Além disso, oferecem riscos à saúde humana pela alta toxicidade dos princípios ativos presentes em suas formulações.

Nesse contexto de demanda econômica e limitações de cultivo, emerge a necessidade de novas estratégias para redução populacional de fitopatógenos. O manejo biológico visa maximizar o controle de pragas e doenças criando ou aumentando a população de microrganismos benéficos, na escala local de aplicação. Estes microrganismos benéficos são definidos como agentes de biocontrole (ABCs), os quais são biotróficos e competem por espaço e nutrientes com patógenos, incitando mecanismos de resistência nas plantas com as quais mantêm simbiose (FIEDLER et al., 2008). Rizobactérias gram-positivas do gênero *Bacillus* são amplamente relatadas como ABCs e oferecem vantagens no manejo agrícola. Além disso, as espécies de *Bacillus* são capazes de produzir esporos que lhes permitem resistir a condições ambientais adversas, além de serem prontamente manipulados em formulações, as quais são facilmente armazenadas. Diferentes produtos à base dessas bactérias são comercializados, como pesticidas ou fertilizantes microbianos (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011). Estas formulações de *Bacillus* têm sido utilizadas no controle biológico de nematoides, uma vez que reduzem a população de parasitas e promovem o crescimento da planta (CHINHEYA et al., 2017).

Acredita-se que o estabelecimento de microrganismos benéficos no sistema radicular, utilizados para o controle de doenças em lavouras, pode ser afetado por diversos fatores, como as condições ambientais e a competição com outros microrganismos por espaço e nutrientes. Além disso, as prescrições de produtos biológicos envolvem o uso combinado de diferentes

princípios ativos, visando aumentar o espectro de proteção das plantas (MUMTAZ et al, 2018; FERREIRA et al, 2021). Portanto, torna-se importante definir ferramentas capazes de identificar e quantificar a presença de cada um destes ABCs. Para isso, estratégias inerentes à biologia molecular, especialmente quantitativos como a qPCR, demonstram a acurácia necessária. Essa abordagem permite monitorar ABCs a nível de DNA, o que a torna especialmente vantajosa na discriminação de espécie estritamente correlacionadas como aquelas dentro do gênero *Bacillus*. Além disso, os dados obtidos por quantificação absoluta podem ser utilizados para inferir as interações entre ABCs no ambiente de estudo. Portanto, hipotetizamos que cepas de *B. methylotrophicus* podem ser quantificadas de forma eficiente por qPCR, utilizando marcadores específicos previamente identificados.

Dessa forma, o objetivo primordial deste estudo foi identificar e quantificar por PCR convencional e qPCR a cepa do ABC *B. methylotrophicus* em raízes de soja. Secundariamente, objetivou-se: (i) selecionar genes-alvo como possíveis marcadores para a diferenciação molecular de *B. methylotrophicus*; (ii) desenhar oligonucleotídeos iniciadores capazes de diferenciar *B. methylotrophicus* de outros microrganismos presentes em raízes da soja; (iii) comparar a especificidade dos *primers* desenhados; (iv) construir uma curva padrão absoluta para quantificação de *B. methylotrophicus*; (v) quantificar *B. methylotrophicus* presentes em raízes de soja sob diferentes condições de tratamento e (vi) inferir a compatibilidade entre a espécie em estudo e outros ABCs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características morfológicas da soja e sua importância econômica

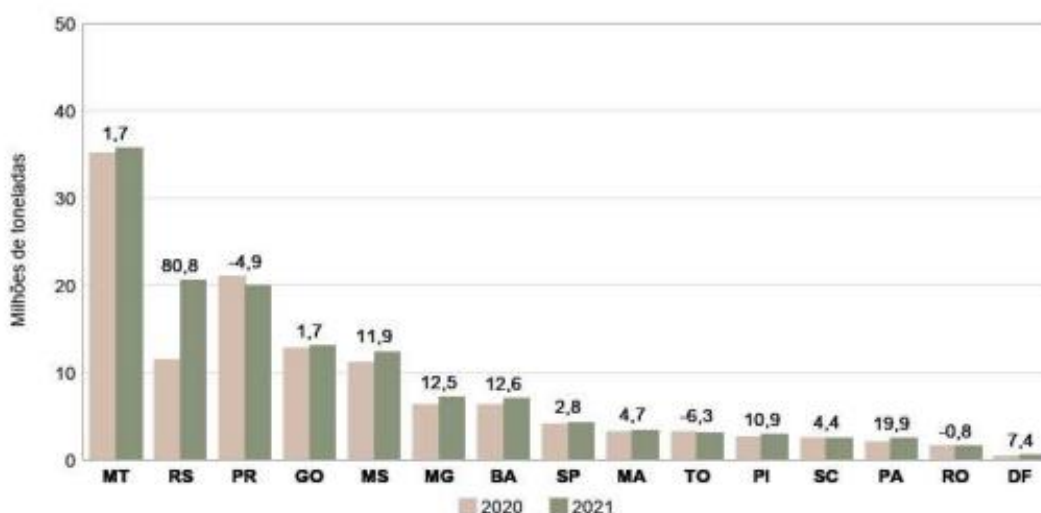
A soja é uma planta herbácea originária da região central da China que foi domesticada e, posteriormente, disseminada para Europa, América do Norte e América do Sul. Sua introdução no Brasil se deu por volta de 1882, na região da Bahia (VERNETTI, 1983). Possui caule hispido e com poucas ramificações, folhas trifoliadas, com exceção do primeiro par acima do nó cotiledonar. Pode apresentar crescimento determinado, no qual, após o estágio de floração, não há emissão de novos nós no caule; indeterminado, em que a planta desenvolve ramificações após o florescimento; ou semi-determinado, apresentando características de ambos crescimentos supramencionados (THOMAS, 2018). Ao final do seu ciclo, a soja desenvolve vagens, que são estruturas responsáveis por abrigar as sementes. Estas, por sua vez, apresentam morfologia lisa, elíptica ou globosa, de tegumento amarelo pálido, marrom ou preto com hilo preto, marrom ou amarelo-palha. As plantas podem atingir dimensões entre 60 e 110 centímetros, dependendo da cultivar e das condições edafoclimáticas nas quais a cultura é cultivada (NEPOMUCENO et al., 2019).

As variedades comerciais de soja acumulam um percentual de 36% de proteínas e 18% de óleo em suas sementes. No processamento do grão, cerca de 79 % são destinados à fabricação de ração animal e é considerado “padrão ouro” de suplemento proteico quando comparado com outras fontes do mesmo nutriente. O óleo corresponde a 21% do subproduto destinado à produção do óleo de soja, utilizado como alimento e para produção de biodiesel. (CROMWELL, 1999).

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), as exportações de soja em 2017 renderam uma receita bruta estimada em US\$ 217,74 bilhões para a economia do Brasil. A safra 2020/21 (**Figura 1**) apresentou recorde de produção, sendo 10,3% maior do que a safra anterior. O estado do Mato Grosso responde pelo maior percentual do total a ser produzido pelo país, com a colheita acima de 30 milhões de toneladas. Ademais, o estado do Rio Grande do Sul apresentou uma expansão produtiva de 80,8%, o que gerou um incremento de 9,1 milhões de toneladas de soja para a produção total nacional. Além do impacto na economia brasileira, a cultura dessa leguminosa ainda apresenta elevada relevância social, uma vez que a cadeia produtiva do grão gera, direta ou indiretamente, empregos que atendem às mais diversas classes sociais (FARIAS et al., 2007).

No entanto, ainda existem fatores que interferem no máximo desempenho produtivo desta oleaginosa. Dentre estes, as condições endofoclimáticas da safra de 2019/20 não foram favoráveis para a produtividade do grão, prejudicando o rendimento médio nacional (IBGE, 2019). Aliado a este fato, destaca-se a susceptibilidade da soja a fitopatógenos, os quais incluem fungos, bactérias, nematoides e vírus. Os efeitos nos índices econômicos de cada doença variam de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas podem variar entre 15% e 20% da produção total. Portanto, a não detecção precoce da presença de fitopatógenos no solo ou um manejo inadequado podem gerar prejuízos de quase 100% na produtividade (AGROPECUÁRIA, 2013).

Figura 1. Estimativas da produção de soja, segundo as principais Unidades da Federação produtoras e sua variação anual (%) para as safras 2020/2021.



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – outubro de 2021.

2.2 Decréscimo da produtividade de soja e sua relação com fitopatógenos de solo

2.2.1 Doenças causadas por fungos

A soja é suscetível a aproximadamente 21 fungos fitopatogênicos que podem infectar o caule, tecidos foliares e radiculares nos diferentes estádios fenológicos da cultura. O fungo *Colletotrichum truncatum* é o agente etiológico da antracnose, responsável por afetar a formação inicial das vagens. A associação da presença do fungo com as condições climáticas

pode ocasionar perda total da produção em períodos com grande volume de chuvas e altas temperaturas. Os principais sintomas causados pela infecção por *C. truncatum* são a presença de manchas negras nas nervuras das folhas, hastes e vagens (HENNING et al., 2014).

O patógeno *Rhizoctonia solani* ocorre naturalmente no solo e infecta as plantas entre os estádios de pré-emergência e pós-emergência (30-35 dias após a semeadura) em locais com umidade e temperatura elevadas. Os sintomas são caracterizados por manchas de coloração escura na haste tangente ao solo e, geralmente, são emitidas raízes adventícias acima da região afetada, uma vez que o sistema radicular é alvejado pelo patógeno. Em lavouras, a presença de plantas infectadas com *R. solani* pode ser detectada pela formação de reboleiras, que são regiões onde há concentração de plantas mortas (GODOY et al., 2016).

A podridão vermelha de raiz é uma patologia desencadeada pelo *Fusarium solani*. Na soja, a primeira manifestação infecciosa ocorre na raiz, a qual apresenta descoloração vascular acastanhada que se estende em direção ao caule, com a medula remanescente branca. As plantas infectadas podem ser retiradas do solo com maior facilidade e, em algumas ocasiões, pode ser observada uma massa de conídios na superfície radicular, evidenciando a esporulação do fitopatógeno nesta região. A fase mais visualmente proeminente da doença ocorre quando os sintomas foliares são observados no campo, o que geralmente acontece após o florescimento. Inicialmente, as folhas mostram manchas cloróticas interveolares dispersas que se expandem e se tornam necróticas (HARTMAN et al., 2015).

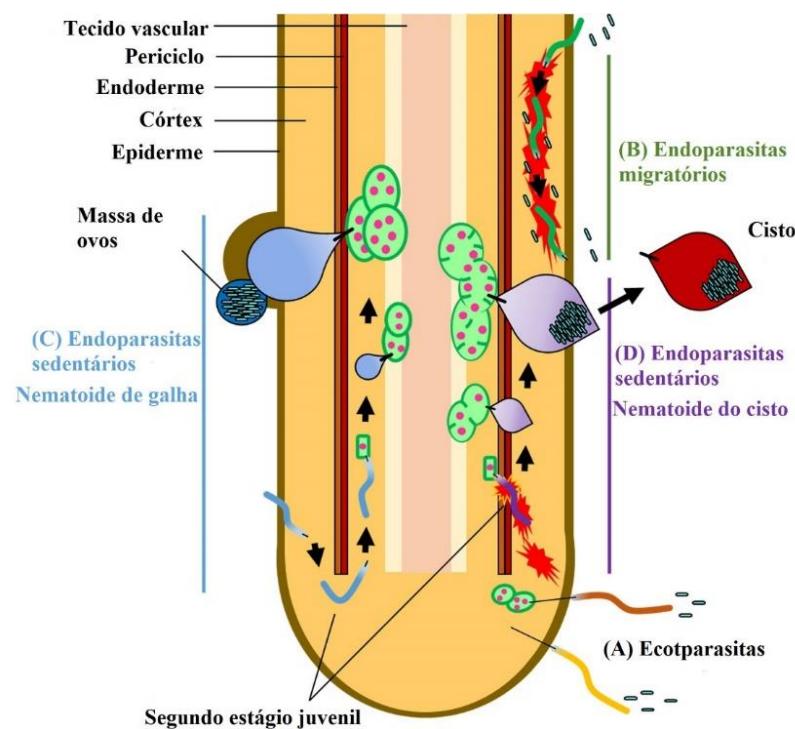
Entre os estádios de floração e desenvolvimento das vagens, a soja apresenta vulnerabilidade acentuada à infecção por *Sclerotinia sclerotium*. *S. sclerotium* é capaz de formar estruturas de resistência denominadas escleródios, os quais garantem a propagação da doença entre cultivos em uma mesma área e, conseqüentemente, dificultam a erradicação do patógeno. (GOULART, 1997). Condições ambientais frias e úmidas favorecem a germinação destas estruturas, levando à infecção e necrose de folhas juntamente com a cobertura de caule e vagens por micélios de coloração branca (CHEN e WANG, 2005). Este fungo é um produtor prolífico de enzimas, como pectinases, celulasas e hemicelulasas, as quais facilitam a degradação da parede celular da planta e posterior colonização pelo hospedeiro (AMSELEM et al., 2011). Além disso, *S. sclerotium* secreta ácido oxálico que diretamente ou em combinação com outros fatores de virulência, suprime o metabolismo oxidativo da planta hospedeira, de forma que as células infectadas ativam mecanismos de morte celular programada (CESSNA et al., 2000; RANJAN et al., 2018). A via de secreção de oxalato também contribui com a acidificação tecidual do hospedeiro e, juntamente com o sequestro de íons cálcio, facilita a degradação enzimática da parede celular (KABBAGE et al., 2015).

2.2.2 Susceptibilidade da soja à fitonematoides

Os nematoides são capazes de se estabelecerem em quase todos os nichos ecológicos possíveis, apesar de sua estrutura corporal relativamente simples. Aqueles que habitam o solo se alimentam de bactérias, fungos, insetos ou de raízes de plantas. Alguns podem passar todo o seu ciclo de vida apenas alimentando-se da superfície ou tecidos mais profundos das raízes, outros são capazes de invadir o sistema radicular e se alimentarem de células corticais ou estelares. Todos os nematoides que infectam plantas são parasitas biotróficos obrigatórios, pois requerem nutrientes das células vivas para sobreviverem, modificando-os por meio de secreções salivares antes da ingestão. Durante a infecção, os nematoides usam sinais vegetais, denominados aleloquímicos, para garantir uma sincronia estreita entre o seu ciclo de vida e o do hospedeiro. Os aleloquímicos influenciam, especialmente, a eclosão de ovos e a fisiologia dos parasitas juvenis em desenvolvimento (WYSS, 1997).

Os nematoides parasitas de plantas podem ser classificados como: (i) ectoparasitas quando permanecem na parte externa da planta e utilizam seu estilete para se alimentarem das células da raiz (**Figura 2A**); (ii) semi-endoparasitas, ao penetrarem parcialmente na planta e se alimentarem desta em algum momento de seu ciclo de vida; (iii) endoparasitas migratórios (**Figura 2B**), os quais passam grande parte do tempo migrando pelos tecidos das raízes e alimentando-se destrutivamente de células vegetais; e (iv) endoparasitas sedentários (**Figura 2C e 2D**), quando o nematoide passa a maior parte de sua vida sedentária dentro do tecido da planta, estabelecendo um parasitismo altamente especializado (PALOMARES-RIUS et al., 2017). Considerando as perdas de produtividade da soja, nematoides do grupo iii e iv são os que mais impactam a economia.

Figura 2. Estratégias de infecção de nematoides parasitas de plantas. (A) Os ectoparasitas absorvem nutrientes das células vegetais sem invadir a raiz. (B) Os endoparasitas migratórios (nematoides das galhas - NG), como *Meloidogyne* spp., e nematoides do cisto (NC), como *Heterodera* spp., se movem através dos tecidos radiculares causando destruição e alimentando-se de tecidos vegetais. (C) Os juvenis de segundo estágio de NGs penetram na raiz e migram intercelularmente para o cilindro vascular, onde reprogramam os tecidos radiculares formando células gigantes. Após o estabelecimento de células gigantes, os NGs juvenis se tornam sedentários e absorvem nutrientes e água através de um estilete de alimentação. As fêmeas adultas de NGs formam uma massa de ovos na superfície radicular ou abaixo desta. (D) Os juvenis de segundo estágio de NCs se movem intracelularmente na raiz, causando destruição dos tecidos das plantas à medida que avançam, induzindo a formação de sincícios nos tecidos vasculares como células alimentadoras.



Fonte: Adaptado de (SATO et al., 2019).

Dentre os principais organismos que atacam a soja, destacam-se os de lesões, representados pela espécie *Pratylenchus brachyurus*, os formadores de galha (NGs), como *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e os nematoides de cisto (NCs), como *Heterodera glycines*. Os sintomas causados são geralmente inespecíficos e associados à deficiência de nutrientes, murcha incipiente, nanismo, baixa produtividade e, às vezes, morte das plantas. Com exceção de galhas nas raízes e presença de necrose ou deformações causadas por espécies específicas, a detecção dos sinais é desafiadora (PALOMARES-RIUS et al., 2017). Geralmente, cultivos infectados por nematoides formam as reboleiras, as quais são regiões com maior densidade de plantas cloróticas e atrofiadas. O dano causado por estes parasitas ainda pode ser agravado pela alta compactação do solo e pelo déficit hídrico (KIMATI et al., 1997).

Nematoides da espécie *P. brachyurus* são endoparasitas migratórios capazes de destruir os tecidos radiculares ao rompê-los superficial e internamente, utilizando-se de seu estilete de alimentação, de sua movimentação ao longo da raiz e da degradação enzimática das paredes celulares vegetais (**Figura 2B**). Tanto juvenis quanto adultos podem penetrar e sair das raízes, o que dificulta a detecção de sua presença e os danos que causam. Durante a migração intracelular, esses nematoides se alimentam do citosol vegetal, causando a destruição do tecido radicular e a promoção de infecções secundárias por outros patógenos. As fêmeas depositam seus ovos dentro da raiz ou no solo adjacente, garantindo a propagação do parasita (JONES e FOSU-NYARKO, 2014; BELL et al., 2018).

Meloidogyne spp. são endoparasitas sedentários que, em seu segundo estágio juvenil (J2), infectam seus hospedeiros. Ao penetrar a raiz, o nematoide forma sítios multinucleados denominados de células gigantes (**Figura 2C**). Como consequência, são observadas galhas que se assemelham a nódulos de fixação de nitrogênio. Contudo, as galhas possuem tamanho maior e são originadas pela expansão da própria raiz, através da qual as fêmeas projetam-se e depositam massas de ovos na superfície da estrutura (KIM et al., 2016; ELHADY et al., 2017). As raízes infectadas são mais curtas que as saudáveis e os elementos vasculares deformados em galhas impedem a absorção efetiva de água e nutrientes. Os sintomas acima do solo causados por *Meloidogyne* spp. são plantas raquíticas e cloróticas, sendo de difícil distinção daqueles causados por outros patógenos de solo (TAYLOR e SASSER, 1978).

Os NCs (**Figura 2D**), como *Heterodera glycines*, são endoparasitas sedentários que infectam raízes mediante a produção de moléculas que facilitam a invasão no hospedeiro. Estas são produzidas principalmente em três glândulas salivares esofágicas e injetadas nas células vegetais através do estilete em forma de seringa. Também são responsáveis por bloquear as respostas de defesa das plantas e por mediar a formação, no hospedeiro, de células especializadas (sincícios) em manter a alimentação do parasita (SOBCZAK e GOLINOWSKI, 2011; MEJIAS et al., 2019).

Os nematoides parasitas de plantas são mais vulneráveis durante sua fase ativa no solo, na qual procuram as raízes das plantas hospedeiras. Uma vez que as espécies endoparasitas penetram na raiz, o controle com produtos químicos é restrito, pois os nematicidas precisam ser não fitotóxicos e preferencialmente sistêmicos (GOWEN, 1997). Ainda que o uso de pesticidas possibilite o aumento da produção, simplificando os sistemas de cultivo, a confiança excessiva no controle químico está associada à contaminação dos ecossistemas e aos efeitos indesejáveis à saúde humana. Além disso, o futuro da produção agrícola está ameaçado pela emergência de

variantes resistentes aos agroquímicos utilizados e pela diminuição da disponibilidade de substâncias ativas (BARZMAN et al., 2015).

2.3 Desafios do manejo agroquímico da soja

O termo pesticida abrange uma gama de compostos, incluindo inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, reguladores de crescimento vegetal e outros químicos destinados ao manejo de culturas agrícolas. O uso desses produtos tem relação com o aumento da produção e, de fato, são responsáveis pela redução de doenças e pragas em lavouras. No entanto, sérias implicações para saúde humana e do meio ambiente são associadas à sua aplicação, uma vez que podem contaminar solos e mananciais hídricos, além de deixarem resíduos que podem ser encontrados em uma grande variedade de alimentos e bebidas (AKTAR et al., 2009; NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016). Além disso, o sistema de monocultivos agrava o quadro de perda da proteção a pesticidas, uma vez que grandes áreas de culturas geneticamente uniformes fornecem criadouros ideais para o quadro de resistência. Há, portanto, a necessidade de se projetar modelos de cultivo menos dependentes de pesticidas sintéticos (FISHER et al., 2018).

Sendo assim, devido à crescente demanda por aumento na produtividade aliada aos problemas no manejo químico e as dificuldades de desenvolvimento de variedades resistentes, é premente a busca de medidas alternativas de controle de pragas e patógenos (LUCON et al., 2014). O controle biológico (CB) é uma abordagem que foi primeiramente proposta em 1965 e engloba a utilização de indivíduos com capacidade de controlar a população de pragas e/ou estimular mecanismos de defesa na própria planta (EILENBERG, 2006; ALABOUVETTE et al., 2009).

2.4 Controle biológico como alternativa para manejo de doenças na soja

A redução da produtividade de culturas agrícolas economicamente importantes, aliada às desvantagens do uso exclusivo de agroquímicos, demandaram novas alternativas de manejo de fitopatógenos. O CB é uma medida que visa reduzir a população de insetos ou patógenos utilizando inimigos naturais (predadores, parasitas e/ou antagonistas) que mantenham relações de simbiose com as plantas e que sejam capazes de reduzir a população de pragas e/ou patógenos diretamente ou de incitar mecanismos de defesa na planta-hospedeira. (PALLINI et al., 2010).

As raízes das plantas liberam quantidades substanciais de compostos ricos em carbono e nitrogênio, os quais se encontram disponíveis no solo circundante. Esses exsudatos são benéficos, uma vez que aumentam a disponibilidade de nutrientes para a absorção pelas raízes, reduzindo a concentração de cátions tóxicos na rizosfera e o acúmulo intracelular de metabólitos potencialmente danosos (RYAN et al., 2001). Microrganismos são atraídos por este microambiente nutritivo e utilizam esses exsudatos radiculares e lisados como fontes nutritivas para seu crescimento e multiplicação na superfície radicular e no solo adjacente (HASSAN et al., 2019). Nesse contexto, encontram-se inseridos o CB e a utilização de ABCs no combate a pragas, os quais consistem na intervenção humana para a proteção e concomitante estímulo de inimigos naturais visando uma maior produtividade. O CB de conservação, com a utilização de ABCs, foca no papel do microbioma natural para a supressão de doenças de plantas em solos e resíduos de culturas, proporcionando resiliência à infecção (VAN LENTEREN et al., 2018). De fato, esse sistema tem se mostrado eficiente em minimizar as perdas causadas por patógenos de solo. Os ABCs afetam a sobrevivência e inibem o crescimento de pragas ao se estabelecerem, colonizarem e se reproduzirem em favor do equilíbrio biológico na área de cultivo (ÁVILA et al., 2005).

Os ABCs englobam uma gama de microrganismos. Membros do gênero *Trichoderma* são fungos filamentosos, não-patogênicos, encontrados naturalmente no solo. Devido à sua rizocompetência, estes fungos mantêm relações simbióticas com diversas espécies de plantas (HERMOSA et al., 2013). Algumas espécies do gênero *Bacillus* são frequentemente consideradas fábricas microbianas para a produção de moléculas biologicamente ativas e potencialmente inibitórias para o crescimento de fitopatógenos (ONGENA e JACQUES, 2008). São bactérias gram-positivas, podendo ser aeróbias obrigatórias ou facultativas, com capacidade de crescimento em variadas fontes de carbono. Em situações de estresse ambiental, estes microrganismos são capazes de formar estruturas de sobrevivência denominadas endósporos (MADIGAN et al., 2016).

2.4.1 Espécies do gênero *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole

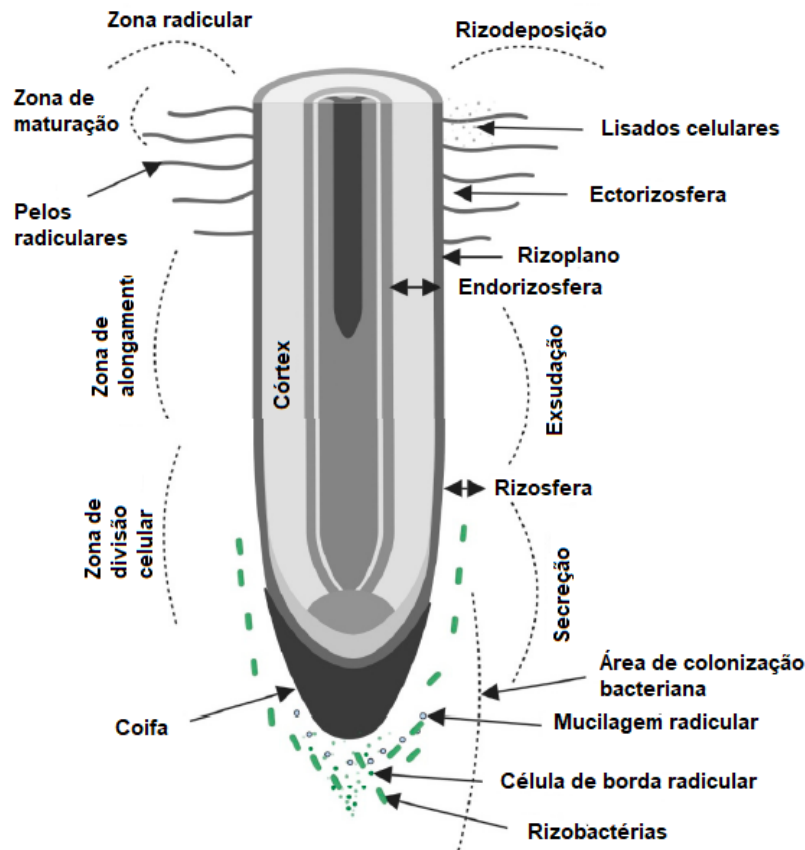
A rizosfera é uma zona estreita de solo circundante influenciada pela raiz das plantas vasculares, caracterizada por intensa atividade biológica devido à liberação de exsudatos radiculares. Estes atuam como estimulantes ou inibidores de organismos da rizosfera. As interações entre solo, planta e microrganismos que compõem este ambiente caracterizam sua complexidade e dinamismo. São encontradas relações simbióticas, como a fixação de

nitrogênio e associações micorrízicas, e, inclusive, interações patogênicas (KENNEDY e DE LUNA, 2005).

A rizosfera está em constante fluxo dinâmico. Esta região inclui três zonas definidas com base em sua relativa proximidade (**Figura 3**). A endorizosfera inclui porções do córtex e endoderme, em que microrganismos e cátions ocupam o espaço apoplástico entre as células. O rizoplano é a zona medial diretamente adjacente à raiz, incluindo sua epiderme e mucilagem. A zona mais externa é a ectorizosfera, que se estende do rizoplano até o solo. Devido à complexidade e diversidade inerentes aos sistemas radiculares das plantas, a rizosfera não é uma região de tamanho ou forma definida, visto que suas propriedades químicas, biológicas e físicas mudam radial e longitudinalmente ao longo da raiz (MCNEAR JR, 2013).

Na rizosfera, as interações rizobacterianas podem ser positivas, negativas ou neutras. Interações positivas podem resultar na promoção do crescimento das plantas (PGP: rizobactérias promotoras de crescimento de plantas – do inglês: *plant growth promoting*) e supressão de patógenos vegetais. Os gêneros rizobactérias promotoras de crescimento (PGPRs – do inglês *plant growth promoting rhizobacteria*) incluem *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Cellulomonas Flavigena* (HASSAN et al., 2019).

Figura 3. Representação das zonas radiculares presentes na rizosfera. Os exsudatos e a mucilagem radiculares fornecem nutrientes para a colonização e crescimento de rizobactérias no sistema radicular. Nesse local, as bactérias atuam em simbiose direta com as plantas utilizadas como hospedeira, fornecendo a estas maior área de contato com o solo e incitando mecanismos de defesa contra patógenos.



Fonte: Adaptado de HASSAN et al., 2019.

O gênero *Bacillus* compreende espécies de bactérias formadoras de endósporos que podem ser encontradas no solo em simbiose com o ambiente rizosférico vegetal. Os endósporos são estruturas de resistência que possuem características importantes para a sobrevivência das cepas, incluindo a presença de uma parede celular de múltiplas camadas. Além disso, aspectos fisiológicos destas bactérias, como a secreção de peptídeos com funções antibióticas, peptídeos-sinal e enzimas extracelulares, garantem sua sobrevivência e propagação no solo (MCSPADDEN GARDENER, 2004). Essas bactérias ainda são PGPRs e incitam mecanismos de resistência nas plantas com as quais interagem (KLOEPPER et al., 2004).

A maioria das espécies de *Bacillus* é considerada segura, difundida em diversos habitats. Esses indivíduos controlam doenças de plantas por PGP e antibiose. No primeiro mecanismo, há a melhoria dos parâmetros agrônômicos como aumento de biomassa e comprimento de raiz. Na antibiose são sintetizados pelos *Bacillus* compostos secundários com atividade

antimicrobiana. Estes apresentam baixo peso molecular (<1000 Da) e não são essenciais para a sobrevivência das bactérias produtoras. Fornecem vantagens seletivas, melhorando a performance do microrganismo para absorção de nutrientes ou para protegê-lo contra estresses ambientais (BREITLING et al., 2013; PINU et al., 2017). Tais antibióticos são divididos em três classes: lipopeptídeos, policetídeos e bacteriocinas. Enquanto as bacteriocinas são produzidas nos ribossomos, os lipopeptídeos e policetídeos não são sintetizados por estas fábricas proteicas, mas apresentam alta heterogeneidade estrutural e funcional (ONGENA e JACQUES, 2008; FRIKHA-GARGOURI et al., 2017).

Cepas de *Bacillus* estão amplamente disponíveis no solo e apresentam grande potencial para o CB de nematoides. Com base em seus mecanismos de ação, as bactérias nematófagas incluem aquelas parasitas obrigatórias, parasitárias oportunistas, rizobactérias, formadoras da proteína *Cry*, endofíticas e simbióticas. De fato, a maioria das bactérias nematófagas, com exceção das parasitas obrigatórias, é saprófita, alvejando os nematoides como uma possível fonte de nutrientes. Ainda, em algumas condições, esses microrganismos são capazes de penetrar na barreira cuticular para infectar e matar o fitoparásita (TIAN et al., 2007). Em 2014, Wei e colaboradores demonstraram que a exposição de NGs *M. incognita* em filtrados de *B. subtilis* conduziu à mortalidade substancial dos parasitas em estágio juvenil J2, comprometendo significativamente a eclosão de ovos *in vitro*. Em casa de vegetação, o tratamento com a cepa bacteriana reduziu o número de galhas e a severidade da doença. Os mecanismos desencadeados pela rizobactéria, que culminaram no controle populacional de nematoides, incluíram intensa secreção de proteases, quitinases e compostos sideróforos (WEI et al., 2014).

B. methylotrophicus é uma rizobactéria gram-positiva formadora de endósporos definida como ABC por sua capacidade de secretar metabólitos com efeitos antifúngicos, antibacterianos e nematicidas. Além disso, produz substâncias relacionadas com o estímulo da germinação de sementes e concentração de clorofila e carotenoides nas plantas com as quais mantém simbiose (MADHAIYAN et al., 2010; RADHAKRISHNAN e LEE, 2016; JEMIL et al., 2017). A capacidade de crescimento em meios com sais minerais de amônio seletivos suplementados com 0,5% de metanol, como única fonte de carbono, confere a esta cepa sua característica metilotrófica (FRIKHA-GARGOURI et al., 2017). Essa espécie também é considerada uma PGPR, uma vez que os compostos produzidos por estes microrganismos aumentam o *pool* ativo de auxinas das plantas, estimulando seu crescimento e reprogramando a morfogênese da raiz (PÉREZ-FLORES et al., 2017). Um estudo prévio demonstrou que plantas tratadas com o caldo fermentado deste bacilo apresentaram um aumento significativo

no peso fresco, no comprimento de raiz e da parte aérea, quando comparadas com indivíduos não submetidos à *B. methylotrophicus* (GE et al., 2016).

A incidência e severidade incitadas pelo nematoide *M. incognita* são reprimidas quando há o manejo com *B. methylotrophicus*. Segundo Zhou e colaboradores (2016) além de reduzir os níveis de galhas nas raízes, o ABC apresentou melhor desempenho ao aumentar o rendimento de tomateiros em campo, quando comparados com plantas tratadas somente com os fitoquímicos abamectina e carbofurano (ZHOU et al., 2016). Ainda, já foi demonstrado que a interação simbiótica entre *B. methylotrophicus* e plantas de morango fortaleceu a parede celular de folhas, enquanto os compostos voláteis produzidos pela rizobactéria protegeram os vegetais contra a infecção pelo fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* (VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018).

2.5 Técnicas moleculares e sua aplicação no manejo biológico

Os ABCs atuam no controle populacional de pragas e patógenos agrônômicos e, conseqüentemente, se mostram como uma estratégia eficaz para a redução de aplicação de pesticidas químicos. Devido à diversidade de patógenos que comprometem o potencial produtivo da soja, geralmente se faz necessária a aplicação concomitante de diferentes produtos biológicos. No entanto, a predição da performance de cada microrganismo que compõem a base destes produtos é dificultada pela heterogeneidade microbiológica do ambiente rizosférico.

Os microrganismos podem ser diferenciados pela avaliação de suas características morfológicas. No entanto, mesmo que estas sejam decorrentes do genótipo dos indivíduos, os parâmetros são limitados e se tornam insuficientes para distinguir organismos filogeneticamente relacionados. Nesse contexto, destacam-se as análises moleculares. Sua vantagem consiste na singularidade genética, em que as diferenças entre as sequências resultam da evolução molecular ao longo do tempo, podendo ser utilizadas na distinção de espécies (PATWARDHAN et al., 2014).

Métodos de identificação baseados em técnicas de biologia molecular permitem analisar a composição de espécies presentes em comunidades microbianas complexas (SAVAZZINI et al., 2008; MARTÍNEZ-BLANCH et al., 2011). A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é um método rápido, sensível e confiável para detectar a presença e monitorar a expressão gênica de microrganismos. A técnica foi criada por Kary Mullis em 1983 (MULLIS, 1990) e envolve o uso de uma DNA polimerase obtida da bactéria termófila *Thermus aquaticus* para a amplificação exponencial *in vitro* de uma sequência de DNA-alvo. A informação prévia desta

sequência é, portanto, necessária para a síntese de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) apropriados para a polimerização específica do segmento de interesse. Também são incluídos na reação desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons magnésio e o tampão otimizado para a atividade enzimática.

Na PCR convencional, a detecção é normalmente realizada no ponto final de amplificação, com reduzido valor quantitativo. Contudo, o conhecimento mais profundo sobre a colonização e sobrevivência dos ABCs em diferentes culturas e sob diferentes condições ambientais é crucial para melhorar seu uso e otimizar sua eficácia contra patógenos, tornando-se necessária a realização de métodos quantitativos, como a PCR em tempo real (qPCR), (ROTOLO, DE MICCOLIS ANGELINI, et al., 2016).

Abordagens envolvendo o uso de qPCR têm sido utilizadas para a detecção rápida de espécies ou genes específicos, destacando-se por sua sensibilidade, reprodutibilidade e minimização de contaminação (FERNÁNDEZ-NO et al., 2011; CATTANI et al., 2016). As estratégias empregadas incluem: (i) corantes fluorescentes que intercalam não especificamente ao DNA de fita dupla e (ii) o anelamento de sondas de DNA específicas. Nestas, fluorocromos repórteres são detectados apenas após hibridização e atividade da polimerase. Na qPCR, à medida que a quantidade de produto se acumula, um sinal é emitido e, inicialmente, aumenta exponencialmente. Posteriormente, o sinal é nivelado e saturado. Em um experimento típico, todas as curvas de amplificação saturam no mesmo nível. Portanto, ensaios analisados no ponto final são qualitativos (KUBISTA et al., 2006). Os quantitativos são avaliados na fase exponencial. Nesta, são considerados os ciclos de amplificação necessários para que as curvas das amostras atinjam um limiar específico denominado C_q (do inglês: *quantification cycle*). Portanto, a eficiência de um ensaio de qPCR deve ser estimada a partir de uma curva padrão baseada na diluição seriada de uma amostra de referência, a qual pode ser um produto de PCR ou um plasmídeo, ambos purificados e com a sequência alvo. Os valores de C_q dos padrões diluídos são avaliados e plotados em relação ao logaritmo das concentrações das amostras, número de cópias do modelo ou fator de diluição (RUTLEDGE e CÔTÉ, 2003; KUBISTA et al., 2006).

No que se refere a estudos com ABCs, ensaios de qPCR foram desenvolvidos e validados para a detecção quantitativa e específica de *Trichoderma asperelum* e *Trichoderma gamsii* em caules de videiras e solo da cultura, objetivando otimizar a aplicação de ABCs no campo, bem como investigar a dinâmica das populações envolvidas (GERIN et al., 2018). Marcadores moleculares específicos também foram desenvolvidos para *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, em experimentos de qPCR com DNA extraído da água de lavagem de bagas

de uva. O método se mostrou específico e sensível para ambos os ABCs, permitindo a detecção em densidades baixas (três unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de bagas) (ROTOLO, ANGELINI, et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise *in silico* para seleção de marcadores moleculares

O genoma da cepa *B. methylotrophicus* em estudo foi previamente sequenciado pela empresa Lallemand Plant Care Brasil e disponibilizado para análise. Para a escolha dos marcadores moleculares foi realizada a busca por genes com regiões polimórficas passíveis para o desenho de *primers* e capazes de diferenciar as espécies filogeneticamente semelhantes ao *B. methylotrophicus*. Foram considerados marcadores os genes cujos SNPs fossem específicos para *B. methylotrophicus* e, portanto, diferentes nas demais espécies. As etapas encontram-se descritas na **Figura 4**. Os genes de *B. methylotrophicus* foram alinhados utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ZHANG et al., 2000) visando comparar as sequências desse organismo com dados genômicos de outras espécies do mesmo gênero. Para as espécies que alinharam com os genes de *B. methylotrophicus* foi realizado o alinhamento múltiplo utilizando a ferramenta Kaling (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS et al., 2011), Jalview (WATERHOUSE et al., 2009) e MEGA versão 10.1.7 (KUMAR et al., 2018) a fim de encontrar polimorfismos nas sequências de *B. methylotrophicus* capazes de diferenciá-los de outras espécies do gênero. Posteriormente o software DNAMAN Versão 10 (Lynnon Biosoft) gerou as figuras com as regiões com SNPs exclusivos de espécies de *B. methylotrophicus*. Foram escolhidos genes com pelo menos dois SNPs subsequentes na região 3' de anelamento dos *primers*.

Figura 4. Fluxograma de análises *in silico* para seleção dos genes utilizados como marcadores moleculares para *Bacillus methylophilicus*.



3.2 Obtenção das cepas e extração de DNA

Todas as espécies e cepas utilizadas foram obtidas da Coleção de Microrganismos do Laboratório Lallemand Plant Care Brasil (**Tabela 1**).

Tabela 1. Cepas utilizadas para extração de DNA

Cepas	Espécies
GF267	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
GF06	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GF07	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GF09	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GF10	<i>Bacillus subtilis</i>
GF33	<i>Bacillus subtilis</i>
GF63	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
GF97	<i>Bacillus subtilis</i>
GF95	<i>Bacillus pumillus</i>
GF99	<i>Bacillus subtilis</i>
GF184	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GF185	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GF202	<i>Bacillus subtilis</i>
GF264	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
GF266	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
GF 268	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
GF 314	<i>Bacillus amyloliquefaciens IT45</i>
GF435	<i>Bacillus firmus</i>
GF470	<i>Bacillus cereus</i>

A extração do DNA de bactérias foi conduzida utilizando o protocolo fenol-clorofórmio como descrito previamente por CHENG e JIANG (2006) com algumas modificações. Todas as bactérias foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) – Triptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v) a 30°C sob agitação a 150 rpm por 16 horas. A suspensão celular (1mL) foi centrifugada a 8000g por 2 minutos, com o posterior descarte do sobrenadante. As células foram, então, lavadas com 400 µL de Tampão STE (NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM; EDTA 1,0 mM, pH 8,0) por duas vezes. Em seguida, as células foram centrifugadas a 8000g por 2 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1,0 mM, pH 8,0). Em seguida, foi adicionado 100 µL de fenol saturado com Tris (pH 8,0), seguido de agitação em vórtex por 60 segundos para lise celular.

As amostras foram, subsequentemente, centrifugadas a 13 000g durante 5 minutos a 4°C para separar a fase aquosa da fase orgânica. A fase aquosa superior (160µL) foi transferida para um novo microtubo, no qual foi adicionado 40 µL de tampão TE para perfazer 200 µL, seguido da adição de 100 µL de clorofórmio e centrifugação por 5 minutos a 13 000g a 4°C. O lisado foi purificado por extração com clorofórmio até que uma interface branca não estivesse mais presente (2-3 vezes). A fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo onde foram

pipetados 40 µL de TE e 5 µL de RNAase (10 mg/mL) com posterior incubação a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de clorofórmio, com centrifugação por 5 minutos a 13 000g a 4 ° C. Cerca de 150 µL da fase aquosa superior, contendo o DNA foram transferidos para um novo microtubo. A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% corado com GelRed® 1X (Biotium) e visualizado em transiluminador (Loccus Biotecnologia). A quantificação foi feita em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (SHIMADZU UV-1280).

3.3 Desenho e validação de *primers*

Primers para ensaios quantitativos e qualitativos foram desenhados para os genes codificantes de metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*), proteína de germinação de esporos (*GerKB*) e guanilato-quinase (*GUK*). O gene referente a subunidade ribossomal 16S foi utilizado como referência, inclusive como padrão para a validação das extrações de DNA. Para os genes *MtnB*, *GerKB* e *GUK* foram escolhidas regiões que apresentavam dois ou mais polimorfismos subsequentes na região 3' de anelamento dos *primers*. A qualidade dos oligonucleotídeos foi avaliada utilizando a ferramenta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

A seleção das melhores combinações foi realizada após PCR convencional. Para todos os ensaios foram utilizadas as seguintes condições: 100 µg de DNA genômico de cada espécie; GoTaq® Flexi Buffer 1 × (PROMEGA™), 200µM de dNTPs (PROMEGA™); 0,25µM de cada *primer*; e 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (PROMEGA™). O volume foi completado com água ultrapura para 20µL. A PCR foi realizada em um termociclador (Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 95 ° C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 40 segundos, anelamento a 56 ° C (exceto para 16S em que foi utilizada a temperatura de 59°C), por 40 segundos e extensão a 72 ° C por 50 s. Foi também realizada uma extensão final a 72 ° C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed® 20X (Biotium™) e visualizado em transiluminador (Loccus Biotecnologia).

3.4 Construção da curva-padrão absoluta

Após validação da especificidade dos marcadores, a Combinação 1 (C1) de *primers* desenhados para o gene *MtnB* foi selecionada para a construção da curva padrão e para a quantificação absoluta de *B. methylotrophicus*. Uma reação de PCR convencional foi conduzida

com DNA molde de *B. methylotrophicus* conforme descrito acima e o produto amplificado de 336pb foi purificado usando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen Hilden, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. Para a clonagem foi utilizado o pCR™4-TOPO® TA Cloning kit (ThermoFisher, CA, USA) e o experimento foi conduzido de acordo com o protocolo fornecido pela empresa. O vetor recombinante foi transformado em *Escherichia coli* eletrocompetente (One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli*) e 50 µL dessa cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB)-ágar suplementado com 50 µg/mL de ampicilina. Apenas colônias transformadas cresceram no meio e, portanto, foram coletadas e inoculadas em novo meio LB para isolamento do plasmídeo recombinante utilizando o kit UltraClean® 6 Minute Mini Plasmid Prep (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo-se as recomendações do fabricante. A presença do fragmento de 336pb foi confirmada por PCR convencional utilizando-se as colônias como DNA-molde e a amplificação foi conduzida conforme descrito anteriormente.

O plasmídeo foi, então, linearizado com a enzima *PstI* (Thermo Fisher, CA, EUA), como sugerido pelo fornecedor, avaliado em gel de agarose 1% e quantificado em espectrofotômetro a Bel Photonics UV M51 UV-VIS. O número de cópias/µL de DNA de *B. methylotrophicus* foi calculado pela fórmula $\frac{6,022 \cdot 10^{23} \cdot [DNA]}{\text{número de pares de base} \cdot 660}$ (GODORNES et al., 2007) e diluições em série variando de 1×10^2 a 1×10^7 cópias de DNA/µL foram utilizadas para construção da curva-padrão. A quantificação permite determinar o número real de cópias das sequências alvo, relacionando o valor *Cq* a uma curva padrão (LILLY & BARNETT, 1951).

Quatro repetições de cada diluição foram incluídas nas placas e os valores *Cq* foram representados graficamente contra o logaritmo dos números de cópias de DNA-molde iniciais correspondentes. Cada curva padrão foi gerada por um coeficiente de correlação (R^2) dos pontos traçados.

3.5 Tratamento de sementes e semeadura em casa de vegetação

As interações entre *B. methylotrophicus* e outros dois produtos comerciais contendo microrganismos recomendados para controle de fitonematoides e para promoção de crescimento em plantas foram avaliadas em 5 x 7 repetições tratamentos com 500 g de sementes de soja variedade Intacta RR2 PRO® durante o período de 03 a 27 de setembro. As doses de cada produto para o tratamento de sementes (TS) seguiram as recomendações do fornecedor, como descrito na **Tabela 2**. Posteriormente ao TS, foi semeada uma semente por vaso com

capacidade de 2,8 L contendo o substrato solo-areia proporção de 1:1. Foram conduzidos cinco tratamentos com sete repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC) (**Tabela 2**). As plantas foram crescidas por 21 dias em casa de vegetação do Laboratório Lallemand Plant Care Brasil, a uma temperatura de 30 ± 2 °C e com oito minutos de irrigação diários, subdivididos em cinco irrigações durante o período de incidência de luz solar.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos de sementes de soja com agentes de biocontrole. As doses utilizadas seguiram as recomendações do fabricante e os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação.

Tratamentos	Descrição	Dose (g ou mL/kg de semente)	Concentração inicial do isolado (UFC/g ou UFC/mL)
T1	Controle	-	-
T2	<i>B. methylotrophicus</i>	1	1×10^9
T3	<i>B. methylotrophicus</i> + <i>B. subtilis</i>	1 + 1	$1 \times 10^9 + 3 \times 10^9$
T4	<i>T. asperellum</i> + <i>B. methylotrophicus</i>	1 + 1	$1 \times 10^{10} + 1 \times 10^9$
T5	<i>T. asperellum</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>B. methylotrophicus</i>	1+1+1	$1 \times 10^{10} + 3 \times 10^9 + 1 \times 10^9$

3.6 Extração de DNA de raízes e quantificação de *B. methylotrophicus* por qPCR

As raízes de cada parcela experimental foram coletadas sem remoção do solo aderente. Para recuperação de *B. methylotrophicus*, todas as raízes foram mantidas em meio de cultura LB por 24 horas sob agitação a 180 rpm. O isolamento do DNA foi conduzido a partir de 2 mL desse meio LB, segundo o protocolo fenol-clorofórmio descrito anteriormente. Após a extração, o DNA de cada amostra foi quantificado em NanoDrop® Lite (ThermoFisher Scientific) e a qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed® 20X (Biotium™) e visualizado em transiluminador (Loccus Biotecnologia).

A quantificação absoluta de *B. methylotrophicus* foi realizada por qPCR em seis réplicas de cada amostra. As reações foram preparadas para um volume final de 10µL contendo 100 ng de DNA, 0,5µM dos oligonucleotídeos iniciadores e 5.0 µL de Master Mix SYBR®Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) composto por AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD, dNTPs com dUTP/dTTP, referência passiva e tampão otimizado. A ciclagem consistiu em uma desnaturação inicial por 10 min a 95 ° C, seguida por 40 ciclos de desnaturação por 15 s a 95 °

C e etapa de anelamento-extensão por 1 min a 60 ° C. Após a amplificação, foi apresentada a curva *melting* com gradiente de temperatura de 0,5 ° C/s de 60 a 95 ° C para confirmar amplificações inespecíficas e formação de dímero de *primers*. Em cada placa com as amostras de DNA referentes a cada tratamento foram incluídos poços-controle sem DNA-molde.

3.7 Análises Estatísticas

O número de cópias de DNA/ μ L de *B. methylotrophicus* foi fornecido pelo software StepOnePlus™ Real-Time PCR System versão 2.2.2 com base nas curvas-padrão construídas. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade, homogeneidade e independência de resíduos. Também foi realizada uma análise de desvio. Nesse caso, o modelo linear generalizado (GLM) foi ajustado para o modelo binomial negativo, uma vez que este melhor se ajustou pelo critério de informação de Akaike (AIC). O AIC é um estimador de erro de previsão e, portanto, da qualidade relativa dos modelos estatísticos para um determinado conjunto de dados. O AIC estima a quantidade relativa de informações perdidas por um determinado modelo: quanto menos informações um modelo perde, maior a qualidade desse modelo (MCELREATH, 2016). Em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A análise de desvio é um análogo próximo à análise de variância (ANOVA), que usa o desvio residual para avaliar a significância do *square*. O desvio residual também é análogo à soma residual dos quadrados da ANOVA. O desvio residual para GLM é $Dm = 2 (\log_e Ls - \log_e Lm)$, onde Lm é a semelhança maximizada sob o modelo em questão e Ls é a probabilidade maximizada sob um modelo saturado (FOX, 2016). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote R multcomp e o nível de significância foi estabelecido em $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Predição de regiões com SNPs

As sequências dos genes de *B. methylotrophicus* foram alinhadas pela ferramenta BLASTn para encontrar regiões com SNPs específicos para a bactéria em estudo. O gene metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*) (EC 4.2.1.109) e proteína de germinação de esporos *GerkB* foram selecionados. As sequências codificantes de *MtnB* e *GerkB* apresentam dois SNPs subsequentes, os quais foram utilizados para desenho dos *primers* na região 3'. Os dois SNPs observados para *MtnB* nas posições g.11.240C>T e g.11.240_11.241insT, sendo

exclusivos em *B. methylotrophicus* (**Figura Suplementar 1**). Já para o gene *GerkB*, os dois SNPs são observados nas posições 27.192 e 27.191 correspondentes às substituições de timina e guanina por guanina e adenina, respectivamente em *B. methylotrophicus*. (**Figura Suplementar 2**)

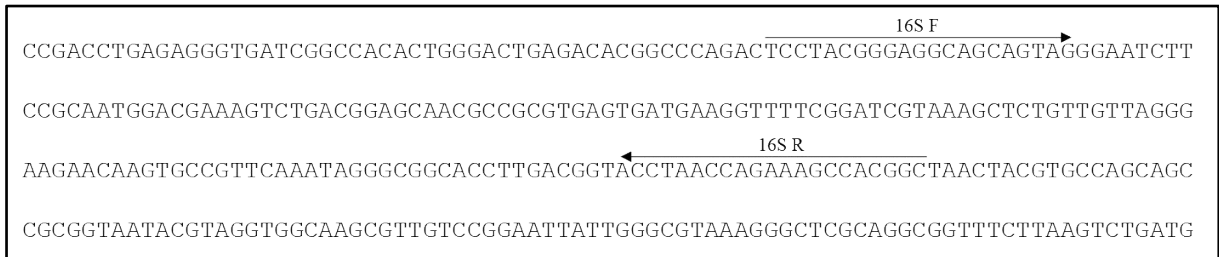
O gene guanilato-quinase (*GUK*) (EC 2.7.4.8) também foi selecionado (**Figura Suplementar 3**). Este apresenta três deleções subsequentes de timina, guanina e adenina, respectivamente, em *B. methylotrophicus*, o que não acontece nas demais espécies. Dessa forma, hipotetizou-se, inicialmente, que oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos para este gene poderiam ser utilizados em análises qualitativas (presença/ausência de *B. methylotrophicus*).

4.2 Primers desenvolvidos para a detecção de *B. methylotrophicus*

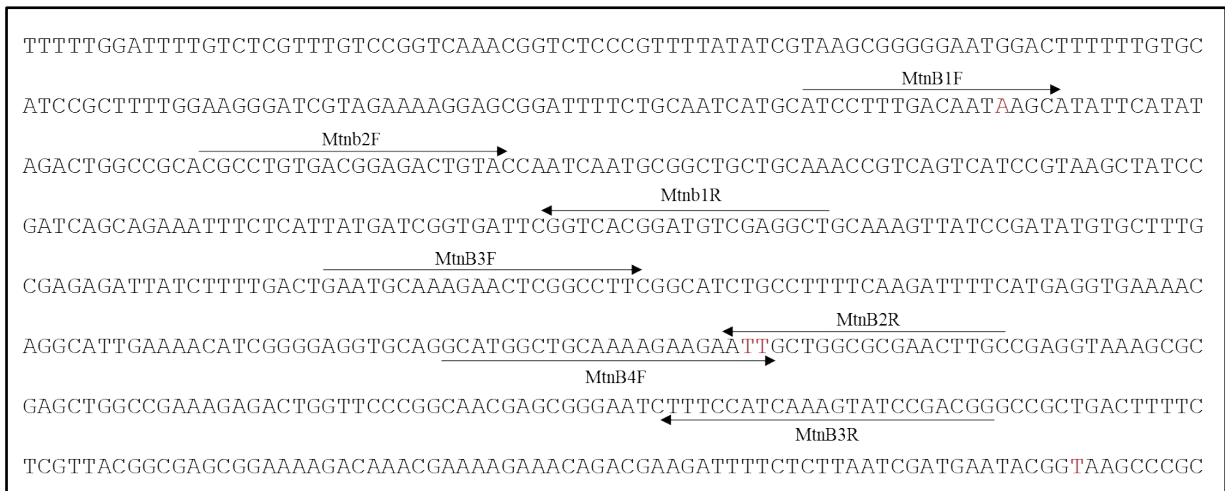
Primeiramente, foram desenvolvidos *primers* para a amplificação de uma região conservada do gene de referência 16S, os quais originam um fragmento de 169pb (**Figura 4A**). O uso de um gene de referência foi importante para confirmação que todas as espécies utilizadas no ensaio de validação dos marcadores pertenciam ao gênero *Bacillus*. Posteriormente, foram desenhadas sete sequências de *primers* para os genes *MtnB*, os quais posteriormente foram testados em diferentes combinações objetivando a detecção específica de *B. methylotrophicus*. Como observado na **Figura 4B** as sequências MtnB1F e MtnB2R foram sintetizadas abrangendo em sua extremidade 3' as regiões com os SNPs identificados previamente. A mesma estratégia foi conduzida para a síntese do par de *primers* de *GerkB* (**Figura 4C**).

Figura 4. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a detecção molecular de *B. mathylophilus*. Em (A) *primers* específicos para o gene de referência 16S. Em (B) sete *primers* desenhados para a sequência do gene metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*) incluindo as regiões polimórficas (destacadas em vermelho) identificadas pelas análises *in silico*. Em (C) um par de *primers* foi desenhado para um fragmento da região de Spore GerkB (*GerkB*), incluindo as regiões polimórficas destacadas em vermelho.

A



B



C



Foram, então, estabelecidas cinco diferentes combinações para a amplificação do gene *MtnB*, mantendo ao menos um dos *primers* que anelam na região polimórfica, e uma combinação para o gene *GerkB* (Tabela 3). Além disso, o tamanho dos amplicons variou de

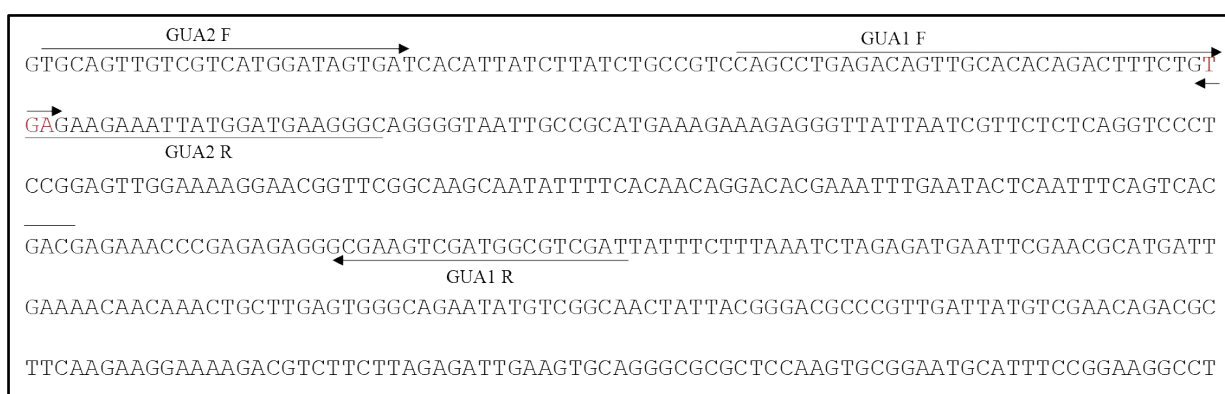
116 a 336 pb para *Mtnb* e 87 bp para *GerkB*. As temperaturas de anelamento foram otimizadas para 56°C, garantindo, assim, a visualização dos produtos correspondentes.

Tabela 3. Combinações dos *primers* desenvolvidos para a amplificação do gene *MtnB* para a detecção de *B. methylotrophicus*.

Combinações	Descrição	Tamanho do produto amplificado
Combinação 1	Mtnb1F + Mtnb2R	336 pb
Combinação 2	Mtn3F + Mtnb2R	124 pb
Combinação 3	Mtnb2F + Mtnb2R	289 pb
Combinação 4	Mtnb1F + Mtnb1R	167 pb
Combinação 5	Mtnb4F + Mtnb3R	116 pb
Spore <i>GerkB</i>	GerkB1F + GerkB1R	87 pb

Para o gene *GUK* foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores como demonstrado na **Figura 5**, os quais flanquearam regiões de 220 (GUA1 F + GUA1 R) e 101pb (GUA2 F + GUA2 R). Também para este gene adotou-se a estratégia de manter a região polimórfica na extremidade 3' do *primer*.

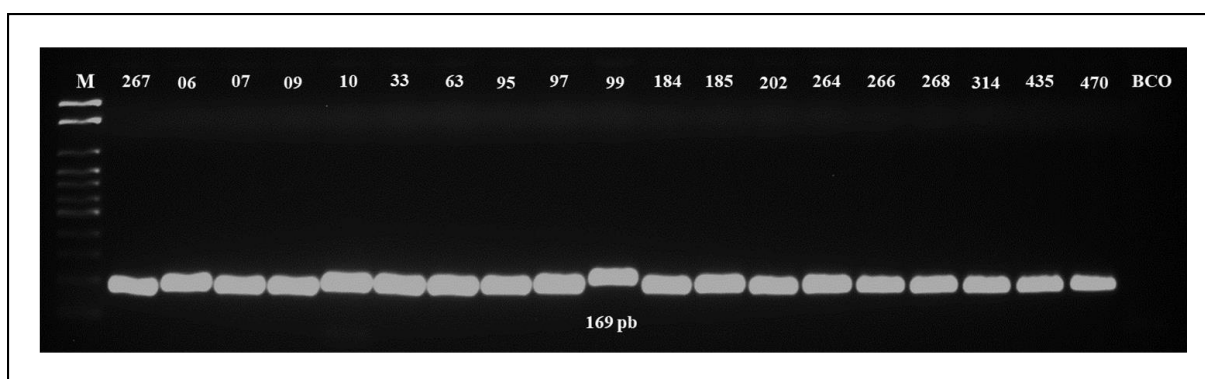
Figura 5. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para análises qualitativas de *B. methylotrophicus* por meio da amplificação do gene guanilato-quinase (*GUK*). A região destacada (TGA) é deletéria em *B. methylotrophicus*, mas não nas demais espécies analisadas.



Dessa forma foram determinadas duas estratégias para a detecção de *B. methylotrophicus*: quantitativa e qualitativa para os *primers* específicos para *MtnB* e *GerkB* e qualitativa, para *primers* que anelam nas sequências de *GUK*. Após definidas as condições para as reações, o DNA foi eficientemente extraído para *B. methylotrophicus* e para as demais

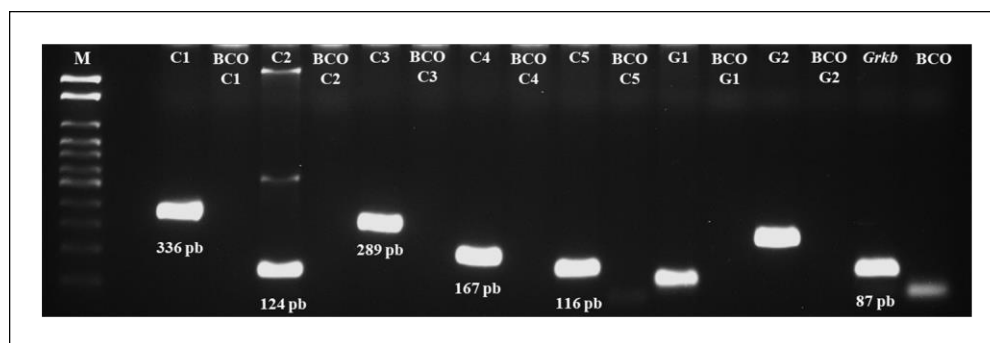
espécies utilizadas na validação (**Figura 6**), quantificado e validado por meio da amplificação do gene 16S (**Figura 6**). Este resultado demonstrou a eficiência dos reagentes, a qualidade do DNA e confirmou que todas as amostras analisadas pertencem ao gênero *Bacillus*.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a qualidade do DNA obtido e o gênero dos microrganismos estudados. Fragmento amplificado de 169pb para o gene 16S. Todas as cepas utilizadas apresentaram amplificação do fragmento esperado, confirmando o gênero *Bacillus*. **M:** marcador de peso molecular de 100pb; **267:** *Bacillus methylotrophicus*; **06:** *Bacillus thuringiensis*; **07:** *Bacillus thuringiensis*; **09:** *Bacillus thuringiensis*; **10:** *Bacillus subtilis*; **33:** *Bacillus subtilis*; **63:** *Bacillus amyloliquefaciens*; **95:** *Bacillus pumillus*; **97:** *Bacillus subtilis*; **99:** *Bacillus subtilis*; **184:** *Bacillus thuringiensis*; **185:** *Bacillus thuringiensis*; **202:** *Bacillus subtilis*; **264:** *Bacillus methylotrophicus*; **266:** *Bacillus methylotrophicus*; **268:** *Bacillus amyloliquefaciens*; **314:** *Bacillus amyloliquefaciens*; **435:** *Bacillus firmus*; **470:** *Bacillus cereus*; BCO: controle negativo da PCR.



Considerando os marcadores selecionados, em um primeiro momento, todas as combinações de *primers* para *MtnB* (1 a 5), *GerkB* e as duas reações previstas para o gene *GUK* foram analisadas apenas com amostras de *B. methylotrophicus*. Esperava-se uma única banda para cada uma das cinco reações de *MtnB* e *GerkB*, e a ausência de amplicons para *GUK* (**Figura 6**). Contudo, apenas as combinações 1, 3, 4 e 5 para *Mtnb* e *GerkB* foram bem-sucedidas. A combinação 2 de *MtnB* gerou fragmentos além do de 124pb esperado, evidenciando inespecificidade. Para o gene *GUK*, para as duas combinações testadas, observou-se produtos amplificados, o que demonstrou o insucesso desses oligonucleotídeos em análises qualitativas de *B. methylotrophicus*.

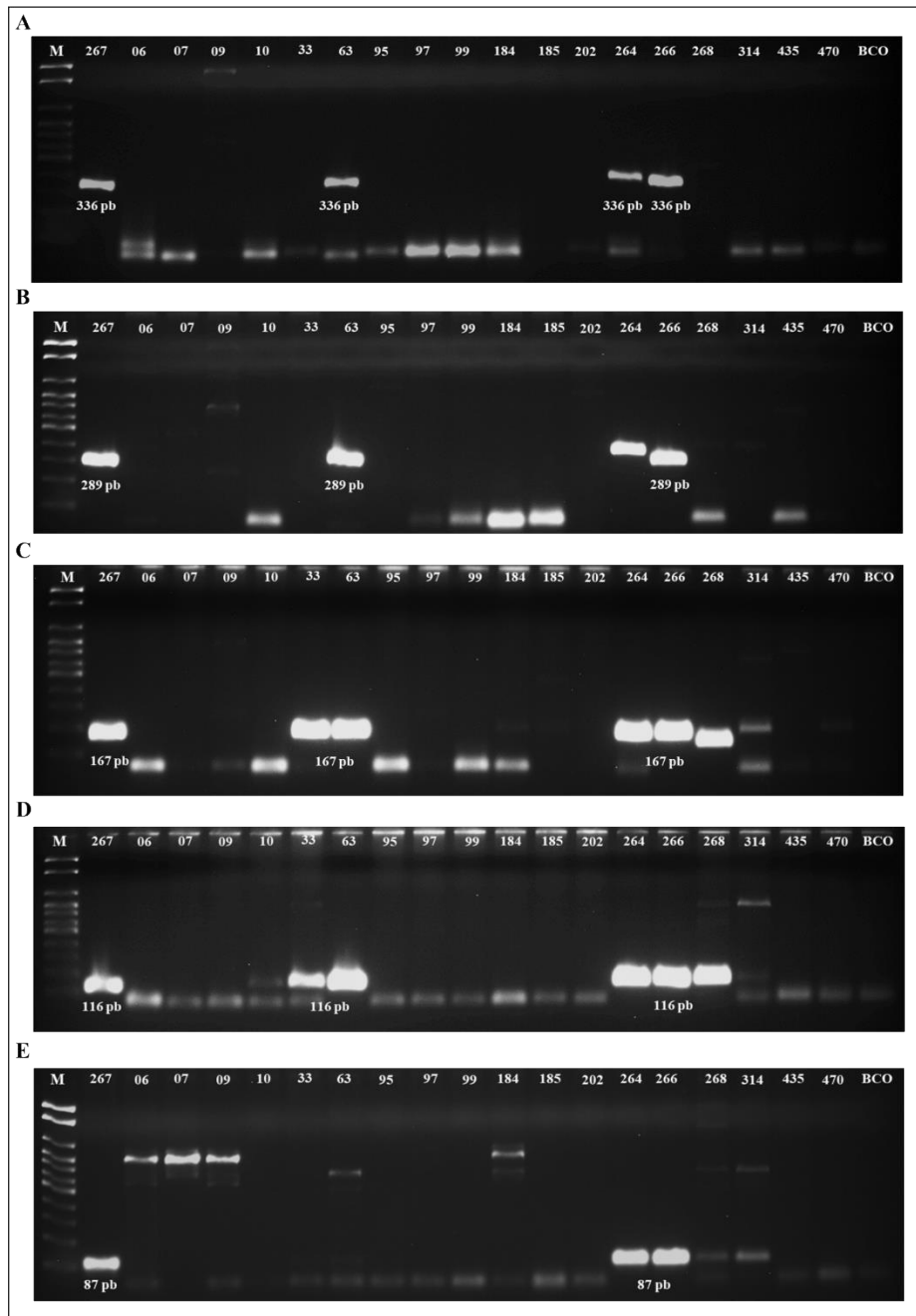
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose demonstrando a amplificação correspondente às diferentes combinações de *primers* desenhados para *B. methylotrophicus*. C1(Mtnb1F + Mtnb2R), C2 (Mtn3F + Mtnb2R), C3 (Mtnb2F + Mtnb2R), C4 (Mtnb1F + Mtnb1R) e C5 (Mtnb4F + Mtnb3R) são as combinações de *primers* testadas para o gene metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*). G1 (GUA1 F + GUA1 R) e G2 (GUA2 F + GUA2 R) são as combinações de *primers* para o gene guanilato-quinase (*GUK*). *Gerkb* se refere aos *primers* desenvolvidos para o fragmento de proteína de germinação de esporos (*Gerkb*). BCO: controle negativo de cada uma das reações realizadas. M: marcador de peso molecular de 100pb.



Posteriormente, os marcadores 1, 3, 4, 5 de *MtnB* e *Gerkb* foram validados em outras espécies de *Bacillus* quanto a especificidade de amplificação (**Figura 8**). Para as combinações 1 e 3 (**Figura 8A e 8B**) foi observada amplificação apenas para espécies de *B. methylotrophicus* (cepas GF264, GF266 e GF267) e *B. amyloliquefaciens* (GF63) e ausência de produtos amplificados para as demais espécies. Para as combinações 4 e 5 (**Figuras 8C e 8D**), houve a amplificação em todas as cepas de *B. methylotrophicus* testadas, porém também foi observada amplificação em *B. subtilis* (GF 33), em *B. amyloliquefaciens* (GF 63, GF268 e GF314) e *B. cereus* (GF470). Além disso, na combinação 5 também foi observado amplificação para a espécie *B. subtilis* (GF10). A presença de amplicons em GF268, GF314 e GF33 provavelmente pode ser explicada pela alta proximidade genética entre estes microrganismos, visto que o *primer* Mtnb1F utilizado continha somente um polimorfismo, enquanto os oligonucleotídeos iniciadores Mtnb1R e Mtnb3R não continham polimorfismos. Para o *primer* Mtnb4F, o qual continha os dois polimorfismos subsequentes, a estratégia de desenho pode ter interferido na especificidade e, conseqüentemente, gerado produtos não esperados em outras espécies filogeneticamente relacionadas com *B. methylotrophicus*. A combinação desenvolvida para *Gerkb* (**Figura 8E**) produziu os fragmentos esperados em *B. methylotrophicus*, porém foi observada amplificação não-específica em diferentes isolados de *Bacillus* (GF06, GF07, GF09, GF63, GF184, GF268 e GF314). O perfil não-específico dos *primers* para *Gerkb* reforça a importância da estratégia adotada neste estudo para seleção de regiões com SNPs e a inclusão destes polimorfismos nos *primers forward* e *reverse* quando se objetiva a diferenciação

molecular de espécies geneticamente relacionadas. Portanto, após a validação da especificidade, o marcador para C1 foi selecionado para as próximas análises.

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose demonstrando a especificidade dos *primers* a *B. methylotrophicus*. As combinações 1, 3, 4 e 5 de *primers* foram utilizadas para validação em outras espécies do gênero *Bacillus* para o gene *MtnB* (A, B, C e D, respectivamente) e *GerkB* (E). **M**: marcador de peso molecular de 100pb; **267**: *Bacillus methylotrophicus* GF 267; **06**: *Bacillus thuringiensis*; **07**: *Bacillus thuringiensis*; **09**: *Bacillus thuringiensis*; **10**: *Bacillus subtilis*; **33**: *Bacillus subtilis*; **63**: *Bacillus amyloliquefaciens*; **95**: *Bacillus pumillus*; **97**: *Bacillus subtilis*; **99**: *Bacillus subtilis*; **184**: *Bacillus thuringiensis*; **185**: *Bacillus thuringiensis*; **202**: *Bacillus subtilis*; **264**: *Bacillus methylotrophicus*; **266**: *Bacillus methylotrophicus*; **268**: *Bacillus amyloliquefaciens*; **314**: *Bacillus amyloliquefaciens*; **435**: *Bacillus firmus*; **470**: *Bacillus cereus*; BCO: controle negativo da PCR.



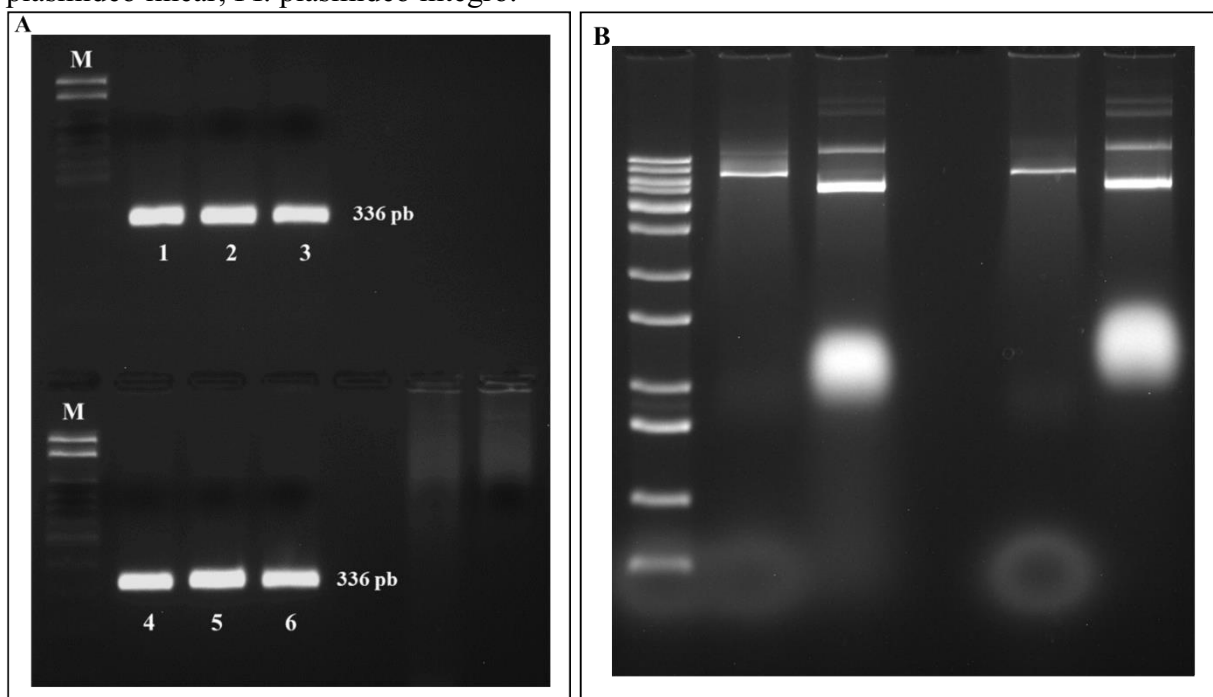
4.3 Quantificação absoluta de *B. methylotrophicus* em raízes por qPCR

4.3.1 Eficiência de clonagem e recuperação do DNA plasmidial recombinante

A curva-padrão absoluta foi construída a partir da clonagem do fragmento de 336pb, correspondente à C1 de *primers*, no vetor pCRTM4-TOPO[®] (**Figura 9**). Após a transformação bacteriana e crescimento do inóculo de transformantes, seis colônias foram coletadas para a confirmação da presença do inserto. A identificação dos clones recombinantes foi realizada por PCR utilizando os *primers* referentes à C1. O gel da **Figura 9A** demonstra que a clonagem e a transformação foram eficientes para todas as colônias coletadas, uma vez que foram observadas ampliações do inserto de 336 pb em todos os seis clones avaliados.

Posteriormente, os plasmídeos foram linearizados, a fim de se evitar que as diferentes conformações plasmidiais interferissem na amplificação da curva-padrão. A restrição foi bem-sucedida (**Figura 9B**), uma vez que apenas a conformação linear foi identificada. Além disso, a enzima foi escolhida por clivar apenas o vetor, de modo que o amplicon não apresenta sítios de corte.

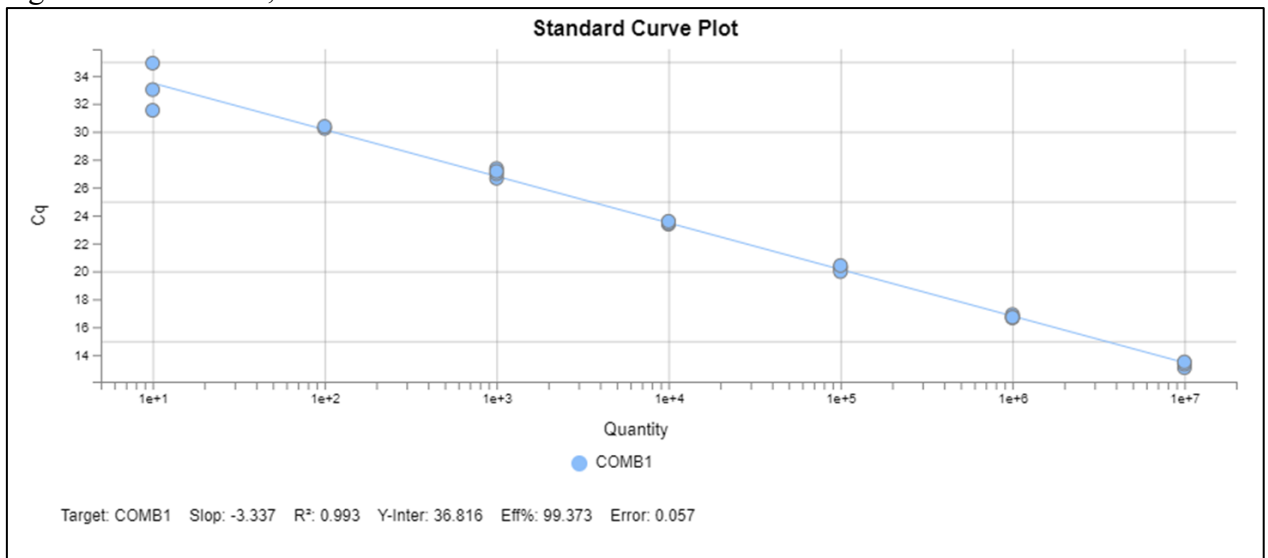
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose demonstrando o sucesso de clonagem. Em (A) a eficiência de ligação do produto amplificado de 336pb no vetor e de transformação em *E. coli* competente (B) restrição enzimática com *Pst*I e obtenção do plasmídeo linearizado M: marcador de peso molecular de 100 pb. 1-6: colônias de transformantes coletadas. PL: plasmídeo linear; PI: plasmídeo íntegro.



4.3.2 Curva-padrão absoluta

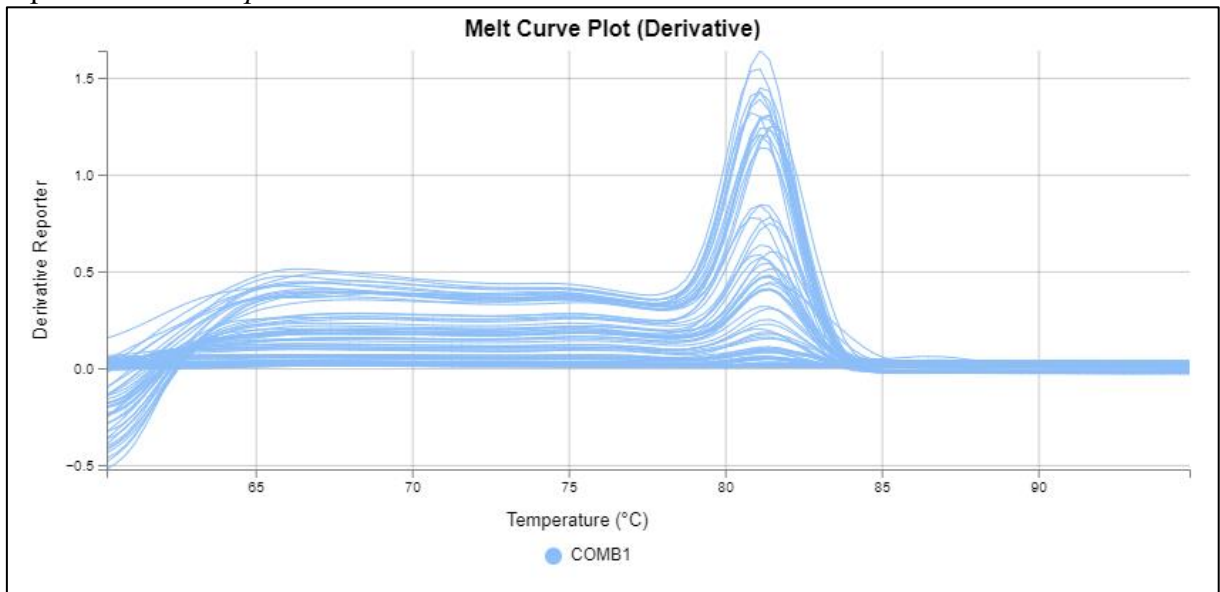
A curva padrão para a quantificação absoluta de *B. methylotrophicus* foi padronizada utilizando diluições seriadas do material genético do ABC variando de 1×10^2 para 1×10^7 cópias de DNA/ μL , com $R^2 > 0,993$, valor de inclinação de $-3,337$ e *threshold* de $0,296432$ (fase exponencial). Esses dados validam a curva como padrão para a determinação da quantidade de DNA alvo em amostras desconhecidas, com eficiência de amplificação acima de 99% e proporcionalidade em sua amplificação.

Figura 10. Curva padrão absoluta padronizada para a quantificação do DNA *B. methylotrophicus* utilizando oligonucleotídeos desenhados para o gene metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*). O gráfico demonstra a eficiência da reação e o coeficiente de regressão linear de $0,993$.



A especificidade dos *primers* também foi confirmada por meio da análise da curva de dissociação. O produto amplificado das amostras de DNA apresentou um pico agudo em temperatura superior a $80\text{ }^\circ\text{C}$ e nenhum produto de PCR não-específico foi identificado para a C1 utilizada (**Figura 11**).

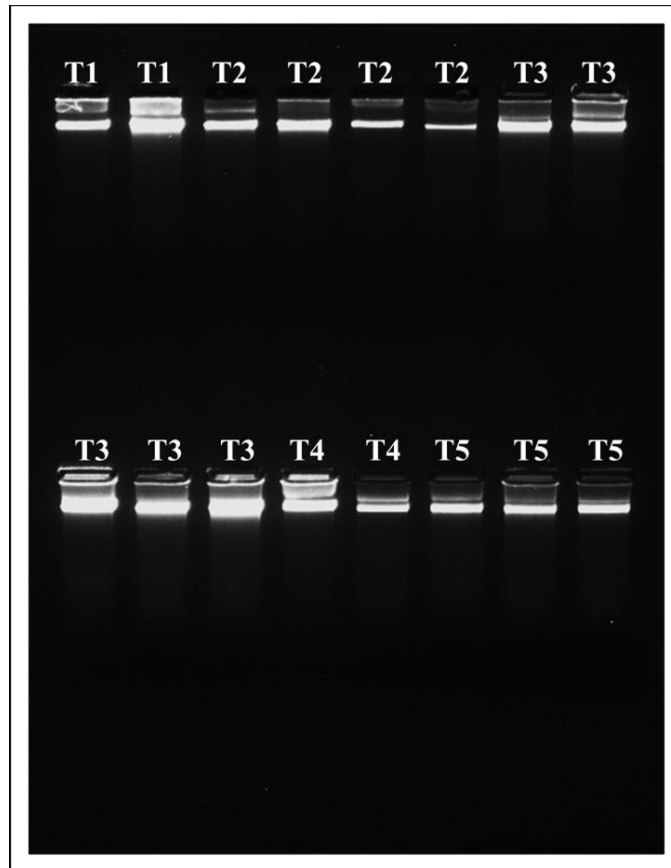
Figura 11. Curva de dissociação para os produtos amplificados a partir da C1 de *primers* desenhados para o gene metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*). O perfil evidencia a especificidade dos *primers*.



4.3.3 Recuperação de *B. methylotrophicus* em raízes de soja

Sementes de soja foram tratadas com diferentes combinações de produtos contendo microrganismos e, aos 21 dias de semeadura, suas raízes foram utilizadas para a recuperação de DNA de *B. methylotrophicus*. O DNA total foi eficientemente extraído após a coleta e manutenção das raízes em meio LB por 24 horas sob agitação (**Figura 12**).

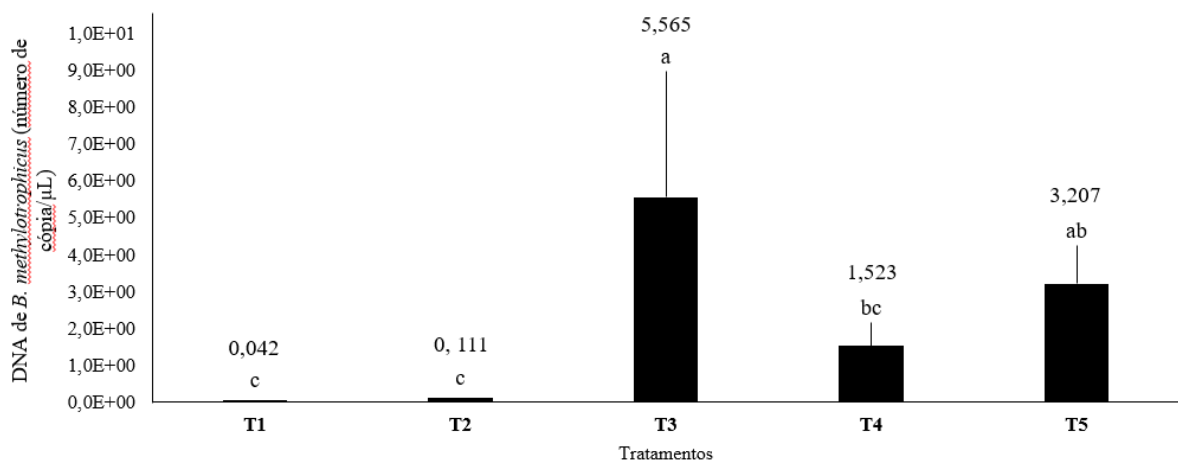
Figura 12. Gel de agarose 0,8% exemplificando a qualidade dos DNAs obtidos após extração de microrganismos recuperados em raízes de soja cultivadas em meio LB. (T1) Controle, (T2) *B. methylotrophicus*, (T3) *B. methylotrophicus* e *B. subtilis*, (T4) *B. methylotrophicus* e *T. asperellum* e (T5) *B. methylotrophicus*, *B. subtilis* e *T. asperellum*.



A quantificação absoluta foi, então, conduzida por qPCR a partir de 100 ng de DNA de *B. methylotrophicus* e apresentada na **Figura 13** em cópias de DNA/ μL . As análises foram conduzidas aos 21 dias após a semeadura de sementes (T1) controle e sementes tratadas com (T2) *B. methylotrophicus*, (T3) *B. methylotrophicus* e *B. subtilis*, (T4) *B. methylotrophicus* e *T. asperellum* e (T5) *B. methylotrophicus*, *B. subtilis* e *T. asperellum*. Não houve diferença estatística entre a recuperação de DNA de raízes não tratadas com ABCs (T1) e de raízes de sementes tratadas com *B. methylotrophicus*. Os dados de recuperação obtidos dos co-tratamentos também evidenciam que o consórcio entre *B. methylotrophicus* e *T. asperellum* (T4) tende a melhorar a recuperação de *B. methylotrophicus* de raízes de soja, diante o aumento significativo do número de cópias de DNA do microrganismo-alvo nos tratamentos T4 (1,523 cópias/ μL) e T5 (3,207 cópias/ μL). No entanto, a diminuição do número de cópias em T5 quando comparados ao tratamento T3 (5,565 cópias/ μL), pode evidenciar uma provável competição entre os ABCs.

Por outro lado, a recuperação de *B. methylotrophicus* foi significativamente maior em T3 (5,565 cópias/ μ L) e T5 (3,207 cópias/ μ L), quando comparados ao controle (T1) e ao uso de *B. methylotrophicus* isolado (T2). Este achado evidencia o efeito aditivo entre a cooperação de *B. subtilis* e *B. methylotrophicus*, o que provavelmente favoreceu o melhor estabelecimento do microrganismo em estudo no ambiente rizosférico e, posteriormente, maior recuperação deste quando comparado às raízes controle ou tratadas somente com *B. methylotrophicus*. Ainda, a não amplificação em T1 torna evidente, mais uma vez, o sucesso da especificidade dos marcadores identificados neste estudo.

Figura 13. Quantificação absoluta de *B. methylotrophicus* nas raízes de soja coletadas. A maior recuperação foi observada nos tratamentos com a co-administração de produtos à base microrganismos (T3, T4 e T5). Os números representam as médias de DNA/ μ L de *B. methylotrophicus* quantificadas em cada tratamento. (T1) Controle, (T2) *B. methylotrophicus*, (T3) *B. methylotrophicus* e *B. subtilis*, (T4) *B. methylotrophicus* e *T. asperellum* e (T5) *B. methylotrophicus*, *B. subtilis* e *T. asperellum*.



5 DISCUSSÃO

A crescente demanda por maior produtividade agrícola pode ser alcançada minimizando as perdas causadas por fitonematoides. O controle destes parasitas utilizando nematicidas químicos é uma estratégia eficaz, mas a aplicação inadequada de pesticidas sintéticos desencadeia efeitos adversos na flora, fauna e inimigos naturais. Os ABCs são, portanto, indicados para o manejo de nematoides pela comunidade agrícola. Existe um mercado emergente para biopesticidas mediados por rizobactérias, uma vez que estas promovem o crescimento da planta, melhoram os parâmetros agrônômicos em culturas economicamente importantes e atuam no manejo de fitoparasitas (MHATRE et al., 2019).

Bacillus spp. são rizobactérias formadoras de endósporos que utilizam vários mecanismos para reduzir os danos e a reprodução dos nematóides nas plantas. Suas cepas atuam regulando o comportamento dos parasitas, interferindo no reconhecimento do hospedeiro, competindo por nutrientes, induzindo resistência sistêmica e produzindo exsudatos que inibem a eclosão de ovos. Nesse contexto, essas rizobactérias reduzem a sobrevivência dos juvenis e ou matam nematoides diretamente (ONGENA e JACQUES, 2008; ADAM et al., 2014; CHINHEYA et al., 2017; NAVARRO et al., 2019).

O manejo de fitonematoides pode ser prescrito utilizando a combinação de diferentes produtos baseados em microrganismos. Dessa forma, entender os mecanismos de interação entre estes ABCs pode elucidar quais as melhores estratégias de aplicação e quais as combinações que garantem o sucesso do controle destes fitoparasitas (COSETTA e WOLFE, 2019). Para tal fim, a análise das características morfofuncionais é comumente utilizada para caracterizar uma comunidade microbiana em qualquer ecossistema. No entanto, mesmo que a diversidade da microbiota presente no solo seja alta, esses parâmetros não são, em grande parte, ideais para diferenciar espécies intimamente relacionadas, como as do gênero *Bacillus*. Abordagens utilizando dados genômicos são mais acuradas e permitem a avaliação das interações entre microrganismos em um ecossistema, além de permitirem a quantificação absoluta e fornecerem a acurácia necessária para o estudo a nível de espécie (TUT et al., 2021). De fato, o desenvolvimento de marcadores para detecção de microrganismos é uma ferramenta molecular que possui acurácia e nítida aplicação.

Recentemente, foram realizados ensaios visando validar um marcador para a detecção de uma raça patogênica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (AFRIN et al., 2019). RUBEL et al. (2019) apresentaram um alvo molecular amplificado por PCR com capacidade discriminatória de duas raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* quando testados em folhas de couve infectadas artificialmente. Outro marcador molecular específico foi desenvolvido para monitorar a propagação de *B. subtilis* em flores, após sua aplicação por pulverização em um pomar de maçãs suíço (BROGGINI et al., 2005). Também já foram propostos marcadores aleatórios de DNA polimórfico amplificado (RAPD – do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) para diferenciar a cepa *Trichoderma atroviridae* de outras cepas intimamente relacionadas (HERMOSA et al., 2001).

Estudos com marcadores espécie-específicos também são reportados na literatura como uma estratégia eficiente para diferenciação de espécies dentro do gênero *Bacillus*. Utilizando a cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 como referência, foram encontrados dois marcadores genômicos para a cepa *B. amyloliquefaciens* CPA-8. No estudo, foram testadas duas estratégias

para desenvolvimento destes marcadores, que posteriormente foram avaliados quanto ao potencial discriminatório. Na primeira estratégia, foi utilizada a ferramenta de alinhamento local BLASTn, para exclusão de sequências similares em microrganismos relacionados. Já na outra estratégia, os pesquisadores utilizaram marcadores identificados por RAPD-PCR, os quais serviram de molde para o desenho de marcadores SCAR (Região amplificada de sequência caracterizada - do inglês *Sequence Characterized Amplified Region*). Para a metodologia SCAR, foi verificada amplificação inespecífica, enquanto a primeira estratégia conduzida apresentou melhor eficiência na discriminação (GOTOR-VILA et al., 2016).

Por meio de análises *in silico* e estratégias de alinhamento, neste estudo definimos os genes *MtnB*, *GerkB* e *GUK* como marcadores promissores para *B. methylotrophicus*. O gene *MtnB* codifica para a enzima metiltioribulose-1-fosfato desidratase e está localizado na fita *sense* do genoma da cepa na posição 10559- 11850, sendo, portanto, composto por 1293 nucleotídeos. A enzima pertence à família das liases, especificamente as hidro-liases, responsáveis por quebrar ligações carbono-oxigênio. A proteína é composta por 430 aminoácidos e catalisa a desidratação do substrato metiltioribulose-1-fosfato (MTRu-1-P) em 2,3-diketo-5-metiltiopentil-1-fosfato (DK-MTP-1-P) na via de recuperação da metionina. Esta via metabólica é amplamente distribuída entre algumas eubactérias, leveduras, plantas e animais, sendo a única capaz de reciclar o enxofre reduzido de 5-metiltioadenosina em metionina. A 5-metiltioadenosina é o subproduto da síntese de poliaminas, etileno e ácido mugínico a partir de S-adenosilmetionina (ASHIDA et al., 2008). Em *B. methylotrophicus*, o gene *GUK* está entre as regiões 209441 e 210175, totalizando 736 nucleotídeos. A quinase é uma enzima da classe das transferases responsável pela fosforilação de monofosfato de guanosina (GMP) gerando difosfato de guanosina (GDP) que, conseqüentemente, será utilizado para a síntese de trifosfato de guanosina (GTP), um importante efetor no metabolismo e necessário para a realização de vários processos celulares, como a esporulação em *B. subtilis* durante o estresse metabólico (KRIEL et al., 2012). Por sua vez, o gene *GerkB* é responsável por codificar o receptor proteico denominado receptor germinante. Os esporos de espécies de *Bacillus* geralmente contêm vários receptores alocados em sua membrana, sendo responsáveis por ativar cascatas de transdução de sinal. Estas alteram as camadas que revestem o esporo, interferindo em sua ruptura, no início do entumescimento e, por fim, no crescimento vegetativo de espécies de *Bacillus* (PAREDES-SABJA et al, 2009). (WEN et al, 2019).

A estratégia de seleção dos marcadores foi conduzida de forma que fossem selecionados apenas genes que continham dois SNPs subsequentes. Com a presença de dois polimorfismos no mesmo marcador, hipotetizamos aumentar a especificidade dos *primers* para a espécie *B.*

methylophilus, uma vez que o desenvolvimento de *primers* seletivos é um aspecto chave para garantir uma análise bem-sucedida. A especificidade depende criticamente da extremidade 3' do *primer*, uma vez que a extensão da fita de DNA só é possível quando os iniciadores anelam fielmente a região complementar da sequência-alvo (PATWARDHAN et al., 2014). Além disso, estudos prévios demonstraram que a presença de SNPs fornecem incompatibilidade de anelamento entre *primers* e DNA (WU et al, 2009; LEFEVER et al, 2013), o que na nossa abordagem é vantajoso, uma vez que é desejável que marcadores específicos não produzam amplicons em outras espécies de *Bacillus*. No nosso estudo, adotamos essa estratégia e o desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi conduzido com os polimorfismos na extremidade 3' de modo a serem específicos a *B. methylophilus*.

Anteriormente à validação da especificidade dos marcadores identificados, foram conduzidas análises com *primers* desenhados para a região 16S. Este, por sua vez, é o biomarcador filogenético mais frequentemente empregado na ecologia microbiana e responsável pela codificação da subunidade menor do RNA ribossômico 16S rRNA. A região genômica de 16S tem sido amplamente utilizado para estimar as relações entre bactérias (SACCHI et al., 2002). No entanto, o gene 16S rRNA sozinho não é capaz de discriminar espécies de *Bacillus* intimamente relacionadas (MOHKAM et al., 2016). Sendo assim, nas análises do presente estudo, o fragmento da região codificante da subunidade ribossomal 16S foi utilizado para avaliar a qualidade do DNA e confirmou que todas as espécies utilizadas para validação dos marcadores identificados pertencem ao gênero *Bacillus*.

A validação de cada uma das combinações desenhadas foi conduzida via PCR convencional utilizando DNAs extraídos de diferentes espécies do gênero *Bacillus*, o que permitiu comprovar a especificidade dos marcadores identificados. De fato, a estratégia de seleção e desenho de *primers* com dois ou mais SNPs foi bem-sucedida, uma vez que duas Combinações (C1 e C3) para o gene *MtnB* foram capazes de discriminar a espécie *B. methylophilus*, enquanto as combinações 4 e 5 foram capazes de detectar especificamente o gênero *Bacillus*, incluindo as espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. As combinações C1 e C3 ainda foram positivas para *B. amyloliquefaciens*, evidenciando a estreita correlação genética já relatada existente entre as espécies (JEONG et al, 2015; DUNLAP et al, 2016; FAN et al, 2017). Nesse contexto, o sequenciamento de diferentes fragmentos em GF267 e GF63 podem elucidar a real proximidade entre as duas espécies e ainda, apresentar polimorfismos-chave essenciais na diferenciação entre as duas espécies.

Alguns trabalhos apontam um elevado grau de semelhança entre os genomas de *B. methylophilus*, *Bacillus velezensis* e *B. amyloliquefaciens*. DUNLAP et al. (2015)

demonstraram que *B. amyloliquefaciens* e *B. methylotrophicus* compartilham em torno de 95% dos genes, além de apresentarem elevada similaridade morfofisiológica. Além disso, filogeneticamente, alguns pesquisadores propõem que *B. amyloliquefaciens* deve ser considerado um sinônimo heterotípico posterior de *B. methylotrophicus*. Também foi proposto que *B. methylotrophicus* KACC 13015, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 e *B. oryzicola* KACC 18228 deveriam ser reclassificados como sinônimos heterotípicos posteriores de *B. velezensis* NRRL B-41580, uma vez que a data de publicação válida de *B. velezensis* precede a das outras três linhagens (DUNLAP et al., 2016). *B. velezensis* foi originalmente descrito por RUIZ-GARCÍA et al. (2005), em estudo destinado a descobrir cepas capazes de sintetizar novos lipopeptídeos com atividade surfactante e/ou antimicrobiana. Nesse estudo, *B. velezensis* demonstrou estar intimamente relacionado a *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. As análises de JEONG et al. (2015) também sugerem a proximidade entre *B. velezensis* e *B. methylotrophicus*. Nesse contexto de similaridade entre as sequências de *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* e *B. methylotrophicus* cria-se um problema taxonômico. Recentemente, FAN et al. (2017) propôs que o clado de *B. amyloliquefaciens* deve ser considerado como uma unidade taxonômica acima do nível de espécie ou "grupo operacional *B. amyloliquefaciens*". Este deve englobar espécies de *B. amyloliquefaciens* que habitam o solo e as cepas de *B. siamensis* e *B. velezensis* associados a plantas, cujos membros estão intimamente relacionados. Dessa forma, mesmo que diferenciar estas espécies estritamente relacionadas não seja uma tarefa simples, os marcadores selecionados neste estudo podem inovar e apoiar análises filogenômicas envolvendo a classificação das espécies dentro do gênero *Bacillus*. Os primers presentemente avaliados foram bem-sucedidos na discriminação de espécies de *B. methylotrophicus*, o que os tornam particularmente promissores como ferramentas para a detecção de *B. methylotrophicus* em raízes de soja ou em outros microbiomas.

Portanto, análises de PCR podem auxiliar na implementação e monitoramento de ABCs em grandes culturas. Espera-se que, após a administração de ABCs ao longo do desenvolvimento da planta, microrganismos associados ao CB tenham seu desenvolvimento pleno. A maior parte dos relatos presentes na literatura se dedica a estudar os perfis agronômicos (biomassa, tamanho de raiz e parte aérea, nodulação entre outros) de plantas co-inoculadas com diferentes ABCs ou a avaliar a compatibilidade *in vitro* entre ABCs utilizados em consórcio (PANEBIANCO et al, 2015; PERTOT et al, 2017; SILVA et al, 2017). No entanto, a quantificação absoluta por métodos moleculares, como a qPCR, fornece o número de cópias de DNA de um determinado agente, auxiliando na mensuração desses microrganismos benéficos

em diferentes condições. Ademais, ensaios de qPCR possibilitam inferir a compatibilidade entre ABCs.

Como ABCs podem competir em um mesmo ambiente e microrganismos benéficos podem apresentar superioridade de desenvolvimento quando inoculados simultaneamente (CARVALHEIRO et al, 2008; XU et al, 2011) (CHOW et al ,2018), no presente estudo, a dinâmica do desenvolvimento de *B. methylotrophicus* associado a outros microrganismos em raízes de soja também foi avaliada. Em primeiro lugar, a ausência de amplificação nos controles, nos quais as raízes não foram tratadas com ABCs, reforça a especificidade do marcador utilizado. Ademais, nossos resultados demonstraram que o pleno desenvolvimento da espécie em questão é alcançado quando na presença de *B. subtilis* e com *B. subtilis* e *T. asperellum*. Portanto, a recuperação de *B. methylotrophicus* de raízes de soja foi mais eficiente em tratamentos com os dois *Bacillus*, sugerindo a existência de um efeito sinérgico, o qual pode ter contribuído para o melhor estabelecimento e desenvolvimento do microrganismo em estudo. Sugerimos que esse consórcio possa aumentar o espectro de defesa da planta, melhorando seus parâmetros de crescimento, como já demonstrado por estudos anteriores (AHMAD et al, 2019; ALMEIDA et al, 2019; MANASA et al, 2021). Além disso, a co-administração de formulações de ABCs pode estimular a ativação de vias de produção de novos metabólitos secundários com potencial de antimicrobiano (WAKEFIELD et al, 2017).

O tratamento T4, com a combinação dos produtos a base de *T. asperellum* e *B. methylotrophicus*, apresentou efeito aditivo para a recuperação de *B. methylotrophicus*, superior a T2, no qual foi utilizado somente o microrganismo em estudo. Por outro lado, no tratamento T5 (*B. methylotrophicus*, *B. subtilis* e *T. asperellum*) foi observada uma redução na recuperação de *B. methylotrophicus* quando comparado a T3 (*B. methylotrophicus* e *B. subtilis*). Este achado sugere uma provável limitação de espaço e nutrientes no ambiente rizosférico na presença dos três ABCs. Os efeitos negativos entre ABCs já são reportados na literatura, especialmente quando há co-inoculação em meio de cultura. Karupiah e colaboradores (2019) demonstraram um efeito negativo sobre a taxa de crescimento e a produção de metabólitos de *T. asperellum* quando co-inoculado com *B. amyloliquefaciens*. No entanto, mesmo que exista uma interação competitiva entre ABCs de diferentes espécies, no ambiente rizosférico cepas de *Trichoderma* e *Bacillus* desempenham mecanismos de biocontrole de forma sinérgica para redução da severidade de doenças (IZQUIERDO-GARCÍA et al, 2020). Contudo, as estratégias de manejo utilizando ABCs podem ser rearranjadas para diminuir ou anular o efeito negativo entre fungos e bactérias benéficos.

Nossos resultados reforçam achados prévios referentes aos benefícios no controle de patógenos de plantas utilizando a co-administração de ABCs. Corrêa e colaboradores (2017), demonstraram que a combinação entre duas espécies de *Bacillus* e uma de *Pseudomonas* apresentaram o melhor perfil de controle da doença desencadeada por cepas de *Xanthomonas-axonopodis* pv. *phaseoli*. Panebianco e colaboradores (2015) também demonstram que a utilização de diferentes cepas de *Trichoderma* e *Pseudomonas* atuam cooperativamente na redução da incidência e severidade de mofo em frutas cítricas. Estudos mais recentes ainda propõem a possibilidade de produzir formulações compostas de *Pseudomonas aeruginosa* DRB1 e *Trichoderma harzianum* CBF2 sem comprometer a eficácia do biocontrole, a população microbiana e a estabilidade de armazenamento (WONG et al, 2019). No que se refere ao controle de fitonamatóides, recentemente foi proposto que o tratamento de sementes associado ao encharcamento do solo com o consórcio de rizobactérias promotoras de crescimento melhoraram os parâmetros de crescimento da planta e reduziram a infestação de nematóides (PANPATTE et al, 2021).

Cepas de *B. methylotrophicus* com atividade contra patógenos podem ser isoladas de tecidos vegetais durante os diferentes estádios de desenvolvimento da cultura, mas também de outros microbiomas como o solo, onde exercem ativamente suas atividades de antibiose (SHARMA et al, 2021). Além disso, também pode ser observada a ocorrência dos mecanismos de promoção de crescimento promovidos por *B. methylotrophicus* no solo. Neste ambiente, as cepas contribuem para aumentar os níveis de água e polissacarídeos além de reduzirem a presença de radicais livres ao estimularem a produção de enzimas com potencial antioxidante (HOU et al, 2018). Nesse sentido, tornam-se relevantes análises por qPCR do perfil biológico do solo, com plantas tratadas com os ABCs deste estudo, e de raízes provenientes dos principais estádios fenológicos da soja. Assim, o papel de *B. methylotrophicus* no desenvolvimento de sementes de soja será mais bem compreendido e ajustado.

6 CONCLUSÃO

As Combinações 1 (Mtnb1F + Mtnb2R) e 3 (Mtnb2F + Mtnb2R) de *primers* desenhadas para o gene *MtnB* apresentaram a maior especificidade na discriminação de *B. methylotrophicus*. Diante de toda complexidade envolvendo a classificação filogenética do gênero *Bacillus*, a descoberta deste marcador pode inovar a avaliação quantitativa por qPCR de microbiomas e, ainda, apoiar análises filogenômicas envolvendo a classificação das espécies.

Além da especificidade de detecção, os marcadores podem ser utilizados em análises qualitativas rápidas.

As análises quantitativas conduzidas com DNA proveniente de soja previamente tratada com diferentes produtos contendo ABCs reforçaram a especificidade da C1, uma vez que não foi observada amplificação em raízes de soja controle, ou seja, não tratadas com ABCs. Quanto à *B. methylotrophicus*, o melhor desempenho foi observado nos tratamentos com consórcio incluindo *B. methylotrophicus* + *B. subtilis* e *B. methylotrophicus* + *B. subtilis* + *T. asperellum*. Portanto, os ABCs utilizados neste estudo não interferiram negativamente no estabelecimento de *B. methylotrophicus*. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar a distribuição de *B. methylotrophicus* em outras amostras além do ambiente rizosférico e durante os principais estádios fenológicos da cultura. Sugere-se, ainda, análises quantitativas dos outros microrganismos utilizados no co-tratamento de sementes de soja, para melhor elucidar as interações no sistema radicular.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M. et al. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090402>
- AFRIN, K. S. et al. Development of Molecular Marker through Genome Realignment for Specific Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Race 5, a Pathogen of Black Rot Disease. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 785-793. 2019. <https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01050>
- AGROPECUÁRIA, E.-E. B. D. P. Tecnologias de produção de soja-Região Central do Brasil-2014: Embrapa Soja Londrina 2013.
- AHMAD, M. et al. Potential of phosphate solubilizing *Bacillus* strains for improving growth and nutrient uptake in mungbean and maize crops. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, n. 2, 2019. 10.21162/PAKJAS/19.7285
- AKTAR, W. et al. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12. 2009. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- ALABOUVETTE, C. et al. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v. 184, n. 3, p. 529-544. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x>
- ALMEIDA, J. R. et al. *Bacillus* sp. RZ2MS9, a tropical PGPR, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds both independently and when co-inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **bioRxiv**, 2021. <https://doi.org/10.1101/1758-2229.13004>
- AMSELEM, J. et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002230. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- ASHIDA, H. et al. Enzymatic Characterization of 5-Methylthioribulose-1-phosphate Dehydratase of the Methionine Salvage Pathway in *Bacillus subtilis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 4, 2008/04/23, p. 959-967. 2008. <https://doi.org/10.1271/bbb.70651>
- BARZMAN, M. et al. Eight principles of integrated pest management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 4, October 01, p. 1199-1215. 2015. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0327-9>
- BELL, C. A. et al. A High-Throughput Molecular Pipeline Reveals the Diversity in Prevalence and Abundance of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* Species in Coffee Plantations. **Phytopathology**, v. 108, n. 5, p. 641-650. 2018. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-17-0343-R>

- BREITLING, R. et al. Metabolomics for secondary metabolite research. **Metabolites**, v. 3, n. 4, p. 1076-1083. 2013. <https://doi.org/10.3390/metabo3041076>
- BROGGINI, G. A. et al. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. **European journal of plant pathology**, v. 111, n. 2, p. 93-100, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-1423-x>
- CATTANI, F. et al. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, 2016/04/01/, p. 2617-2624. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10019>
- CESSNA, S. G. et al. Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. **The Plant Cell**, v. 12, n. 11, p. 2191-2199. 2000. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2191>
- CHEN, Y. e WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 89, n. 12, p. 1268-1272. 2005. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1268>
- CHENG, H.-R. e JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 1, p. 55-59. 2006. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>
- CHINHEYA, C. C. et al. Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. **Biological Control**, v. 109, n., 2017/06/01/, p. 37-41. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.009>
- CHOW, Y. Y.; RAHMAN, S.; TING, A. S. Y. Interaction dynamics between endophytic biocontrol agents and pathogen in the host plant studied via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) approach. **Biological Control**, v. 125, p. 44-49, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.010>
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/221, n. 3 terceiro levantamento, dezembro. 2021
- CORRÊA, B. O. et al. Interaction between bacterial biocontrol-agents and strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* effects on biocontrol efficacy of common blight in beans. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 32, p. 1294-1302, 2017. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8565>
- COSETTA, C. M. e WOLFE, B. E. Causes and consequences of biotic interactions within microbiomes. **Current opinion in microbiology**, v. 50, n., p. 35-41. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.004>
- DIXON, R. A. e LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual review of plant biology**, v. 41, n. 1, p. 339-367. 1990. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.002011>
- DUNLAP, C. A. et al. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 65, n. 7, p. 2104-2109. 2015.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.000226>

DUNLAP, C. A. et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of based on phylogenomics.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 66, n. 3, p. 1212-1217. 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>

EILENBERG, J. Concepts and visions of biological control. In: (Ed.). **An ecological and societal approach to biological control**: Springer, v., 2006. Concepts and visions of biological control, p. 1-11. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4401-4_1

ELHADY, A. et al. Microbiomes associated with infective stages of root-knot and lesion nematodes in soil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177145. 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177145>

FAN, B. et al. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 22, 2017-January-20, p. 2017.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>

FERREIRA, L. V. M. et al. Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with *Rhizobium tropici* promotes plant growth and controls damping off in common bean. **Pedosphere**, v. 30, n. 1, p. 98-108, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60825-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60825-8)

FERNÁNDEZ-NO, I. C. et al. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, 2011/05/01/, p. 605-610. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.014>

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742. 2018.
<https://doi.org/10.1126/science.aap7999>

FOX, J. (2016). Generalized linear models. In *Applied regression analysis and generalized linear models* (3 ed., pp. 791). Los Angeles: SAGE.

FRIKHA-GARGOURI, O. et al. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. **Pest Management Science**, v. 73, n. 3, p. 568-574. 2017. <https://doi.org/10.1002/ps.4331>

GE, B. et al. *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166079. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166079>

GERIN, D. et al. A Ready-to-Use Single- and Duplex-TaqMan-qPCR Assay to Detect and Quantify the Biocontrol Agents *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*. **Frontiers**

in **Microbiology**, v. 9, n. 2073, 2018-August-31, p. 2018.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02073>

GODORNES, C. et al. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. **Cytokine**, 38(1), 1-7, doi:10.1016/j.cyto.2007.04.002. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.04.002>

GOTOR-VILA, A. et al. Development of a SCAR marker and a strain-specific genomic marker for the detection of the biocontrol agent strain CPA-8 *Bacillus amyloliquefaciens* (formerly *B. subtilis*). **Annals of Applied Biology**, v. 169, n. 2, p. 248-256. 2016.
<https://doi.org/10.1111/aab.12298>

GOULART, A. C. P. Fungos em sementes de soja: detecção e importância. **Embrapa Agropecuária Oeste-Documentos (INFOTECA-E)**, v., n., p. 1997.

GOWEN, S. Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects. **FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)**, v., n., p. 1997.

HARTMAN, G. et al. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. **Crop protection**, v. 73, n., p. 60-66. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.017>

HASSAN, M. et al. The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. **Agriculture**, v. 9, n., 07/04, p. 142. 2019.
<https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>

HERMOSA, M. R. et al. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Current Genetics**, v. 38, n. 6, 2001/01/01, p. 343-350. 2001.
<https://doi.org/10.1007/s002940000173>

HERMOSA, R. et al. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **Int. Microbiol**, v. 16, n. 2, p. 69-80. 2013. doi:10.2436/20.1501.01.181

HOU, X. et al. *Bacillus methylotrophicus* CSY-F1 alleviates drought stress in cucumber (*Cucumis sativus*) grown in soil with high ferulic acid levels. **Plant and Soil**, v. 431, n. 1, p. 89-105, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3748-9>

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – outubro de 2019.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – outubro de 2021.

IZQUIERDO-GARCÍA, L. F. et al. *Trichoderma virens* Gl006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling *Fusarium* wilt of cape gooseberry. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63689-y>

- JEMIL, N. et al. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 144-144. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1050-2>
- JEONG, H. et al. Genome sequence of antibiotic-producing *Bacillus amyloliquefaciens* strain KCTC 13012. **Genome Announc.**, v. 3, n. 5, p. e01121-15. 2015. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01121-15>
- JONES, M. G. K. e FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of Applied Biology**, v. 164, n. 2, p. 163-181. 2014. <https://doi.org/10.1111/aab.12105>
- KABBAGE, M. et al. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**, v. 233, n., p. 53-60. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.018>
- KENNEDY, A. C. e DE LUNA, L. Z. RHIZOSPHERE. In: D. Hillel (Ed.). **Encyclopedia of Soils in the Environment**. Oxford: Elsevier, v., 2005. RHIZOSPHERE, p. 399-406. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00163-6>
- KIM, K.-S. et al. Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, December 01, p. 2295-2311. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2816-x>
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**: Agrônômica Ceres, v. 1997
- KLOEPPER, J. W. et al. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1259-1266. 2004. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>
- KRIEL, A. et al. Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, 2012/10/26/, p. 231-241. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.009>
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2, 2006/04/01/, p. 95-125. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549. 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- LEFEVER, S.;PATTYN, F.; HELLEMANS, J., VANDESOMPELE, J. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. **Clin Chem**. 2013 Oct;59(10):1470-80. doi: 10.1373/clinchem.2013.203653. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24014836. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203653>
- LILLY, G., & BARNETT, H. L. (1951). *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill

LIU, J.-Z. et al. Gaining insight into soybean defense responses using functional genomics approaches. **Briefings in functional genomics**, v. 14, n. 4, p. 283-290. 2015.
<https://doi.org/10.1093/bfgp/elv009>

MADHAIYAN, M. et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 2490-2495. 2010.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.015487-0>

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**: Artmed Editora, v. 2016

MANASA, M. et al. Co-Inoculation of *Bacillus* spp. for Growth Promotion and Iron Fortification in Sorghum. **Sustainability**, v. 13, n. 21, p. 12091, 2021.
<https://doi.org/10.3390/su132112091>

MARTÍNEZ-BLANCH, J. F. et al. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 6, p. 951-955. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1465-1>

MCELREATH, R. AIC provides a surprisingly simple estimate of the average out-of-sample deviance. **Statistical Rethinking: A Bayesian Course with Examples in R and Stan CRC Press, pps**, v. 189, 2016.

MCNEAR JR, D. H. The rhizosphere-roots, soil and everything in between. **Nature Education Knowledge**, v. 4, n. 3, p. 1. 2013.

MCSPADDEN GARDENER, B. B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252-1258. 2004.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>

MEJIAS, J. et al. Plant Proteins and Processes Targeted by Parasitic Nematode Effectors. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 970, 2019-July-30, p. 2019.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00970>

MHATRE, P. H. et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n., 2019/01/01/, p. 119-128. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.009>

MOHKAM, M. et al. Identification of *Bacillus* Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, recA, rpoB Gene Sequencing and RAPD-PCR. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 1, 2016/03/01, p. 8-18. 2016.
<https://doi.org/10.1007/s12602-016-9208-z>

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-65. 1990. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>

MUMTAZ, M. Z. et al. *Bacillus* strains as potential alternate for zinc biofortification of maize grains. **Int. J. Agric. Biol**, v. 20, p. 1779-1786, 2018.

NAVARRO, M. O. P. et al. Bioactive Compounds Produced by Biocontrol Agents Driving Plant Health. In: V. Kumar, R. Prasad, *et al* (Ed.). **Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities**. Singapore: Springer Singapore, v., 2019. Bioactive Compounds Produced by Biocontrol Agents Driving Plant Health, p. 337-374. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0_15

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. et al. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. 148, 2016-July-18, p. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>

ONGENA, M. e JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

PANEBIANCO, S. et al. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. **Biological control**, v. 84, p. 19-27, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.02.001>

PALOMARES-RIUS, J. E. et al. Anatomical Alterations in Plant Tissues Induced by Plant-Parasitic Nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1987, 2017-November-16, p. 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01987>

PANPATTE, D. G. et al. Fortified bacterial consortium—a novel approach to control root knot nematode in cucumber (*Cucumis sativum*). **Biological Control**, v. 155, p. 104528, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104528>

PATWARDHAN, A. et al. Molecular markers in phylogenetic studies—a review. **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 2014, n., p. 2014.

PÉREZ-FLORES, P. et al. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. **Protoplasma**, v. 254, n. 6, November 01, p. 2201-2213. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1109-9>

PÉREZ-GARCÍA, A. et al. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>

PERTOT, Ilaria et al. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. **Crop Protection**, v. 97, p. 85-93, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.010>

PINU, F. et al. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: Quenching and extraction protocols. **Metabolites**, v. 7, n. 4, p. 53. 2017. <https://doi.org/10.3390/metabo7040053>

RADHAKRISHNAN, R. e LEE, I.-J. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. **Plant physiology and biochemistry**, v. 109, n., p. 181-189. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>

- RANJAN, A. et al. The pathogenic development of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean requires specific host NADPH oxidases. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 3, p. 700-714. 2018. <https://doi.org/10.1111/mpp.12555>
- ROTOLO, C. et al. A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain D747. **BioControl**, v. 61, n. 1, 2016/02/01, p. 91-101. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9701-4>
- RUBEL, M. H. et al. Development of a marker for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races 1 and 2 in *Brassica oleracea*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 60, n. 4, 2019/08/01, p. 511-517. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00143-7>
- RUIZ-GARCÍA, C. et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 191-195. 2005. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>
- RUTLEDGE, R. G. e CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 16, p. e93-e93. 2003. <https://doi.org/10.1093/nar/gng093>
- RYAN, P. et al. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 527-560. 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.527>
- SACCHI, C. T. et al. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 10, p. 1117. 2002. <https://doi.org/10.3201/eid0810.020391>
- SATO, K. et al. Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1165, 2019-September-26, p. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01165>
- SAVAZZINI, F. et al. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 2, 2008/05/01/, p. 185-194. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.02.004>
- SHARMA, S. C. D. et al. Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus*-SCS2012 isolated from soil. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 2293-2307, 2021.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539. 2011. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- SILVA, J. O. et al. Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, v. 47, 2017. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20161053>

SOBCZAK, M. e GOLINOWSKI, W. Cyst nematodes and syncytia. In: (Ed.). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**: Springer, v., 2011. Cyst nematodes and syncytia, p. 61-82. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_4

TAYLOR, A. e SASSER, J. Biology, identification and control of root-knot nematodes. **North Carolina State University Graphics**, v. 111, n., p. 1978.

THOMAS, A. L. Soja: tipos de crescimento da planta. v., n., p. 2018.

TIAN, B. et al. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, n. 2, p. 197-213. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x>

TUT, G. et al. Molecular Assay Development to Monitor the Kinetics of Viable Populations of Two Biocontrol Agents, *Bacillus subtilis* QST 713 and *Gliocladium catenulatum* J1446, in the Phyllosphere of Lettuce Leaves. **Biology**, v. 10, n. 3, p. 224, 2021. <https://doi.org/10.3390/biology10030224>

VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, February 01, p. 39-59. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>

VICENTE-HERNÁNDEZ, A. et al. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 Stimulates the Growth of Strawberry (*Fragaria × ananassa* ‘Aromas’) Plants In Vitro and Slows Botrytis cinerea Infection by Two Different Methods of Interaction. **Journal of Plant Growth Regulation**, v., n., November 20, p. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9888-6>

WAKEFIELD, J. et al. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1284, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01284>

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191. 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>

WEI, L. et al. Isolation and characterization of a rhizobacterial antagonist of root-knot nematodes. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85988. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085988>

WONG, Cl. K. F. et al. Effect of bioformulations on the biocontrol efficacy, microbial viability and storage stability of a consortium of biocontrol agents against Fusarium wilt of banana. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 2, p. 544-555, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14310>

WU, J.H.; HONG, P.Y.; LIU, W.T. Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 3, p. 267-275, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.03.001>

WYSS, U. Root Parasitic Nematodes: An Overview. In: C. Fenoll, F. M. W. Grundler, *et al* (Ed.). **Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions**. Dordrecht:

Springer Netherlands, v., 1997. Root Parasitic Nematodes: An Overview, p. 5-22.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-5596-0_2

ZHANG, Z. et al. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214. 2000.
<https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

ZHOU, L. et al. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**, v. 84, n., p. 8-13. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.12.009>

APÊNDICE A – Figuras Suplementares

Figura Suplementar 1. Alinhamento múltiplo do gene metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*) em espécies de *Bacillus*. Destacado de vermelho encontram-se as regiões evidenciando os polimorfismos de nucleotídeo único que diferenciam *B. methylotrophicus* das demais espécies que alinharam com a sequência do gene em estudo.

1. <i>Bacillus_methylotrophicus_Gf267</i>	AATCATG C ATCC TTTGACAAT A AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
2. CP054714.1:1298075-1299366_Bacillus_velezensis_strain_KKLW_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
3. CP044360.1:1247893-1249184_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_V167_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
4. CP044359.1:369210-370501_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_V417_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
5. CP043546.1:1296524-1297815_Bacillus_velezensis_strain_SYP-B637_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
6. CP000560.2:1301170-1302461_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_str_FZB42_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
7. CP020805.1:1819162-1820453_Bacillus_velezensis_strain_9D-6_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
8. CP006845.1:1296524-1297815_Bacillus_amyloliquefaciens_CC178_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
9. CP034176.1:1352135-1353426_Bacillus_velezensis_strain_MH25_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
10. CP029296.1:1337478-1338769_Bacillus_velezensis_strain_AP183_chromosome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
11. CP007244.1:1343511-1344802_Bacillus_velezensis_TriGoCor1448_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
12. CP044133.1:1395768-1397059_Bacillus_velezensis_strain_FJAT-46737_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
13. CP043416.1:1334416-1335707_Bacillus_velezensis_strain_ONU_553_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
14. CP041145.1:1303409-1304700_Bacillus_velezensis_strain_At1_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
15. CP040378.1:1268553-1269844_Bacillus_velezensis_strain_P34_chromosome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
16. CP039297.1:1345474-1346765_Bacillus_velezensis_isolate_UFLA258_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
17. CP032144.1:1288962-1290253_Bacillus_velezensis_strain_BIM_B-439D_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
18. CP024797.1:1399565-1400856_Bacillus_velezensis_strain_TJ02_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
19. CP023859.1:2340596-2341887_Bacillus_velezensis_strain_L-1_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
20. CP022531.1:2385761-2387052_Bacillus_velezensis_strain_TB1501_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
21. CP007242.1:1165924-1167215_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_amyloliquefaciens_KHG19_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
22. HG328254.1:1303582-1304873_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_UCMB5113_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
23. CP003838.1:1364875-1366166_Bacillus_velezensis_AS43.3_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
24. CP050462.1:1251313-1252604_Bacillus_velezensis_strain_Htq6_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
25. CP028211.1:3666397-3667688_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102747_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
26. CP028210.1:1457113-1458404_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102746_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
27. CP028208.1:2733813-2735104_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102744_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
28. CP028207.1:3273533-3274824_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102743_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
29. CP028206.1:1304739-1306030_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102742_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
30. CP028205.1:3610014-3611305_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102741_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC
31. CP039380.1:1322042-1323333_Bacillus_velezensis_strain_LPL-K103_chromosome_complete_genome	AATCATG C ATCC TTTGACAAT T AGCATATTCATATAGACTGGCCGC

32. CP033967.1:3431717-3433008_Bacillus_velezensis_strain_1B-23_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
33. CP030097.1:1085986-1087277_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_SH-B74_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
34. CP015417.1:1108023-1109314_Bacillus_velezensis_strain_SB1216_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
35. CP050424.1:1365760-1367051_Bacillus_velezensis_strain_S4_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
36. CP023748.1:1305369-1306660_Bacillus_velezensis_strain_LABIM40_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
37. CP035899.1:3771342-3772633_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ARP23_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C T T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
38. CP024203.1:1416635-1417926_Bacillus_velezensis_strain_NKG-1_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
39. CP019626.1:667068-668359_Bacillus_sp._275_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
40. CP061087.1:1353795-1355086_Bacillus_velezensis_strain_CLA178_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
41. CP045711.1:1308255-1309546_Bacillus_velezensis_strain_HN-Q-8_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
42. CP030150.1:1365366-1366657_Bacillus_velezensis_strain_DSYZ_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
43. CP026610.1:1365499-1366790_Bacillus_velezensis_strain_CGMCC_11640_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
44. CP024706.1:1292109-1293399_Bacillus_velezensis_strain_OSY-S3_chromosome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
45. CP015443.1:678366-679657_Bacillus_velezensis_strain_CC09_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
46. CP010406.1:757843-759134_Bacillus_sp._Pc3_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
47. CP043809.1:420691-421982_Bacillus_velezensis_strain_ZeaDK315Endobac16_chromosome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
48. CP034037.1:1207545-1208836_Bacillus_velezensis_strain_BCS01_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
49. CP009611.1:1323296-1324587_Bacillus_subtilis_strain_Bs-916_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
50. CP047119.1:3227707-3228998_Bacillus_velezensis_strain_AK-0_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
51. CP041143.1:1294499-1295790_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5007_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
52. CP041144.1:1294482-1295773_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5044_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
53. CP034203.1:1314074-1315365_Bacillus_velezensis_strain_83_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
54. CP027429.1:2533822-2535113_Bacillus_velezensis_strain_VCC-2003_chromosome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
55. CP024922.1:1378404-1379689_Bacillus_velezensis_strain_AGVL-005_chromosome_complete_genome	A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C A
56. AP018402.1:1346108-1347399_Bacillus_velezensis_S141_DNA_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
57. HG328253.1:1341538-1342829_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_UCMB5033_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A G C A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
58. CP051463.1:1337887-1339178_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5140_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
59. CP046918.1:138104-139395_Bacillus_velezensis_strain_BA-26_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
60. CP045926.1:560338-561629_Bacillus_velezensis_strain_AL7_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
61. CP038028.1:494649-495940_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_FS1092_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
62. CP029071.1:1329952-1331243_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB79_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C

63. CP025079.1:1366316-1367607_Bacillus_velezensis_strain_QST713_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
64. CP018295.1:1334912-1336203_Bacillus_subtilis_strain_J-5_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
65. HF563562.1:1292690-1293981_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_UCMB5036_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
66. CP060085.1:2596986-2598277_Bacillus_velezensis_strain_HAB-2_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
67. CP009749.1:1336738-1338025_Bacillus_subtilis_strain_ATCC_19217_complete_genome	A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
68. CP006890.1:1329573-1330860_Bacillus_velezensis_SQR9_complete_genome	A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
69. CP020874.1:802963-804254_Bacillus_velezensis_strain_GYL4_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
70. CP014783.1:1305910-1307201_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_B15_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
71. CP054479.1:2848273-2849564_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_R8-25_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
72. CP047268.1:1800570-1801861_Bacillus_velezensis_strain_DH8043_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
73. CP033054.1:1615156-1616447_Bacillus_velezensis_strain_Bac57_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
74. CP029069.1:1371379-1372670_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB65_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
75. CP025939.1:2027107-2028398_Bacillus_velezensis_strain_10075_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
76. CP024897.1:1294906-1296197_Bacillus_velezensis_strain_CN026_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
77. CP018133.1:1364134-1365425_Bacillus_velezensis_strain_ATR2_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
78. CP059495.1:1385288-1386579_Bacillus_velezensis_strain_JSRB_166_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
79. CP055160.1:57693-58984_Bacillus_velezensis_strain_WLYS23_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
80. CP053717.1:1219033-1220324_Bacillus_velezensis_strain_A2_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
81. CP040881.1:1314650-1315941_Bacillus_sp._HNA3_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
82. CP050448.1:1314886-1316177_Bacillus_velezensis_strain_BIM_B-1312D_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
83. CP049741.1:1314393-1315684_Bacillus_velezensis_strain_UB2017_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
84. CP048876.1:1314682-1315973_Bacillus_sp._LUNF1_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
85. CP045186.1:1314682-1315973_Bacillus_velezensis_strain_FJAT-52631_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
86. CP044349.1:1314773-1316064_Bacillus_velezensis_strain_LC1_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
87. CP023341.1:2783373-2784664_Bacillus_velezensis_strain_LG37_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
88. CP036518.1:815721-817012_Bacillus_velezensis_strain_ANSB01E_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
89. CP032506.1:881661-882952_Bacillus_velezensis_strain_JT3-1_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
90. CP032154.1:1314680-1315971_Bacillus_velezensis_strain_ZF2_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
91. CP029034.1:2053884-2055175_Bacillus_velezensis_strain_LDO2_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
92. CP028437.1:1332723-1334014_Bacillus_velezensis_strain_DR-08_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
93. CP021495.1:1314805-1316096_Bacillus_velezensis_strain_GQJK49_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C

94. CP011937.1:2615161-2616452_Bacillus_velezensis_strain_CBMB205_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
95. CP020893.1:1314681-1315972_Bacillus_vallismortis_strain_NBIF-001_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
96. CP020375.1:1315088-1316379_Bacillus_velezensis_strain_JTYP2_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
97. CP018007.1:2535333-2536624_Bacillus_velezensis_strain_sx01604_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
98. CP018200.1:1160940-1162231_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_WS-8_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
99. CP015911.1:1291481-1292772_Bacillus_velezensis_strain_LS69_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
100. CP016371.1:1314763-1316054_Bacillus_velezensis_strain_S3-1_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
101. CP014838.1:1314554-1315845_Bacillus_velezensis_strain_CBMB205_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
102. CP061176.1:1314682-1315973_Bacillus_velezensis_strain_ZF145_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
103. CP054562.1:1314863-1316154_Bacillus_velezensis_strain_YB-130_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
104. CP059344.1:2093964-2095255_Bacillus_velezensis_strain_K01_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
105. CP028204.1:2781065-2782356_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102755_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
106. CP047644.1:1381732-1383023_Bacillus_sp._AM1(2019)_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
107. CP041691.1:1369055-1370346_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ZJU1_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
108. CP023075.1:1372005-1373296_Bacillus_velezensis_strain_K26_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
109. CP035410.1:1508150-1509441_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103616_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
110. CP035399.1:1454328-1455619_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103788_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
111. CP035393.1:1454190-1455481_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103691_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
112. CP028375.1:1320575-1321866_Bacillus_velezensis_strain_W1_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
113. CP029070.1:1384912-1386203_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB69_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
114. CP023414.1:2075569-2076860_Bacillus_velezensis_strain_BS-37_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
115. CP025308.1:1303466-1304757_Bacillus_velezensis_strain_Lzh-a42_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
116. CP025258.1:3361757-3363048_Bacillus_sp._SJ-10_chromosome_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
117. CP021890.1:1454014-1455305_Bacillus_velezensis_strain_SRCM101413_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
118. CP017775.1:1455090-1456381_Bacillus_velezensis_strain_9912D_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
119. CP017747.1:1831016-1832307_Bacillus_velezensis_strain_SYBC_H47_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
120. CP006960.1:2040520-2041811_Bacillus_amyloliquefaciens_UMAF6614_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
121. CP006058.1:3560740-3562031_Bacillus_amyloliquefaciens_UMAF6639_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
122. CP009938.1:1913650-1914941_Bacillus_sp._BH072_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
123. CP003332.1:1324542-1325833_Bacillus_amyloliquefaciens_Y2_complete_genome	AATCATGCAATCCTTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC

124. HE774679.1:1326784-1328075_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_YAU_B9601-Y2_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
125. CP059405.1:3260866-3262157_Bacillus_velezensis_strain_MV2_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
126. CP051011.1:1309530-1310821_Bacillus_velezensis_strain_BY6_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
127. CP046386.1:2284847-2286138_Bacillus_velezensis_strain_GA1_chromosome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
128. CP041192.1:1290807-1292098_Bacillus_velezensis_strain_BvL03_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
129. CP044444.1:2712169-2713459_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_KC41_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
130. CP040672.1:2285800-2287091_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_X030_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
131. CP028439.1:2746505-2747796_Bacillus_velezensis_strain_8-2_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
132. CP028441.1:893385-894676_Bacillus_velezensis_strain_131-4_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
133. CP028440.1:1057786-1059077_Bacillus_velezensis_strain_J7-1_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
134. CP022556.1:1627744-1629035_Bacillus_velezensis_strain_NJAU-Z9_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
135. CP021976.1:1328452-1329743_Bacillus_velezensis_strain_T20E-257_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
136. CP016395.1:1377089-1378380_Bacillus_velezensis_strain_M75_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
137. LN999829.1:1296436-1297727_Bacillus_methylotrophicus_strain_B25_genome_assembly_chromosome_1_BAMM	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
138. CP021888.1:1420918-1422209_Bacillus_velezensis_strain_SRCM100072_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
139. CP011686.1:1329947-1331238_Bacillus_velezensis_strain_G341_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
140. CP011347.1:2660061-2661352_Bacillus_velezensis_strain_YJ11-1-4_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
141. CP059497.1:1421045-1422336_Bacillus_velezensis_strain_JSRB_08_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
142. CP026533.1:3207936-3209227_Bacillus_velezensis_strain_DKU_NT_04_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
143. CP021011.1:3228357-3229648_Bacillus_velezensis_strain_GFP-2_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
144. CP014700.1:1883983-1885274_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_S499_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
145. CP004065.1:2593016-2594307_Bacillus_amyloliquefaciens_IT-45_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
146. CP045993.1:1556287-1557578_Bacillus_velezensis_strain_LABIM22_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
147. CP053377.1:1344533-1345824_Bacillus_velezensis_strain_EN01_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
148. CP053376.1:1344280-1345571_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_WF02_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
149. CP041770.1:195718-197009_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_DH8030_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
150. CP037417.1:1344453-1345744_Bacillus_velezensis_strain_LB002_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
151. CP036527.1:1204399-1205690_Bacillus_velezensis_strain_UTB96_chromosome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
152. CP033576.1:3279368-3280659_Bacillus_velezensis_strain_NY12-2_chromosome_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
153. CP019040.1:1320191-1321482_Bacillus_velezensis_strain_GH1-13_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC
154. CP007165.1:1405949-1407240_Bacillus_velezensis_NJN-6_complete_genome	AATCATGCATCC TTTGACAAATGAATATATTCATATAGACTGGCCGC

184. CP022654.2:894087-895378_Bacillus_velezensis_strain_SCDB_291_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
185. CP061704.1:1298443-1299734_Bacillus_velezensis_strain_Y4_39_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
186. CP031694.1:3646374-3647665_Bacillus_velezensis_strain_SRCM101368_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
187. CP013727.1:242378-243669_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_MBE1283_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
188. CP031880.1:1298244-1299535_Bacillus_velezensis_strain_OSY-GA1_chromosome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T A G A C T G G C C G C
189. CP016913.1:1295756-1297047_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_RD7-7_complete_genome	A A T C A T G C T T C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
190. CP054415.1:1469826-1471117_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_205_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
191. CP041693.1:1250248-1251539_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_H_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
192. CP018902.1:568980-570271_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_HK1_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
193. CP011252.1:1402456-1403747_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_MT45_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
194. CP021505.1:1445502-1446793_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_SRCM101267_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
195. CP009748.1:1338804-1340095_Bacillus_subtilis_strain_ATCC_13952_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
196. CP002927.1:2037437-2038728_Bacillus_amyloliquefaciens_XH7_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
197. CP002634.1:1361660-1362951_Bacillus_amyloliquefaciens_LL3_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
198. CP002627.1:2036133-2037424_Bacillus_amyloliquefaciens_TA208_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
199. FN597644.1:1445180-1446471_Bacillus_amyloliquefaciens_DSM7_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
200. CP032146.1:1316662-1317953_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_YP6_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C G A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
201. CP025001.1:2896757-2898048_Bacillus_siamensis_strain_SCSIO_05746_chromosome_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
202. CP013950.1:892078-893369_Bacillus_sp._SDLI1_complete_genome	A A T C A T G C A T C C T T T G A C A A T G A A T A T A T T C A T A T C A A T T G G C C G C
203. CP023481.1:4592383-4593623_Bacillus_glycinifermentans_strain_KBN06P03352_chromosome_complete_genome	T T C G G A G G C C G C T A T A T A T C G G T G A A A T G G C C G C A T C C G T G T G A T G

1. <i>Bacillus_methylotrophicus_Gf267</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A T T G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
2. CP054714.1:1298075-1299366_ <i>Bacillus_velezensis_strain_KKLW_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
3. CP044360.1:1247893-1249184_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_V167_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
4. CP044359.1:369210-370501_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_V417_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
5. CP043546.1:1296524-1297815_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SYP-B637_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
6. CP000560.2:1301170-1302461_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_str_FZB42_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
7. CP020805.1:1819162-1820453_ <i>Bacillus_velezensis_strain_9D-6_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
8. CP006845.1:1296524-1297815_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_CC178_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
9. CP034176.1:1352135-1353426_ <i>Bacillus_velezensis_strain_MH25_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
10. CP029296.1:1337478-1338769_ <i>Bacillus_velezensis_strain_AP183_chromosome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
11. CP007244.1:1343511-1344802_ <i>Bacillus_velezensis_TriigoCor1448_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
12. CP044133.1:1395768-1397059_ <i>Bacillus_velezensis_strain_FJAT-46737_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
13. CP043416.1:1334416-1335707_ <i>Bacillus_velezensis_strain_ONU_553_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
14. CP041145.1:1303409-1304700_ <i>Bacillus_velezensis_strain_At1_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
15. CP040378.1:1268553-1269844_ <i>Bacillus_velezensis_strain_P34_chromosome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
16. CP039297.1:1345474-1346765_ <i>Bacillus_velezensis_isolate_UFLA258_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
17. CP032144.1:1288962-1290253_ <i>Bacillus_velezensis_strain_BIM_B-439D_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
18. CP024797.1:1399565-1400856_ <i>Bacillus_velezensis_strain_TJ02_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
19. CP023859.1:2340596-2341887_ <i>Bacillus_velezensis_strain_L-1_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
20. CP022531.1:2385761-2387052_ <i>Bacillus_velezensis_strain_TB1501_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
21. CP007242.1:1165924-1167215_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_amyloliquefaciens_KHG19_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
22. HG328254.1:1303582-1304873_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_UCMB5113_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
23. CP003838.1:1364875-1366166_ <i>Bacillus_velezensis_AS43.3_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
24. CP050462.1:1251313-1252604_ <i>Bacillus_velezensis_strain_Htq6_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
25. CP028211.1:3666397-3667688_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102747_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
26. CP028210.1:1457113-1458404_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102746_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
27. CP028208.1:2733813-2735104_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102744_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
28. CP028207.1:3273533-3274824_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102743_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
29. CP028206.1:1304739-1306030_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102742_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
30. CP028205.1:3610014-3611305_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102741_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
31. CP039380.1:1322042-1323333_ <i>Bacillus_velezensis_strain_LPL-K103_chromosome_complete_genome</i>	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A

32. CP033967.1:3431717-3433008_Bacillus_velezensis_strain_1B-23_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
33. CP030097.1:1085986-1087277_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_SH-B74_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
34. CP015417.1:1108023-1109314_Bacillus_velezensis_strain_SB1216_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
35. CP050424.1:1365760-1367051_Bacillus_velezensis_strain_S4_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
36. CP023748.1:1305369-1306660_Bacillus_velezensis_strain_LABIM40_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
37. CP035899.1:3771342-3772633_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ARP23_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
38. CP024203.1:1416635-1417926_Bacillus_velezensis_strain_NKG-1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
39. CP019626.1:667068-668359_Bacillus_sp._275_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
40. CP061087.1:1353795-1355086_Bacillus_velezensis_strain_CLA178_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
41. CP045711.1:1308255-1309546_Bacillus_velezensis_strain_HN-Q-8_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
42. CP030150.1:1365366-1366657_Bacillus_velezensis_strain_DSYZ_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
43. CP026610.1:1365499-1366790_Bacillus_velezensis_strain_CGMCC_11640_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
44. CP024706.1:1292109-1293399_Bacillus_velezensis_strain_OSY-S3_chromosome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
45. CP015443.1:678366-679657_Bacillus_velezensis_strain_CC09_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
46. CP010406.1:757843-759134_Bacillus_sp._Pc3_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
47. CP043809.1:420691-421982_Bacillus_velezensis_strain_ZeaDK315Endobac16_chromosome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
48. CP034037.1:1207545-1208836_Bacillus_velezensis_strain_BCSol_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
49. CP009611.1:1323296-1324587_Bacillus_subtilis_strain_Bs-916_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
50. CP047119.1:3227707-3228998_Bacillus_velezensis_strain_AK-0_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
51. CP041143.1:1294499-1295790_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5007_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
52. CP041144.1:1294482-1295773_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5044_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
53. CP034203.1:1314074-1315365_Bacillus_velezensis_strain_83_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C T G A G G T A A A
54. CP027429.1:2533822-2535113_Bacillus_velezensis_strain_VCC-2003_chromosome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
55. CP024922.1:1378404-1379689_Bacillus_velezensis_strain_AGVL-005_chromosome_complete_genome	G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A C
56. AP018402.1:1346108-1347399_Bacillus_velezensis_S141_DNA_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
57. HG328253.1:1341538-1342829_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_UCMB5033_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
58. CP051463.1:1337887-1339178_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5140_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
59. CP046918.1:138104-139395_Bacillus_velezensis_strain_BA-26_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
60. CP045926.1:560338-561629_Bacillus_velezensis_strain_AL7_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
61. CP038028.1:494649-495940_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_FS1092_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A

62. CP029071.1:1329952-1331243_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB79_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
63. CP025079.1:1366316-1367607_Bacillus_velezensis_strain_QST713_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
64. CP018295.1:1334912-1336203_Bacillus_subtilis_strain_J-5_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
65. HF563562.1:1292690-1293981_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_UCMB5036_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
66. CP060085.1:2596986-2598277_Bacillus_velezensis_strain_HAB-2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
67. CP009749.1:1336738-1338025_Bacillus_subtilis_strain_ATCC_19217_complete_genome	T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A C G C
68. CP006890.1:1329573-1330860_Bacillus_velezensis_SQR9_complete_genome	T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A C G C
69. CP020874.1:802963-804254_Bacillus_velezensis_strain_GYL4_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
70. CP014783.1:1305910-1307201_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_B15_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
71. CP054479.1:2848273-2849564_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_R8-25_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
72. CP047268.1:1800570-1801861_Bacillus_velezensis_strain_DH8043_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
73. CP033054.1:1615156-1616447_Bacillus_velezensis_strain_Bac57_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
74. CP029069.1:1371379-1372670_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB65_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
75. CP025939.1:2027107-2028398_Bacillus_velezensis_strain_10075_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
76. CP024897.1:1294906-1296197_Bacillus_velezensis_strain_CN026_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
77. CP018133.1:1364134-1365425_Bacillus_velezensis_strain_ATR2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
78. CP059495.1:1385288-1386579_Bacillus_velezensis_strain_JSRB_166_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
79. CP055160.1:57693-58984_Bacillus_velezensis_strain_WLYS23_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
80. CP053717.1:1219033-1220324_Bacillus_velezensis_strain_A2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
81. CP040881.1:1314650-1315941_Bacillus_sp._HNA3_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
82. CP050448.1:1314886-1316177_Bacillus_velezensis_strain_BIM_B-1312D_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
83. CP049741.1:1314393-1315684_Bacillus_velezensis_strain_UB2017_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
84. CP048876.1:1314682-1315973_Bacillus_sp._LUNF1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
85. CP045186.1:1314682-1315973_Bacillus_velezensis_strain_FJAT-52631_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
86. CP044349.1:1314773-1316064_Bacillus_velezensis_strain_LC1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
87. CP023341.1:2783373-2784664_Bacillus_velezensis_strain_LG37_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
88. CP036518.1:815721-817012_Bacillus_velezensis_strain_ANSB01E_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
89. CP032506.1:881661-882952_Bacillus_velezensis_strain_JT3-1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
90. CP032154.1:1314680-1315971_Bacillus_velezensis_strain_ZF2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
91. CP029034.1:2053884-2055175_Bacillus_velezensis_strain_LDO2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A

92. CP028437.1:1332723-1334014_Bacillus_velezensis_strain_DR-08_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
93. CP021495.1:1314805-1316096_Bacillus_velezensis_strain_GQJK49_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
94. CP011937.1:2615161-2616452_Bacillus_velezensis_strain_CBMB205_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
95. CP020893.1:1314681-1315972_Bacillus_vallismortis_strain_NBIF-001_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
96. CP020375.1:1315088-1316379_Bacillus_velezensis_strain_JTYP2_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
97. CP018007.1:2535333-2536624_Bacillus_velezensis_strain_sx01604_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
98. CP018200.1:1160940-1162231_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_WS-8_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
99. CP015911.1:1291481-1292772_Bacillus_velezensis_strain_LS69_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
100. CP016371.1:1314763-1316054_Bacillus_velezensis_strain_S3-1_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
101. CP014838.1:1314554-1315845_Bacillus_velezensis_strain_CBMB205_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
102. CP061176.1:1314682-1315973_Bacillus_velezensis_strain_ZF145_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
103. CP054562.1:1314863-1316154_Bacillus_velezensis_strain_YB-130_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
104. CP059344.1:2093964-2095255_Bacillus_velezensis_strain_K01_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
105. CP028204.1:2781065-2782356_Bacillus_velezensis_strain_SRCM102755_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
106. CP047644.1:1381732-1383023_Bacillus_sp._AM1(2019)_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
107. CP041691.1:1369055-1370346_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ZJU1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
108. CP023075.1:1372005-1373296_Bacillus_velezensis_strain_K26_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
109. CP035410.1:1508150-1509441_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103616_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
110. CP035399.1:1454328-1455619_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103788_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
111. CP035393.1:1454190-1455481_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103691_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
112. CP028375.1:1320575-1321866_Bacillus_velezensis_strain_W1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
113. CP029070.1:1384912-1386203_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB69_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
114. CP023414.1:2075569-2076860_Bacillus_velezensis_strain_BS-37_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
115. CP025308.1:1303466-1304757_Bacillus_velezensis_strain_Lzh-a42_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
116. CP025258.1:3361757-3363048_Bacillus_sp._SJ-10_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
117. CP021890.1:1454014-1455305_Bacillus_velezensis_strain_SRCM101413_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
118. CP017775.1:1455090-1456381_Bacillus_velezensis_strain_9912D_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
119. CP017747.1:1831016-1832307_Bacillus_velezensis_strain_SYBC_H47_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
120. CP006960.1:2040520-2041811_Bacillus_amyloliquefaciens_UMAF6614_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
121. CP006058.1:3560740-3562031_Bacillus_amyloliquefaciens_UMAF6639_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
122. CP009938.1:1913650-1914941_Bacillus_sp._BH072_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A

123. CP003332.1:1324542-1325833_Bacillus_amyloliquefaciens_Y2_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C T G A G G T A A A
124. HE774679.1:1326784-1328075_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_YAU_B9601-Y2_complete_genom	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C T G A G G T A A A
125. CP059405.1:3260866-3262157_Bacillus_velezensis_strain_MV2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
126. CP051011.1:1309530-1310821_Bacillus_velezensis_strain_BY6_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G A G A A C T T G C C G A G G T A A A
127. CP046386.1:2284847-2286138_Bacillus_velezensis_strain_GA1_chromosome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
128. CP041192.1:1290807-1292098_Bacillus_velezensis_strain_BvL03_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
129. CP044444.1:2712169-2713459_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_KC41_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
130. CP040672.1:2285800-2287091_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_X030_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
131. CP028439.1:2746505-2747796_Bacillus_velezensis_strain_8-2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
132. CP028441.1:893385-894676_Bacillus_velezensis_strain_131-4_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
133. CP028440.1:1057786-1059077_Bacillus_velezensis_strain_J7-1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
134. CP022556.1:1627744-1629035_Bacillus_velezensis_strain_NJAU-Z9_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
135. CP021976.1:1328452-1329743_Bacillus_velezensis_strain_T20E-257_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
136. CP016395.1:1377089-1378380_Bacillus_velezensis_strain_M75_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G A G A A C T T G C C G A G G T A A A
137. LN999829.1:1296436-1297727_Bacillus_methylotrophicus_strain_B25_genome_assembly_chromosome_:_BAMM	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
138. CP021888.1:1420918-1422209_Bacillus_velezensis_strain_SRCM100072_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
139. CP011686.1:1329947-1331238_Bacillus_velezensis_strain_G341_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
140. CP011347.1:2660061-2661352_Bacillus_velezensis_strain_YJ11-1-4_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
141. CP059497.1:1421045-1422336_Bacillus_velezensis_strain_JSRB_08_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
142. CP026533.1:3207936-3209227_Bacillus_velezensis_strain_DKU_NT_04_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
143. CP021011.1:3228357-3229648_Bacillus_velezensis_strain_GFP-2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
144. CP014700.1:1883983-1885274_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_S499_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
145. CP004065.1:2593016-2594307_Bacillus_amyloliquefaciens_IT-45_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
146. CP045993.1:1556287-1557578_Bacillus_velezensis_strain_LABIM22_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
147. CP053377.1:1344533-1345824_Bacillus_velezensis_strain_EN01_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
148. CP053376.1:1344280-1345571_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_WF02_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
149. CP041770.1:195718-197009_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_DH8030_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
150. CP037417.1:1344453-1345744_Bacillus_velezensis_strain_LB002_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
151. CP036527.1:1204399-1205690_Bacillus_velezensis_strain_UTB96_chromosome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A

152. CP033576.1:3279368-3280659_Bacillus_velezensis_strain_NY12-2_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
153. CP019040.1:1320191-1321482_Bacillus_velezensis_strain_GH1-13_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G G A A C T T G C C G A G G T A A A
154. CP007165.1:1405949-1407240_Bacillus_velezensis_NJN-6_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
155. HE617159.1:1359358-1360649_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_CAU_B946_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
156. CP061168.1:1388682-1389973_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_T-5_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
157. CP048002.1:3228860-3230151_Bacillus_velezensis_strain_CACC_316_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
158. CP031424.1:1345848-1347139_Bacillus_velezensis_strain_B-4_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
159. CP027868.1:3537270-3538561_Bacillus_velezensis_strain_SGAir0473_chromosome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
160. CP024647.1:1324117-1325408_Bacillus_sp._Lzh-5_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
161. CP023431.1:3214399-3215690_Bacillus_velezensis_strain_SCGB_574_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
162. CP022341.1:1323906-1325197_Bacillus_velezensis_strain_157_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
163. CP009679.1:1313568-1314859_Bacillus_velezensis_strain_JS25R_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
164. CP006952.1:1348771-1350062_Bacillus_amyloliquefaciens_LFB112_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
165. HG514499.1:2629607-2630898_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_NAU-B3_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
166. CP042271.1:250457-251748_Bacillus_velezensis_strain_LPL061_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
167. CP011278.1:1281201-1282492_Bacillus_velezensis_strain_L-S60_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
168. CP010556.1:1280788-1282079_Bacillus_velezensis_strain_L-H15_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
169. CP059855.1:250311-251602_Bacillus_velezensis_strain_Pm9_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
170. CP053764.1:1321133-1322424_Bacillus_velezensis_strain_B268_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
171. CP047157.1:1317885-1319176_Bacillus_velezensis_strain_FJAT-45028_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
172. CP018152.1:32022-33313_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_LM2303_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
173. CP009684.1:1893571-1894862_Bacillus_subtilis_strain_B-1_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
174. CP029473.2:636059-637350_Bacillus_velezensis_strain_Hx05_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
175. CP021338.1:1285895-1287186_Bacillus_velezensis_strain_ZL918_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
176. CP017953.1:1280284-1281575_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_Y14_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
177. CP011346.1:1307237-1308528_Bacillus_velezensis_strain_JJ-D34_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
178. CP041361.1:1365833-1367124_Bacillus_velezensis_strain_WRN014_chromosome_complete_genome	G G C G T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
179. CP014990.2:1276927-1278218_Bacillus_velezensis_strain_KD1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
180. CP027061.1:2601895-2603186_Bacillus_sp._ZY-1-1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
181. CP025341.1:1317330-1318621_Bacillus_velezensis_strain_CMT-6_chromosome_complete_genome	G G C G T G G C T G T A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A

182. CP023320.1:3303367-3304658_Bacillus_velezensis_strain_SCGB_1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
183. CP023133.1:910481-911772_Bacillus_velezensis_strain_J01_chromosome	G G C G T G G C T G T A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
184. CP022654.2:894087-895378_Bacillus_velezensis_strain_SCDB_291_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
185. CP061704.1:1298443-1299734_Bacillus_velezensis_strain_Y4_39_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
186. CP031694.1:3646374-3647665_Bacillus_velezensis_strain_SRCM101368_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
187. CP013727.1:242378-243669_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_MBE1283_complete_genome	G G C A T G G C T G T A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
188. CP031880.1:1298244-1299535_Bacillus_velezensis_strain_OSY-GA1_chromosome	G G C A T G G C T G T A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
189. CP016913.1:1295756-1297047_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_RD7-7_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
190. CP054415.1:1469826-1471117_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_205_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
191. CP041693.1:1250248-1251539_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_H_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
192. CP018902.1:568980-570271_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_HK1_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
193. CP011252.1:1402456-1403747_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_MT45_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
194. CP021505.1:1445502-1446793_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_SRCM101267_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
195. CP009748.1:1338804-1340095_Bacillus_subtilis_strain_ATCC_13952_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
196. CP002927.1:2037437-2038728_Bacillus_amyloliquefaciens_XH7_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
197. CP002634.1:1361660-1362951_Bacillus_amyloliquefaciens_LL3_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
198. CP002627.1:2036133-2037424_Bacillus_amyloliquefaciens_TA208_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
199. FN597644.1:1445180-1446471_Bacillus_amyloliquefaciens_DSM7_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
200. CP032146.1:1316662-1317953_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_YP6_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A G G T A A A
201. CP025001.1:2896757-2898048_Bacillus_siamensis_strain_SCSIO_05746_chromosome_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A A G T A A A
202. CP013950.1:892078-893369_Bacillus_sp._SDL11_complete_genome	G G C A T G G C T G C A A A A G A A G A A C G C T G G C G C G A A C T T G C C G A A G T A A A
203. CP023481.1:4592383-4593623_Bacillus_glycinifermentans_strain_KBN06P03352_chromosome_complete_genome	G T G C A A A A A C G C T G G C A G G A G C T T G C C G A A G T A A A C G G G A G C T T G C

Figura Suplementar 2. Alinhamento múltiplo do gene *Spore GerkB* em espécies de *Bacillus*. As regiões polimórficas estão destacadas de roxo e verde (GA) e podem ser capazes de diferenciar *B. methylotrophicus* das demais espécies que alinharam com a sequência do gene em estudo.

1. <i>Bacillus_methylotrophicus_GF267</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G G A T C C A C G C T G T T T A A A G
2. CP028211.1:521847-522965_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102747_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
3. CP028210.1:501314-502432_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102746_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
4. CP028208.1:1778064-1779182_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102744_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
5. CP028207.1:265653-266771_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102743_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
6. CP029296.1:372868-373986_ <i>Bacillus_velezensis_strain_AP183_chromosome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
7. CP024203.1:396630-397748_ <i>Bacillus_velezensis_strain_NKG-1_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
8. CP020805.1:886753-887871_ <i>Bacillus_velezensis_strain_9D-6_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
9. CP007244.1:392527-393645_ <i>Bacillus_velezensis_TrigoCor1448_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
10. CP028961.1:3486988-3488106_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102752_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
11. AP018402.1:387336-388454_ <i>Bacillus_velezensis_S141_DNA_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
12. CP018295.1:382546-383664_ <i>Bacillus_subtilis_strain_J-5_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
13. CP044133.1:380077-381195_ <i>Bacillus_velezensis_strain_FJAT-46737_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
14. CP040378.1:342930-344048_ <i>Bacillus_velezensis_strain_P34_chromosome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
15. CP039297.1:389121-390239_ <i>Bacillus_velezensis_isolate_UFLA258_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
16. CP032144.1:380284-381402_ <i>Bacillus_velezensis_strain_BIM_B-439D_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
17. CP023748.1:368757-369875_ <i>Bacillus_velezensis_strain_LABIM40_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
18. CP028206.1:345168-346286_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102742_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
19. CP028205.1:2650443-2651561_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102741_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
20. CP038028.1:1451215-1452333_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_FS1092_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
21. CP029071.1:415971-417089_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB79_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
22. CP025079.1:409688-410806_ <i>Bacillus_velezensis_strain_QST713_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
23. CP024797.1:437878-438996_ <i>Bacillus_velezensis_strain_TJ02_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
24. CP011686.1:389666-390784_ <i>Bacillus_velezensis_strain_G341_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
25. CP028204.1:1834622-1835740_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SRCM102755_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
26. CP044360.1:335305-336423_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_V167_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
27. CP044359.1:1281050-1282168_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_V417_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
28. CP043546.1:383503-384621_ <i>Bacillus_velezensis_strain_SYP-B637_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
29. CP041691.1:376558-377676_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ZJU1_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
30. CP000560.2:387607-388725_ <i>Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_str_FZB42_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
31. CP028375.1:365861-366979_ <i>Bacillus_velezensis_strain_W1_chromosome_complete_genome</i>	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G

32. CP029070.1:374092-375210_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB69_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
33. CP025308.1:377237-378355_Bacillus_velezensis_strain_Lzh-a42_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
34. CP025258.1:279196-280314_Bacillus_sp._SJ-10_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
35. CP006960.1:1100409-1101527_Bacillus_amyloliquefaciens_UMAF6614_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
36. CP009938.1:925958-927076_Bacillus_sp._BH072_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
37. CP006845.1:383503-384621_Bacillus_amyloliquefaciens_CC178_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
38. CP003332.1:370313-371431_Bacillus_amyloliquefaciens_Y2_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
39. HE774679.1:372042-373160_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_YAU_B9601-Y2_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
40. CP024922.1:683824-684941_Bacillus_velezensis_strain_AGVL-005_chromosome_complete_genome	T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
41. CP048876.1:384270-385388_Bacillus_sp._LUNF1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
42. CP046918.1:3251413-3252531_Bacillus_velezensis_strain_BA-26_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
43. CP045711.1:386547-387665_Bacillus_velezensis_strain_HN-Q-8_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
44. CP044349.1:384362-385480_Bacillus_velezensis_strain_LC1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
45. CP036518.1:1746308-1747426_Bacillus_velezensis_strain_ANSB01E_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
46. CP032506.1:3881048-3882166_Bacillus_velezensis_strain_JT3-1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
47. CP032154.1:384271-385389_Bacillus_velezensis_strain_ZF2_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
48. CP029034.1:2984468-2985586_Bacillus_velezensis_strain_LDO2_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
49. CP028437.1:402311-403429_Bacillus_velezensis_strain_DR-08_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
50. CP011937.1:3545746-3546864_Bacillus_velezensis_strain_CBMB205_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
51. CP020893.1:384270-385388_Bacillus_vallismortis_strain_NBIF-001_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
52. CP018007.1:3465921-3467039_Bacillus_velezensis_strain_sx01604_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
53. CP018200.1:2091524-2092642_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_WS-8_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
54. CP015911.1:361333-362451_Bacillus_velezensis_strain_LS69_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
55. CP016371.1:384351-385469_Bacillus_velezensis_strain_S3-1_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
56. CP014838.1:384142-385260_Bacillus_velezensis_strain_CBMB205_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
57. CP014783.1:389385-390503_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_B15_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
58. HF563562.1:389988-391106_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp._plantarum_UCMB5036_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
59. CP048002.1:2241008-2242126_Bacillus_velezensis_strain_CACC_316_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
60. CP045186.1:384270-385388_Bacillus_velezensis_strain_FJAT-52631_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
61. CP023341.1:3713951-3715069_Bacillus_velezensis_strain_LG37_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
62. CP029069.1:426155-427273_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ALB65_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G

63. CP021495.1:384406-385524_Bacillus_velezensis_strain_GQJK49_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
64. CP020375.1:384681-385799_Bacillus_velezensis_strain_JTYP2_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
65. CP010406.1:1678035-1679153_Bacillus_sp_Pc3_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
66. CP047644.1:430297-431415_Bacillus_sp_AM1(2019)_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
67. CP033967.1:251962-253080_Bacillus_velezensis_strain_1B-23_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
68. CP033054.1:625778-626896_Bacillus_velezensis_strain_Bac57_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
69. CP030150.1:437402-438520_Bacillus_velezensis_strain_DSYZ_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
70. CP027868.1:2584576-2585694_Bacillus_velezensis_strain_SGAir0473_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
71. CP020874.1:1783466-1784584_Bacillus_velezensis_strain_GYL4_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
72. CP026610.1:437431-438549_Bacillus_velezensis_strain_CGMCC_11640_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
73. CP025939.1:3933968-3935086_Bacillus_velezensis_strain_10075_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
74. CP024897.1:347799-348917_Bacillus_velezensis_strain_CN026_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
75. CP024647.1:375982-377100_Bacillus_sp_Lzh-5_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
76. CP018133.1:411685-412803_Bacillus_velezensis_strain_ATR2_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
77. CP023431.1:2266281-2267399_Bacillus_velezensis_strain_SCGB_574_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
78. CP022341.1:379685-380803_Bacillus_velezensis_strain_157_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
79. CP019626.1:1614597-1615715_Bacillus_sp_275_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
80. CP015443.1:1605653-1606771_Bacillus_velezensis_strain_CC09_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
81. CP006058.1:2602363-2603481_Bacillus_amyloliquefaciens_UMAF6639_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
82. CP009749.1:368098-369216_Bacillus_subtilis_strain_ATCC_19217_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
83. CP009679.1:364875-365993_Bacillus_velezensis_strain_JS25R_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
84. CP006890.1:367742-368860_Bacillus_velezensis_SQR9_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
85. HG514499.1:382315-383433_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_NAU-B3_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
86. CP043809.1:3244948-3246066_Bacillus_velezensis_strain_ZeaDK315Endobac16_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
87. CP041143.1:381081-382199_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5007_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
88. CP041144.1:381085-382203_Bacillus_velezensis_strain_UCMB5044_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
89. CP034203.1:362986-364104_Bacillus_velezensis_strain_83_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
90. CP027429.1:3460850-3461968_Bacillus_velezensis_strain_VCC-2003_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
91. CP039380.1:379188-380306_Bacillus_velezensis_strain_LPL-K103_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
92. CP030097.1:126952-128070_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_SH-B74_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G

93. CP011347.1:3627325-3628443_Bacillus_velezensis_strain_YJ11-1-4_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
94. CP045926.1:3533304-3534422_Bacillus_velezensis_strain_AL7_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
95. CP035899.1:689765-690883_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_ARP23_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
96. CP023414.1:3020006-3021124_Bacillus_velezensis_strain_BS-37_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G .
97. CP003838.1:379455-380573_Bacillus_velezensis_AS43.3_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G .
98. CP047157.1:368127-369245_Bacillus_velezensis_strain_FJAT-45028_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
99. CP046386.1:1344321-1345439_Bacillus_velezensis_strain_GA1_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
100. CP036527.1:363222-364340_Bacillus_velezensis_strain_UTB96_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
101. LN999829.1:355073-356191_Bacillus_methylotrophicus_strain_B25_genome_assembly_chromosome_:	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
102. CP009684.1:2561617-2562735_Bacillus_subtilis_strain_B-1_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
103. HE617159.1:371591-372709_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_CAU_B946_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
104. CP041770.1:3208127-3209245_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_DH8030_chromosome_complete_genom	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
105. CP043416.1:376821-377939_Bacillus_velezensis_strain_ONU_553_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G .
106. CP041361.1:404953-406071_Bacillus_velezensis_strain_WRN014_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
107. CP037417.1:406695-407813_Bacillus_velezensis_strain_LB002_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
108. CP031880.1:325286-326404_Bacillus_velezensis_strain_OSY-GA1_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
109. CP031424.1:364414-365532_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_B-4_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
110. CP027061.1:3524521-3525639_Bacillus_sp_ZY-1-1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
111. CP028439.1:3705658-3706776_Bacillus_velezensis_strain_8-2_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
112. CP028441.1:3827443-3828561_Bacillus_velezensis_strain_131-4_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
113. CP028440.1:2016967-2018085_Bacillus_velezensis_strain_J7-1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
114. CP025341.1:400029-401147_Bacillus_velezensis_strain_CMT-6_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
115. CP023133.1:247810-248928_Bacillus_velezensis_strain_J01_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
116. CP022556.1:2554829-2555947_Bacillus_velezensis_strain_NJAU-Z9_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
117. CP021976.1:369458-370576_Bacillus_velezensis_strain_T20E-257_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
118. CP021338.1:351295-352413_Bacillus_velezensis_strain_ZL918_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
119. CP018152.1:961855-962973_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_LM2303_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
120. CP016395.1:366671-367789_Bacillus_velezensis_strain_M75_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
121. CP014700.1:2591220-2592338_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_S499_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
122. CP011346.1:366437-367555_Bacillus_velezensis_strain_JJ-D34_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .
123. CP007165.1:401306-402424_Bacillus_velezensis_NJN-6_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G .

123. CP007165.1:401306-402424_Bacillus_velezensis_NJN-6_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
124. CP007242.1:205336-206454_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_amyloliquefaciens_KHG19_complete_gen	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T A A A G
125. CP006952.1:405938-407056_Bacillus_amyloliquefaciens_LFB112_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
126. CP004065.1:3561471-3562589_Bacillus_amyloliquefaciens_IT-45_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
127. CP041192.1:376279-377397_Bacillus_velezensis_strain_BvL03_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
128. CP040672.1:1371273-1372391_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_X030_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
129. CP029473.2:1558598-1559716_Bacillus_velezensis_strain_Hx05_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
130. CP021011.1:2305937-2307055_Bacillus_velezensis_strain_GFP-2_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
131. CP024706.1:338070-339188_Bacillus_velezensis_strain_OSY-S3_chromosome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
132. CP023320.1:2383492-2384610_Bacillus_velezensis_strain_SCGB_1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
133. CP022654.2:1818866-1819984_Bacillus_velezensis_strain_SCDB_291_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
134. CP019040.1:409986-411104_Bacillus_velezensis_strain_GH1-13_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
135. CP017953.1:367976-369094_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_Y14_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
136. CP017747.1:2488951-2490069_Bacillus_velezensis_strain_SYBC_H47_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
137. CP013727.1:3257432-3258550_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_MBE1283_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
138. CP042271.1:3230983-3232101_Bacillus_velezensis_strain_LPL061_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
139. CP031694.1:572000-573118_Bacillus_velezensis_strain_SRCM101368_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
140. CP034176.1:379391-380509_Bacillus_velezensis_strain_MH25_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
141. CP034037.1:350250-351368_Bacillus_velezensis_strain_BCS01_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
142. CP014990.2:370601-371719_Bacillus_velezensis_strain_KD1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
143. CP023859.1:1397087-1398205_Bacillus_velezensis_strain_L-1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
144. CP022531.1:1442925-1444043_Bacillus_velezensis_strain_TB1501_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
145. CP011278.1:355085-356203_Bacillus_velezensis_strain_L-S60_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
146. CP010556.1:354501-355619_Bacillus_velezensis_strain_L-H15_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G T G T G T C C A C G C T G T T T A A A G
147. CP009611.1:414913-416031_Bacillus_subtilis_strain_Bs-916_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
148. HG328253.1:418456-419574_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_UCMB5033_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
149. CP041145.1:385719-386837_Bacillus_velezensis_strain_At1_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
150. CP015417.1:208695-209813_Bacillus_velezensis_strain_SB1216_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
151. HG328254.1:385800-386918_Bacillus_amyloliquefaciens_subsp_plantarum_UCMB5113_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T T T T T A A A G
152. CP047268.1:850981-852099_Bacillus_velezensis_strain_DH8043_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G

153. CP021888.1:377480-378598_Bacillus_velezensis_strain_SRCM100072_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
154. CP026533.1:2212579-2213697_Bacillus_velezensis_strain_DKU_NT_04_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
155. CP033576.1:2319100-2320218_Bacillus_velezensis_strain_NY12-2_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
156. CP025001.1:3894541-3895659_Bacillus_siamensis_strain_SCSIO_05746_chromosome_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G A A A A A A
157. CP011252.1:369058-370176_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_MT45_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
158. CP013950.1:1869989-1871107_Bacillus_sp._SDL11_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T G C G G T T G T C G T G G G C G T G T C C A C G C T G T T T A A A G A A A A A A
159. CP044444.1:1742700-1743818_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_KC41_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
160. CP032146.1:368148-369266_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_YP6_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
161. CP023075.1:382557-383675_Bacillus_velezensis_strain_K26_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
162. CP018902.1:3471107-3472225_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_HK1_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
163. CP021505.1:369353-370471_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_SRCM101267_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
164. CP017775.1:379303-380421_Bacillus_velezensis_strain_9912D_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
165. FN597644.1:375069-376187_Bacillus_amyloliquefaciens_DSM7_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
166. CP041693.1:266711-267829_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_H_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
167. CP035410.1:442031-443149_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103616_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
168. CP035399.1:388205-389323_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103788_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
169. CP035393.1:388185-389303_Bacillus_velezensis_strain_SRCM103691_chromosome_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
170. CP016913.1:407863-408981_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_RD7-7_complete_genome	G T C A G C C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
171. CP009748.1:357141-358259_Bacillus_subtilis_strain_ATCC_13952_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
172. CP002927.1:358254-359372_Bacillus_amyloliquefaciens_XH7_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
173. CP002627.1:352344-353462_Bacillus_amyloliquefaciens_TA208_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
174. CP021890.1:388172-389289_Bacillus_velezensis_strain_SRCM101413_complete_genome	T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A T
175. CP002634.1:357021-358139_Bacillus_amyloliquefaciens_LL3_complete_genome	G T C A G T C T T T T T A C A T A T T C G G T T G T C G T G G G G G T C T C C A C G C T G T T T A A A G A G A A A A A
176. MK570509.1:1-416_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_H2O-1_surfactin_gene_region	
177. MK570508.1:1-416_Bacillus_amyloliquefaciens_strain_TSBSO3.8_surfactin_gene_region	
178. CP026523.1:462050-462525_Bacillus_cereus_strain_MBGJa3_chromosome	

Figura Suplementar 3. Alinhamento múltiplo do gene guanilato-quinase (*GUK*) em espécies de *Bacillus*. Destacado de vermelho encontram-se as regiões evidenciando os polimorfismos que diferenciam *B. methylotrophicus* das demais espécies que alinharam com a sequência do gene em estudo.

<i>B. methylotrophicus</i> :us GF267	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :UFLA258	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :1B-23	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :AGVL-005	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :TJ02	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :TrigoCor1448	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :At1	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> :arum FZB42	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :LPL-K103	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :MH25	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :BIMIM B-439D	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns SH-B74	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :AP183	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :BS-37	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :OSY-S3	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :NKG-1	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :L-1	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :LABIM40	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :9D-6	TATCTGCCGTC
<i>B. subtilis</i> :s J-5	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :SB1216	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns CC178	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> :arum UCMB5113	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :AS43.3	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :P34	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns FS1092	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :BCSol	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns ALB79	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :QST713	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :S14141 DNA	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :G341	TATCTGCCGTC
<i>B. subtilis</i> :s Bs-916	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> :arum UCMB5033	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :TB1501	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :UCMB5007	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :UCMB5044	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :GYL4	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :VCC-2003	TATCTGCCGTC
<i>Bacillus</i> sp.). 275	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns B15	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :YJ11-1-4	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i> :ciens KHG19	TATCTGCCGTC
<i>B. subtilis</i> :ATCCC 19217	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :SQR9	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> :arum UCMB5036	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :UTB96	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :Hx05	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :DSYZ	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :SGAir0473	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :KD1	TATCTGCCGTC
<i>Bacillus</i> sp.). ZY-1-1	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :CGMCCC 11640	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :GFP-2	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns LM2303	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns Y14	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :M75	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :CC09	TATCTGCCGTC
<i>B. methylotrophicus</i> :us B25	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :JJ-D34	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :L-S60	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :L-H15	TATCTGCCGTC
<i>Bacillus</i> sp.). Pc3	TATCTGCCGTC
<i>B. subtilis</i> :s B-1	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns X030	TATCTGCCGTC
<i>B. amyloliquefaciens</i> :ns ZJU1	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :LG37	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :WRN014	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :LB002	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :ANSB01E	TATCTGCCGTC
<i>B. velezensis</i> :Bac57	TATCTGCCGTC

