

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

**Interações químicas durante a invasão do microbioma da rizosfera de trigo
pelo patógeno *Bipolaris sorokiniana***

Hélio Danilo Quevedo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2023**

Hélio Danilo Quevedo
Biólogo

**Interações químicas durante a invasão do microbioma da rizosfera de trigo pelo
patógeno *Bipolaris sorokiniana***

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **RODRIGO MENDES**

Co-orientador:

Prof. Dr. **CÉLIO FERNANDO FIGUEIREDO ANGOLINI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

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

Quevedo, Hélio Danilo

Interações químicas durante a invasão do microbioma da rizosfera de trigo pelo patógeno *Bipolaris sorokiniana* / Helio Danilo Quevedo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

119 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Streptomyces* sp. 2. *Paenibacillus* sp.3. *Pseudomonas* sp.4. *Bipolaris sorokiniana* 5. Biocontrole 6. Metabólitos I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai, Francisco Hélio Quevedo (*in memoriam*), que me ensinou a respeitar a ciência e a natureza.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz” por ofertar o espaço de aprendizado e atender aos alunos com respeito e cuidado;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por ceder seus equipamentos, técnicos e laboratórios;

Ao Dr. Rodrigo Mendes, pela orientação, apoio e confiança no desenvolvimento desse trabalho;

Ao Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini, pela co-orientação, por me receber em sua equipe e compartilhar seu conhecimento;

Ao grupo de pesquisa “Back to the Roots” coordenado pelo Dr. Rodrigo Mendes, em particular à Dra. Josiane Barros Chiaramonte, Dra. Lilian Simara Abreu Soares Costa, MSc. Fernanda de Almeida Godoy, MSc. Caroline Sayuri Nishisaka e Dra. Maíke Rossmann por serem sempre solícitas, comprometidas e cooperativas;

Aos colegas de laboratório, pela colaboração sempre que necessária, em especial ao doutorando João Paulo Ventura, Dra. Laura Bononi e Msc. Lucas Guedes Silva por me apresentarem à rotina da microbiologia, à Neusa Domingos, Rosely dos Santos Nascimento e Elke Simoni Dias Vilela pelo suporte técnico, ao Dr. Gileno Vieira Lacerda Junior, Dra. Marta Alves Moitinho e MSc. Laís Mayara Melo Duré por todo incentivo e motivação ofertados durante essa fase.

Ao Professor Dr. Itamar Soares de Melo por ser inspirador e sempre se dispor a auxiliar com seu conhecimento;

Ao Professor Dr. Fernando Dini Andreote por me receber como estagiário e estimular a prática docente sendo referência como educador;

Aos colaboradores Dra. Larissa R. Terra e Dra. Sônia C. Queiroz minha gratidão pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho;

À Bruna Laís Merlin e Aline Peruchi, amigas que me acolheram em Piracicaba durante as disciplinas da ESALQ e que acompanham na vida universitária há alguns anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e fomento;

Aos meus pais pelo incentivo, compreensão e fé.



“É preciso correr muito para ficar no mesmo lugar. Se você quer chegar a outro lugar, corra duas vezes mais.!”

(Lewis Carroll, 1865)

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivos específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Modelo de estudo: genótipo de trigo BRS Guamirim.....	35
4.2 Seleção dos agentes antagônicos à doença causada por <i>B. Sorokiniana</i>	35
4.3 Teste de inibição <i>in Vitro</i>	36
4.4 Bioensaio	36
4.4.1 Crescimento do fungo <i>B. sorokiniana</i> e quantificação de esporos	37
4.4.2 Quantificação de bactérias	37
4.4.3 Microbiolização das sementes	37
4.4.4 Preparo do solo.....	37
4.4.6 Avaliação de doença	40
4.4.7 Índice relativo de clorofila foliar	41
4.4.8 Amostragem do solo rizosférico	41
4.4.9 Altura e biomassa da planta	41
4.5 Caracterização da comunidade bacteriana da rizosfera do trigo.....	41
4.5.1. Extração e purificação do DNA	41
4.5.2 Análises quantitativas do DNA genômico bacteriano e do patógeno	42
4.5.3 Sequenciamento metataxonômico do 16S rRNA e ITS1	43
4.5.4 Montagem do genoma dos isolados bacterianos.....	43
4.5.4 Análise de metabólitos	44
4.5.4.1 Cultivo de microrganismos	45
4.5.4.2 Análise de voláteis	45
4.5.4.2.1 Headspace SPME.....	45
4.5.4.2.2 Parâmetros cromatográficos.....	45

4.5.4.2.3 Roteiro do ensaio de análises químicas	46
4.5.4.3. Análise de não-voláteis.....	46
4.5.4.3.1 Preparo da amostra	46
4.5.4.3.2 Extração de metabólitos polares e análise dos análitos	47
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
5.3.1 Análise do bioensaio.....	51
5.3.2 Análise do microbioma.....	51
5.3.3 Processamento dos dados de Cromatografia Gasosa (GC-MS)	51
5.3.4 Processamento dos dados de Cromatografia Líquida (UPLC-MS).....	52
6. RESULTADOS	55
6.1 Avaliação de controle biológico	55
6.1.1 Teste de inibição <i>in vitro</i>	55
6.1.2 Bioensaio 1 – Ensaio piloto para estabelecimento da metodologia de avaliação de sintomas de doença.....	55
6.1.3 Bioensaio 2 – Avaliação de sintomas de doença.....	60
6.2 Caracterização dos inoculantes bacterianos	65
6.2.1 Análise de metabólitos secundários.....	71
6.2.2 Busca dirigida pelos compostos preditos a partir dos genomas bacterianos	71
6.2.3 Tratamento dos dados lidos em UPLC-MS na plataforma GNPS.....	73
6.2.4 Tratamento dos dados de GC-MS pelas plataformas MSDial, Unknown e MatLab	77
6.2.5 Análise de voláteis.....	77
6.3 Estruturação das comunidades bacterianas da rizosfera do trigo	81
6.3.1 Análise do gene rRNA 16S	81
6.3.2 Análise do gene <i>CosA</i>	82
6.3.3 Análise de abundância relativa e distribuição de taxa bacterianos.....	82
6.3.4 Análise de diversidade bacteriana na rizosfera do trigo	84
6.3.5 - Análise de abundância relativa e distribuição de taxa fúngicos.....	86
6.3.6 Análise de diversidade de fungos	87
7. DISCUSSÃO	91
7.1 Seleção de inoculantes bacterianos antagonistas ao patógeno causador de podridão de raiz	91

7.2 Caracterização genética, fenotípica e química dos inoculantes bacterianos antagonistas	94
7.2.1 Caracterização genotípica e fenotípica da cepa CMAA 1741 – <i>Pseudomonas sp.</i>	94
7.2.2 Caracterização genotípica e fenotípica da cepa CMAA 1738 – <i>Streptomyces sp.</i>	95
7.2.3 Caracterização genotípica e fenotípica da cepa CMAA 1739 – <i>Paenibacillus sp.</i>	97
7.2.4 Caracterização fenotípica do patógeno – <i>Bipolaris sorokiniana</i>	98
7.3 Impacto da inoculação de bactérias benéficas na estruturação do microbioma da rizosfera durante a invasão pelo fungo patogênico	99
8. CONSIDERAÇÕES GERAIS	103
REFERÊNCIAS	105
ANEXO	119

RESUMO

Interações químicas durante a invasão do microbioma da rizosfera de trigo pelo patógeno *Bipolaris sorokiniana*

O conhecimento da dinâmica das interações que ocorrem no microbioma da rizosfera ainda é limitado. O microbioma da rizosfera fornece serviços ecológicos à planta hospedeira, incluindo nutrição e proteção contra doenças. Esses serviços podem ser regulados por sinais químicos enviados pelas raízes, podendo selecionar e moldar a comunidade microbiana na rizosfera. Considerando que diante da infecção por um patógeno de origem do solo, a planta altera o padrão de exsudação radicular para acessar os recursos fornecidos por esses microrganismos antagonísticos ao fitopatógeno, neste trabalho buscamos identificar membros e funções do microbioma da rizosfera que contribuem para a defesa da planta. Além disso, testamos o impacto de inoculantes benéficos no início da doença para entender como a planta hospedeira e os microrganismos benéficos se comunicam para afastar o patógeno *Bipolaris sorokiniana* da rizosfera. Usando isolamento bacteriano da rizosfera, seguido de triagem *in vitro*, selecionamos três linhagens bacterianas, *Streptomyces* sp. CMAA 1738, *Paenibacillus* sp. CMAA 1739 e *Pseudomonas* sp. CMAA 1741, antagonísticas ao patógeno, capazes de solubilizar fósforo, fixar nitrogênio atmosférico e produzir ácido indol acético. Em um bioensaio, testamos a inoculação independente dos três isolados bacterianos em plântulas de trigo inoculadas ou não com o fungo patogênico. O índice de severidade da doença (ISD) foi maior (ISD=93%) nas plantas inoculadas exclusivamente com o patógeno (controle negativo). Nas plantas inoculadas com a bactéria antagonista e com o patógeno o ISD variou de 50 a 62%, mostrando uma diminuição significativa na incidência da doença em relação ao controle negativo. Nos tratamentos sem o patógeno, mas inoculados com cada bactéria benéfica, o ISD ficou entre 7 e 10%. Como também observamos um certo nível de doença (ISD=40%) em um tratamento sem inoculação de patógeno ou bacteriano (controle positivo), monitoramos a ocorrência do patógeno no solo usando qPCR visando o gene *CosA*. O genoma completo das três linhagens bacterianas selecionadas foram sequenciados, as quais também foram utilizadas em um bioensaio com mudas de trigo inoculadas com o fungo patogênico. Os genomas foram analisados e os *clusters* de genes de metabólitos secundários putativos foram identificados usando antiSMASH. Para analisar os compostos dos exsudatos bacterianos, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura na presença ou ausência do patógeno e analisadas em UPLC-MS (Micromass, Waters™). Os compostos voláteis também foram analisados com GC-MS (Agilent Technologies) durante o efeito de antibiose *in vitro* usando seringa SPME e fibra DVB/CAR/PDMS.UPLC. Utilizando a análise UPLC-MS foi possível localizar a massa exata da maioria dos compostos preditos no genoma relacionados à bioatividade, na cepa CMAA 1738 identificamos o espectro de massa direcionada aos sideróforos *coelichelin* e *desferrioxiamin_B*, aos antifúngicos *alkylresorcinol* e JBIR-126 e ao antibiótico *streptotricin* enquanto na cepa CMAA 1739 identificamos o antifúngico *fusaricidin_B*. Com os dados obtidos pelo GC-MS sob modelagem PLS-DA identificamos os compostos produzidos durante a antibiose, sendo os mais significativos para cepa CMAA 1738 o monoterpeneo 2-Metilisoborneol (95,4% - NIST), a cepa CMAA 1739 foi fortemente relacionado com a produção de grupos alcoólicos. Apesar da cepa CMAA 1741 precisar de mais investigação, concluímos que todas as cepas foram eficazes no controle da infecção fúngica quando inoculado em trigo. Com base na mineração do genoma, fomos capazes de prever e detectar

vários compostos bioativos possivelmente envolvidos na inibição de patógenos, incluindo exsudatos bacterianos e voláteis.

Palavras-chave: *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bipolaris sorokiniana*, Microbioma, Biocontrole, Metabólitos

ABSTRACT

Chemical interactions during wheat rhizosphere microbiome invasion by the pathogen *Bipolaris sorokiniana*

Knowledge of the dynamics of interactions that occur in the rhizosphere microbiome is still limited. The rhizosphere microbiome provides ecological services to the host plant, including nutrition and protection against disease. These services can be regulated by chemical signals sent by the roots, which can select and shape the microbial community in the rhizosphere. Considering that in the face of infection by a pathogen of soil origin, the plant changes the pattern of root exudation to access the resources provided by these microorganisms antagonistic to the phytopathogen, in this work we seek to identify members and functions of the rhizosphere microbiome that contribute to the defense of the plant. In addition, we tested the impact of beneficial inoculants on disease onset to understand how the host plant and beneficial microbes communicate to ward off the pathogen *Bipolaris sorokiniana* from the rhizosphere. Using rhizosphere bacterial isolation, followed by in vitro screening, we selected three bacterial strains, *Streptomyces* sp. CMAA 1738, *Paenibacillus* sp. CMAA 1739 and *Pseudomonas* sp. CMAA 1741, antagonistic to the pathogen, able to solubilize phosphorus, fix atmospheric nitrogen and produce indole acetic acid. In a bioassay, we tested the independent inoculation of the three bacterial isolates in wheat seedlings inoculated or not with the fungal pathogen. The disease severity index (DSI) was higher (DSI=93%) in plants inoculated exclusively with the pathogen (negative control). In plants inoculated with the antagonist bacteria and the pathogen, the DSI ranged from 50 to 62%, showing a significant decrease in the incidence of the disease in relation to the negative control. In treatments without the pathogen, but inoculated with each beneficial bacteria, the DSI was between 7 and 10%. As we also observed a certain level of disease (DSI=40%) in a treatment without pathogen or bacterial inoculation (positive control), we monitored the occurrence of the pathogen in the soil using qPCR targeting the *CosA* gene. The complete genome of the three selected bacterial strains were sequenced, which were also used in a bioassay with wheat seedlings inoculated with the pathogenic fungus. The genome was analyzed and putative secondary metabolite gene clusters were identified using antiSMASH. To analyze the exudate compounds, the bacterial strain was grown in culture medium in the presence or absence of the pathogen and analyzed in UPLC-MS (Micromass, Waters™). Volatile compounds were also analyzed with GC-MS (Agilent Technologies) under antibiosis using SPME syringe and DVB/CAR/PDMS fiber. Using the UPLC-MS analysis it was possible to locate the exact mass of most compounds predicted in the genome related to bioactivity, in the CMAA 1738 strain we identified the mass spectrum directed to the siderophores coelichelin and desferrioxamine_B, to the antifungals alkylresorcinol and JBIR-126 and to the antibiotic streptotricin while in the CMAA 1739 strain we identified the antifungal fusaricidin B. With data obtained by GC-MS under PLS-DA modeling, we identified the compounds produced during antibiosis, the most significant for strain CMAA 1738 being the monoterpene 2-Methylisoborneol (95.4% - NIST), for strain CMAA 1739 strongly related with alcoholic groups. Although the CMAA 1741 strain needs further investigation, we concluded that all strains were effective in controlling fungal infection when inoculated into wheat. Based on genome mining, we were able to predict and detect several

bioactive compounds possibly involved in pathogen inhibition, including bacterial and volatile exudates.

Keywords: *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bipolaris sorokiniana*, Microbiome, Biocontrol, Metabolites

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema geral do ciclo de vida do gênero *Bipolaris* spp. - Os conídios presentes no solo ou em restos de cultura infectam as sementes ou raízes causando infecção precoce da planta e tombamento. Há dispersão de conídios pela parte superior da planta que quando no solo infectam novamente a semente ou a raiz da planta (Ilustração de Tinoco, 2010. Adaptado de Parry, 1990).....24
- Figura 2 - Esquema experimental. (A) Processo de montagem do experimento, tratamentos inteiramente casualizados (n=6); (B) Descrição dos controles e dos tratamentos avaliados. As bactérias foram inoculadas nas sementes de trigo em todos os tratamentos exceto nos controles, o desenvolvimento do patógeno foi avaliado na presença e ausência de bactérias. O patógeno foi inoculado no sétimo dia da germinação. O bioensaio durou cinco semanas. C1: Controle neutro; C2: Controle positivo; C3: Controle negativo.....39
- Figura 3 - Escala de categorização de nível de doença: Categoria 0, sem lesão; categoria 1, lesão leve, leve lesão escura apenas na folha do cotilédone; categoria 2, lesão moderada, lesões moderadas escuras ou avermelhadas no caule; categoria 3, lesão severa, lesões escuras e severas no caule, acima da primeira folha e plantas mortas.....40
- Figura 4 – Frascos herméticos adaptados com septos para coleta de voláteis. Placas com microrganismos cultivados por 7 dias foram abertas dentro dos frascos e em seguida fechados por 35 minutos para acumular os compostos voláteis. Após o tempo de fechamento, a fibra DVB/CAR/PDMS foi exposta dentro do frasco por 15 minutos. A fibra então foi removida do frasco e inserida no GC-MS onde os compostos da fibra foram dessorvidos e detectados no equipamento.....44
- Figura 5 – Processo de preparo da amostra: a) Controle (BDA); b) Fungo *B. sorokiniana*; c) bactéria *Paenibacillus* sp.; d) bactéria *Streptomyces* sp.; e) bactéria *Pseudomonas* sp.; f) co-cultivo de *Paenibacillus* sp. com *B. sorokiniana*; g) co-cultivo de *Streptomyces* sp. com *B. sorokiniana*; h) co-cultivo de *Pseudomonas* sp. com *B. sorokiniana*. Para extração dos compostos contidos no ágar, o meio de cultura foi cortado para aumentar a superfície de contato e exposto a 90mL de solvente orgânico. A amostra foi filtrada e a massa obtida foi pesada após rotovaporar. A concentração foi calibrada para 2mg/mL antes de ser injetada no UPLC-MS.....48
- Figura 6 - Etapa de análise no UPLC acoplado a um espectrômetro de massas. A amostra calibrada em 2mg/mL foi injetada no UPLC-MS. A detecção da massa foi feita pelo detector Q-TOF e os dados obtidos foram processados pelo software Masslynx.....49
- Figura 7 - Avaliação da atividade antagônica dos isolados bacterianos contra o fungo *Bipolaris sorokiniana*. Houve formação de halo de inibição nos tratamento em co-cultivo devido efeito de antibiose.....55

Figura 8 – Sintomas da doença. A) Os vasos dos diferentes tratamentos foram posicionados de forma randômica (desenho experimental inteiramente casualizado); B) lado esquerdo C2 (controle com patógeno), lado direito C3 (planta sem patógeno). As lesões causadas pela doença são visíveis na estrutura do coleótilo da planta (seta azul).....56

Figura 9 - Índice de Severidade de Doença (ISD) causado pelo patógeno *B. sorokiniana* (BS) em plantas de trigo inoculadas com bactérias benéficas na presença ou ausência de patógeno fúngico. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.....57

Figura 10 - Efeito do tratamento na biomassa seca da planta. (A) peso da biomassa seca total das plantas; (B) peso da biomassa seca das raízes das plantas; (C) peso da biomassa seca das folhas e caules das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....58

Figura 11 - Efeitos do tratamento na altura e SPAD das plantas. (A) clorofila medida em SPAD das plantas; (B) altura das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Não gerou agrupamento pelo teste Tukey. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....59

Figura 12- Índice de Severidade de Doença (ISD) causado pelo patógeno *B. sorokiniana* (BS) em plantas de trigo inoculadas com bactérias benéficas na presença ou ausência de patógeno fúngico. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....60

Figura 13 - Efeito do tratamento na biomassa seca da planta. (A) peso da biomassa seca total das plantas; (B) peso da biomassa seca das raízes das plantas; (C) peso da biomassa seca das folhas e caules das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (C) Não gerou agrupamento pelo teste Tukey. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....62

Figura 14- Efeito do tratamento no comprimento das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....63

Figura 15 - Efeito dos tratamentos na biomassa fresca da planta, avaliação da parte aérea (caule e folhas). Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....64

Figura 16- Efeito do tratamento no teor relativo de clorofila das plantas medido em SPAD. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....65

Figura 17 - Filogenia de CMAA_1739 em comparação com a de diferentes espécies de *Paenibacillus* sp. (números de acesso RefSeq são fornecidos entre parênteses) selecionados a partir do Kbase, banco de genomas públicos. Os genomas inteiros foram alinhados e a árvore de de probabilidade máxima do CMAA_1739 foi construída usando as configurações padrão do FastTree v2.1.10. Os valores na árvore representam os valores e suporte local para os nós da árvore calculados usando o teste Shimodaira-Hasegawa (SH) no FastTree v2.1.10.....67

Figura 18 - Filogenia de CMAA_1738 em comparação com a de diferentes espécies de *Streptomyces* sp. (números de acesso RefSeq são fornecidos entre parênteses) selecionados a partir do Kbase, banco de genomas públicos. Os genomas inteiros foram alinhados e a árvore de probabilidade máxima do CMAA_1738 foi construída usando as configurações padrão do FastTree v2.1.10. Os valores na árvore representam os valores e suporte local para os nós da árvore calculados usando o teste Shimodaira-Hasegawa (SH) no FastTree v2.1.10.....68

Figura 19 - Filogenia de CMAA_1741 em comparação com a de diferentes espécies de *Pseudomonas* sp. (números de acesso RefSeq são fornecidos entre parênteses) selecionados a partir do Kbase, banco de genomas públicos. Os genomas inteiros foram alinhados e a árvore de probabilidade máxima do CMAA_1741 foi construída usando as configurações padrão do FastTree v2.1.10. Os valores na árvore representam os valores e suporte local para os nós da árvore calculados usando o teste Shimodaira-Hasegawa (SH) no FastTree v2.1.10.....69

Figura 20 - Massas exata dos compostos preditos no genoma de *Streptomyces* sp.. (A) Espectro da massa 566 do composto Coelichelin; (B) Espectro da massa 536.191 do composto JBIR-126; (C) Espectro 338.3 do composto Alkylresorcinol; (D) Espectro da massa 758.42 do composto Streptothricin; (E) Espectro da massa 601 do composto Desferrioxamin E.....72

Figura 21 - Espectro da massa 897.6 que corresponde ao composto Fusaricidin B predito no genoma de *Paenibacillus* sp.....73

Figura 22 - Compostos identificados pela plataforma GNPS através das amostras de *B. sorokiniana*. Os sinais verdes representam o banco de dados e são comparados com os sinais pretos que representam a amostra. (A) Cochlioquinone A C; (B) Anhydrocochlioquinone A.....75

Figura 23- Compostos identificados pela plataforma GNPS através das amostras de *B. sorokiniana*. Os sinais verdes representam o banco de dados e são comparados com os sinais pretos que representam a amostra. (A) Surfactina C; (B) Walleminone.....76

Figura 24 - Compostos identificados pela plataforma GNPS através das amostras de bactérias. Os sinais verdes representam o banco de dados e são comparados com os sinais pretos que representam a amostra. (A) Surfactina C identificada em *Pseudomonas* sp.; (B) Cynaroside, identificada em *Streptomyces* sp.....77

- Figura 25 - Modelo de Discriminação obtido por ANOVA-PLS-DA. (A) Cross-validação e (B) Vetor de Regressão. Os diamantes vermelhos são as amostras de fungo, os verdes são as amostras de bactérias e os azuis são as amostras de co-cultura. Houve discriminação do tratamento co-cultura, portanto, o vetor de regressão pode ser aplicado para encontrar os principais Tempos de Retenções e indicar os metabólitos responsáveis pela discriminação através da similaridade com a biblioteca NIST.....80
- Figura 26 - Boxplot. Quantificação do gene rRNA16S via qPCR. Foi calculado o número de cópias do gene rRNA 16S e analisado a diferença entre os tratamentos. Teste Tukey ($p < 0,05$) foi aplicado. Não houve diferença estatística significativa. ($n = 6$). Três controles foram usados de parâmetro para interpretação dos resultados: *Bulk soil* (controle neutro), Planta (controle positivo), Planta+BS (controle negativo). (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....81
- Figura 27 - Quantificação de Patógeno residente no solo via qPCR. Gene alvo *CosA*. Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ($n = 6$). Três controles foram usados de parâmetro para interpretação dos resultados: *Bulk soil* (controle neutro), Planta (controle positivo), Planta+BS (controle negativo). (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.....82
- Figura 28 - Distribuição da Abundância relativa dos taxa por tratamento mostrando os principais filos presentes nos tratamentos. Gene alvo, rRNA16S.....83
- Figura 29 - Distribuição da Abundância relativa dos taxa por tratamento mostrando as principais famílias presentes nos tratamentos. Gene alvo, rRNA16S.....83
- Figura 30 - Medida de alfa-diversidade das comunidades bacterianas de cada tratamento. Índices de Chao1 e Shannon da região V4 da subunidade do gene 16S rRNA. Teste Tukey usando índice de Shannon ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ($n = 6$).....84
- Figura 31 - Beta-diversidade das comunidades bacterianas utilizando PCoA e coeficiente de Bray-Curtis. Gene alvo, 16S rRNA. A) Beta-diversidade dos tratamentos com *Pseudomonas* sp.; B) Beta-diversidade dos tratamentos com *Paenibacillus* sp.; C) Beta-diversidade dos tratamentos com *Streptomyces* sp.; D) Controle positivo, negativo e *Bulk soil*.....85
- Figura 32 - Distribuição da Abundância relativa dos taxa por tratamento mostrando os principais filos presentes nos tratamentos. Alvo, região ITS.....86
- Figura 33 - Distribuição da Abundância relativa dos taxa por tratamento mostrando as principais famílias presentes nos tratamentos. Alvo, região ITS.....87
- Figura 34 - Medida de alfa-diversidade das comunidades fúngicas de cada tratamento. Índices de Chao1 e Shannon da região ITS1. Teste Tukey usando índice de Shannon ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ($n = 6$).....88
- Figura 35 - Beta-diversidade das comunidades de fungos utilizando PCoA e coeficiente de Bray-Curtis. Alvo, região ITS. A) Beta-diversidade dos tratamentos com *Pseudomonas* sp.; B) Beta-diversidade dos tratamentos com *Paenibacillus* sp.; C) Beta-diversidade dos tratamentos com *Streptomyces* sp.; D) Beta-diversidade dos tratamentos controle.....89

Figura 36 - Beta-diversidade das comunidades de fungos utilizando PCoA e coeficiente de Bray-Curtis. Alvo, região ITS. A) Beta-diversidade dos tratamentos *Pseudomonas* vs *Pseudomonas*+BS.; B) Beta-diversidade dos tratamentos *Paenibacillus* vs *Paenibacillus*+BS.; C) Beta-diversidade dos tratamentos *Streptomyces* vs *Streptomyces*+BS; D) Beta-diversidade dos tratamentos Planta vs Planta+BS.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias pré-selecionadas para o teste de inibição <i>in vitro</i>	36
Tabela 2 – <i>Primers</i> para a quantificação total de bactérias e do patógenos nos bioensaios.....	42
Tabela 3 – <i>Primers</i> usados para o sequenciamento de amplicons.....	43
Tabela 4 - Caracterização dos isolados bacterianos para produção de ácido indolilacético (AIA), solubilização de fósforo (P), fixação de nitrogênio (N), antagonismo aos patógenos <i>B. sorokiniana</i> (BS), <i>Fusarium graminearum</i> (FG), dados do sequenciamento dos genomas bacterianos.....	66
Tabela 5 - Classificação taxonômica dos genomas bacterianos utilizando o Genome Taxonomy Database – Toolkit (GTDB-Tk) e o National Center for Biotechnology Information (NCBI).....	66
Tabela 6- Agrupamentos de genes significativos codificados no genoma de <i>Streptomyces</i> sp. e <i>Paenibacillus</i> sp. (saída antiSMASH-MiBiG).....	70
Tabela 7 - Compostos químicos preditos no genoma das bactérias com sua respectiva relação de massa (<i>m/z</i>).....	71
Tabela 8 - Compostos identificados na plataforma GNPS pela biblioteca de dados após processamento das amostras em UPLC-MS.....	71
Tabela 9 - Compostos Orgânicos Voláteis, prospectados em co-cultivo (fungo e bactérias), que foram detectados pela biblioteca NIST 14 através de análise de MSDial com dados GC-MS. <i>p</i> -value <0.001 (ANOVA).....	79
Tabela 10 - Compostos Orgânicos Voláteis prospectados em co-cultivo (fungo e bactérias) detectados pela biblioteca NIST 14 através do método PLS-DA com dados GC-MS.....	81

1. INTRODUÇÃO

O solo é um dos ecossistemas mais complexos do planeta e hospeda uma imensa diversidade de microrganismos, sendo assim um importante repositório genético que abrange diversas vias metabólicas (DINI-ANDREOTE, 2020; NAYLOR et al., 2020). Grande parte destes microrganismos apresenta papel fundamental no desenvolvimento vegetal, promovendo a ciclagem e disponibilidade de nutrientes, contribuindo com a proteção da planta contra patógenos e pragas, além de mitigar efeitos de estresses abióticos (MENDES et al., 2013; MENDES e RAAIJMAKERS, 2015). Estes processos em interação com a planta ocorrem, principalmente, na região do solo próxima ao sistema radicular, i.e., rizosfera (HILTNER, 1904). A região rizosférica é considerada um *hotspot* devido ao alto teor de nutrientes exsudados pela planta, por apresentar alta atividade e diversidade microbiológica, incluindo bactérias, fungos, oomicetos, vírus e outros membros que compõem o microbioma da rizosfera (MENDES e RAAIJMAKERS, 2015; BERG et al., 2020).

Contudo, considera-se que as comunidades microbianas estruturadas nas áreas de *hotspot* são uma porção representativa de menor riqueza do que há no solo (*bulk soil*) (RODRIGUES et al., 2013, DINI-ANDREOTE, 2020). O solo, por ser um reservatório genético, está disponível e pode ter seus membros acessados diretamente pela planta que oferta moléculas energéticas aos microrganismos em troca de serviços ecossistêmicos (HARTMANN et al., 2009; BERENDSEN et al., 2012). Os microrganismos selecionados pela rizosfera podem ser estudados através de técnicas de cultivo, e então testados, na forma de inoculantes, quanto aos seus efeitos benéficos no desenvolvimento da planta. Por exemplo, bactérias apresentando potencial para a promoção de crescimento podem ser isoladas e caracterizadas quanto sua capacidade de produzir ácido indolacético, solubilizar fosfato mineral e fixar nitrogênio (GODOY, 2020). O emprego de tecnologias moleculares no estudo de microbiomas, em especial o sequenciamento em larga escala, tem ampliado a capacidade de acessar a diversidade microbiana das plantas (PASCALE et al., 2020). O uso de técnicas independentes de cultivo, como por exemplo, a abordagem metagenômica, tem revolucionado a forma que estudamos interações entre comunidades microbianas e plantas, possibilitando compreender a comunicação química estabelecida nessa interação, otimizar os traços benéfico ofertados pelos microrganismos e melhorar os recursos biotecnológicos nas práticas agrícolas (NISHISAKA et al., 2022).

1.1. O microbioma do solo e da rizosfera

O termo microbioma foi inicialmente aplicado à ecologia microbiana do corpo humano, o qual define o conjunto dos representantes microbiológicos e suas respectivas funções metabólicas envolvidas na interação microrganismos-hospedeiro (BERG et al., 2020). Os microrganismos membros do microbioma ocupam nichos especializados, desempenham funções específicas, interagem com outros membros do microbioma e com o ambiente, e compartilham os benefícios destas interações (MENDES et al., 2013; MENDES e RAAIJMAKERS, 2015; ANDREOTE & CARDOSO, 2016). A formação do microbioma garante ao hospedeiro vantagens adaptativas, estando relacionado com as habilidades de auxiliar na nutrição do hospedeiro, proteger contra desenvolvimento de doenças e minimizar os estresses bióticos e abióticos (MENDES et al., 2013; MENDES e RAAIJMAKERS, 2015).

O agrônomo alemão e fisiologista de plantas Lorenz Hiltner foi o primeiro autor a utilizar o termo “rizosfera” para caracterizar a região do solo ocupada por microrganismos em torno das raízes das plantas (HILTNER, 1904). Inicialmente, utilizando como modelo a associação de bactérias diazotróficas, a rizosfera foi classificada como sendo a região do solo influenciada pelas raízes das plantas que facilitavam a absorção de nitrogênio (HARTMANN et al., 2008; LETTICE, 2019). Posteriormente, foi possível observar que, além dos benefícios gerados ao hospedeiro, a região rizosférica também possuía propriedades físico-químicas e microbiológicas influenciadas pelos exsudatos liberados pelas plantas (MENDES e RAAIJMAKERS, 2015). Dessa forma, estudos recentes têm revelado como as plantas governam e modulam, estruturalmente e funcionalmente, os organismos do solo na montagem do microbioma da rizosfera abrangendo vários níveis tróficos (MENDES et al., 2013; ROSSMANN et al., 2020). Modelos ecológicos da formação do microbioma gerenciando níveis tróficos podem ser observados em Sapp et al. (2018) e Rossmann et al. (2020), os quais corroboram com a hipótese de que a estruturação das comunidades microbiológicas, e de outros organismos do solo correlacionados, podem ser dependentes do genótipo do hospedeiro.

Os microrganismos são a base da vida no solo e prestam diversos serviços ecossistêmicos, incluindo a mobilização de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes (ANDREOTE & CARDOSO, 2016; ROSSMANN et al., 2020). Devido à alta diversidade microbiana no solo, os serviços exercidos por esses microrganismos ocorrem de forma simultânea, gerando ecossistemas multifuncionais e complexos (JING et al., 2015; MEYER et al., 2018; JIAO et al., 2019). Apesar das funções do solo estarem relacionadas com as atividades microbiológicas, muitas porções do solo podem ser consideradas desertos

nutricionais, ou seja, sem atividade biótica, apresentando microrganismos mortos ou dormentes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Isso ocorre porque a microbiota do solo é carente de moléculas energéticas, assim, a atividade microbiana e a colonização de microrganismos acontecem em torno de fontes de carbono orgânico, como a matéria orgânica e de exsudatos liberados pelas raízes de plantas (ANDREOTE & CARDOSO, 2016). Tais ecossistemas são chamados microbiomas, os quais gerenciam diversas funções em nichos ecológicos.

Dessa forma, o entendimento da estruturação do microbioma no solo e na rizosfera é fundamental para explorar os benefícios do microbioma a favor do desenvolvimento das plantas bem como o uso de inoculantes em sistemas de produção (SCHMIDT et al., 2019).

1.2. O microbioma do solo supressivo

Solos supressores de doenças são fenômenos relatados em diversos trabalhos de fitopatologia e estão relacionados com a supressão de patógenos, e conseqüentemente, redução de sintomas de doenças observáveis nas plantas (MENDES et al., 2011; BERENDSEN et al., 2012, FARIA et al., 2018, COSTA et al., 2019). De acordo com Baker e Cook (1974) solos supressores de doenças são solos nos quais o patógeno não se estabelecem ou persistem, causam pouco ou nenhum dano ou se desenvolvem por um tempo, mas posteriormente a doença não é agravante apesar do patógeno continuar residindo no solo. Por outro lado, solos conducentes ou propícios, são solos favoráveis ao desenvolvimento da doença (MENDES et al., 2011). Em geral, solo com alta diversidade biológica são mais resistentes ao desenvolvimento de patógeno e estão relacionados com manejo adequado e qualidade da matéria orgânica (MENDES et al., 2011; BERENDSEN et al., 2012; ANDREOTE et al., 2016; LOURENÇO et al., 2018; YIN et al., 2019). Berendsen et al., (2012) exemplifica que todo solo possui tolerância a presença de patógenos, ou seja, é capaz de suprimir o patógeno enquanto a competição entre os microrganismos se mantiver equilibrada ou favorável aos organismos benéficos. Essa abordagem ecológica que centraliza a competição por nicho como razão da supressão entre grupos de microrganismos, considera a atividade de todos os membros da comunidade de forma multitrófica no qual individualmente seriam menos efetivos, porém em comunidade induzem supressão geral (MAZZOLA, 2002; WELLER et al., 2002). Dentro das comunidades são apontadas espécies chaves que são capazes de induzir respostas estridentes decorrente ao estresse ou ataques de microrganismos não-benéficos (CHAPELLE et al., 2016). Em monocultura, o cultivo sucessivo pode

enriquecer grupos antagônicos diante a entrada de patógenos no sistema, como relatado por Raaijmakers e Mazzola (2016), que descrevem que após o surto da doença, o mecanismo subsequente é o recrutamento e ativação de grupos específicos capazes de suprimir a doença. Dessa forma, podemos dizer que há dois tipos de supressividade: a supressividade Geral que é induzida pela rede multitrófica de microrganismos e a supressividade específica que é induzidas por espécies chaves.

A seleção de microrganismos relacionados à defesa da planta tem sido observada em solos supressivos, pois neles há histórico de informações no qual eventos dirigidos (eg. monocultura intensiva) ou estocásticos induziram defesa sistêmica na planta mostrando padrões e modificações no microbioma da rizosfera (RAAIJMAKERS et al., 2009; BERENDSEN et al., 2012; ROSSMANN et al., 2020). A resposta de defesa da planta exige que células específicas e especializadas sejam ativadas para eliminar o patógeno, registrando uma memória de defesa para futuros ataques (BERENDSEN et al., 2012; RAAIJMAKERS & MAZZOLA, 2016). Sendo assim, a medida que o patógeno coevolui com a planta, estratégias são reformuladas para combater a infecção, e conseqüentemente, altera a composição dos microrganismos associados à exsudação das plantas (BERENDSEN et al., 2012).

1.3. Supressividade no microbioma do trigo

A capacidade da planta de sintetizar moléculas orgânicas é determinada por fatores genéticos, dessa forma, cada genótipo de planta tem aporte fenológico para produzir determinados exsudatos e liberá-los no solo (VANČURA, V. e HANZLÍKOVÁ, 1972). A exsudação e os rizodepositos estruturam a comunidade de microrganismos no ambiente rizosférico (HAICHAR et al., 2008), de forma que, essa comunidade também possa ser dependente de genótipo (ROSSMANN et al., 2020; GODOY, 2020). No trabalho apresentado por Faria et al., (2018), foram comparados os níveis de tolerância em genótipos de trigo crioulos e modernos à infecção causada por *Bipolaris sorokiniana* e suas correlações com o recrutamento de bactérias na rizosfera. Nesse trabalho, os genótipos IAC 5 e Maringá foram indicados como os mais resistentes ao patógeno, e o genótipo Guamirim como suscetível à doença. Em conclusão ao trabalho de Faria et al., (2018), os resultados sugerem que o nível de resistência à doença se correlaciona com o recrutamento de grupos bacterianos específicos na rizosfera desses genótipos. Resultados similares foram observados no trabalho apresentado por Costa et al., (2019). Neste trabalho foi promovido o enriquecimento do microbioma da rizosfera de trigo para resistência ao patógeno *Bipolaris sorokiniana*, a avaliação da doença e a coleta do solo da rizosfera foram repetidas em um total de 5 ciclos.

Os resultados de Costa et al., (2019) mostraram que os solos de genótipos resistentes (eg. Frontana), após 5 ciclos de cultivo na presença do patógeno, apresentaram altos níveis de doença ao longo dos ciclos, por outro lado, os solos de genótipos suscetíveis (eg. Guamirim) cultivados nas mesmas condições, apresentaram baixos níveis de doença, sugerindo uma capacidade de supressão de doenças ao longo dos ciclos de monocultura. As análises sobre o trabalho de Costa et al., (2019) mostraram forte efeito de genótipo sobre o recrutamento dos microrganismos rizosféricos ao longo dos ciclos da doença. Comparando os trabalhos de Faria et al., (2018) e Costa et al., (2019) podemos observar que o genótipo Guamirim, que inicialmente é relatado como suscetível a infecção causada por *Bipolaris sorokiniana*, se torna resistente à doença ao longo do manejo sucessivo da cultura sugerindo que bactérias benéficas são selecionadas evitando a ocorrência de doença. O enriquecimento dos filos Acidobacteria e Chloroflexi, em ambos os trabalhos, foi relacionado com a redução da doença indicando que membros desses grupos ativam o *quorum sensing* da comunidade rizosférica que causam a supressão geral, garantindo a sanidade da planta.

1.4. Patógeno residente do solo: *Bipolaris sorokiniana*

Os fungos estão naturalmente presentes no solo e podem grande quantidade da biomassa microbiana (BRANDÃO, 1992; REIS & CASA, 1997). Os conídios dormentes ficam livres no solo e podem ser disseminados pelo vento (REIS & CASA, 1997). Apesar disso, os fungos apresentam baixa densidade populacional, variando de 10^4 a 10^6 g.solo⁻¹, sendo que a densidade pode aumentar dependendo da quantidade de matéria orgânica disponível ou restos de cultura depositado (eg. serrapilheira, resíduos vegetais) (ALEXANDER, 1980; REIS & CASA, 1997). Os fungos do gênero *Bipolaris* spp. (Figura 1) são considerados fungos necrotrófico apresentando uma fase parasitária e uma fase saprofítica na qual sobrevive e se multiplica usando a matéria orgânica (REIS & CASA, 1997). O fungo infecta o hospedeiro pela produção da enzima cutinase, capaz de degradar a parede celular (NILSSON et al., 1993), e também pela produção de toxinas que alteram a permeabilidade da membrana, como por exemplo a toxina *HmT*, toxina seletiva ao hospedeiro, age interrompendo processos bioquímicos, geralmente levam à apoptose e os efeitos são caracterizados pelas marcas de queimadas nas folhas (TREMACOLDI & SOUZA, 2006; NILSSON et al., 1993). Além disso, inibe o crescimento de raízes, altera a eficiência do processo de fotossíntese e causa fechamento de estômatos, interferindo no transporte de íons (HODGES et al., 1994).

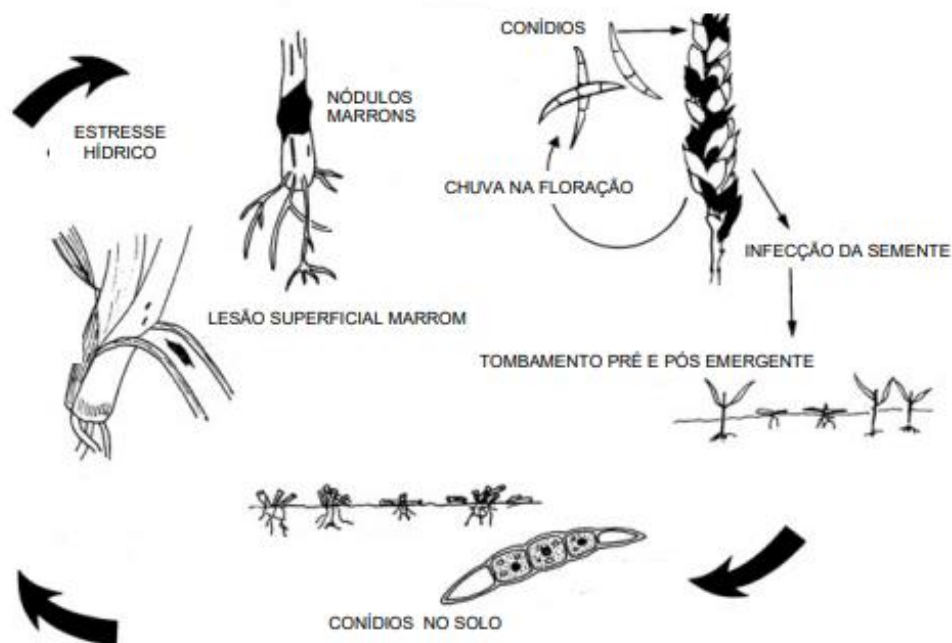


Figura 1. **Esquema geral do ciclo de vida do gênero *Bipolaris* spp.** - Os conídios presentes no solo ou em restos de cultura infectam as sementes ou raízes causando infecção precoce da planta e tombamento. Há dispersão de conídios pela parte superior da planta que quando no solo infectam novamente a semente ou a raiz da planta (Ilustração de Tinoco, 2010. Adaptado de Parry, 1990).

A espécie *Bipolaris sorokiniana*, sinóníma *Helminthosporium sativum*, tendo como forma teleomórfica *Cochliobolus sativus* da classe Ascomycetes, ordem Pleosporales, família Pleosporaceae (FERRARI, 2002). Apresentam conídios relativamente grandes, com 1 a 8 septos em cripta, podendo medir até 220 μm . O estabelecimento da doença no campo é favorável ao fungo na faixa de temperatura entre 20 e 30°C (FERRARI, 2002). Por ser uma doença que pode ser transmitida pelo endosperma, o recomendado é que haja tratamento prévio de patógenos nas sementes para que sejam evitados danos na lavoura, todavia, os fungicidas comerciais somente são capazes de tratar sementes cuja severidade não supere 30% de infecção (PICININI e FERNANDES, 2001), sendo assim, o custo de aplicação pode onerar o custo de produção caso a incidência de patógeno seja recorrente durante o ciclo da cultura. Por isso, a busca de alternativas de controle de patógeno, como uso de inoculantes antagônicos à doença, para combinar ou substituir as tecnologias aplicadas, são econômica e ecologicamente interessantes.

1.5. O microbioma do trigo com a domesticação das plantas

A domesticação de plantas faz parte da história cultural do desenvolvimento sedentário da humanidade (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2016). O processo de domesticação envolve seleção de plantas por fenótipos, modificações da morfologia e combinações de genótipos (GEPT et al., 2004). Estudos relacionados à domesticação de plantas possuem grande importância científica e evolutiva podendo, atualmente, serem melhores investigados devido aos avanços de técnicas moleculares independentes de cultivo (FARIA et al., 2018; COSTA et al., 2019; ROSSMANN et al., 2020). Dessa forma, é possível a identificação das diferenças genéticas entre cultivares selvagens, crioulos e modernos, e dos efeitos causados por estas mudanças no microbioma associado ao hospedeiro (ROSSMANN et al., 2020). No trabalho de Rossmann et al., (2020) foi avaliada a diversidade na rizosfera considerando as comunidades bacterianas, fúngicas e cercozoárias em variedades nativas (crioulas) e variedades modernas de trigo. Os resultados de Rossmann et al., (2020) mostraram que as redes de interações microbianas das variedades crioulas de trigo formaram uma topologia de rede mais complexa do que a das variedades modernas de trigo, sugerindo que a seleção de plantas reduziu a capacidade das raízes em recrutar microrganismos específicos. Neste contexto, estamos considerando que a domesticação de plantas poderia estar minando interações benéficas entre microrganismos e plantas, diminuindo os recursos nutricionais e limitando as estratégias de defesa da planta contra estresses bióticos ou abióticos, comprometendo a função da rizosfera.

As alterações genéticas causadas pelos frequentes processos de melhoramento vegetal, por exemplo, focam na produtividade e proteção contra agentes patogênicos, negligenciando as relações ecológicas entre a planta e o microbioma, as quais também são guiadas pelo genoma do hospedeiro (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2016; PORTER & SACHS, 2020). Dessa forma, as mudanças genéticas provenientes dos processos de domesticação e melhoramento genético podem resultar em uma pleiotropia antagonista, afetando indiretamente as características do genoma que são relacionadas com a capacidade de se relacionar com microrganismos benéficos (PORTER & SACHS, 2020). Os genes associados a fenótipos desejáveis sofreram uma perda de diversidade porque apenas os alelos desejados foram selecionados, suprimindo os outros genes e fenótipos relacionados à exsudação radicular (REIF et al., 2005). Essas mudanças genéticas, consequentes da seleção dos fenótipos, podem originar alterações na arquitetura de raiz e na produção de metabólitos e

outros compostos produzidos pela planta (REIF et al., 2005; PÉREZ-JARAMILLO et al., 2016). Estes fatores, por sua vez, estão diretamente relacionados com a maneira em que o hospedeiro interage com o microbioma do solo, visto que as comunidades microbianas utilizam os exsudatos da região rizosférica como fonte nutricional (REIF et al., 2005; ANDREOTE et al., 2016).

A perda genética resultante da seleção de plantas se tornou uma preocupação dos melhoristas, como relatado por Reif et al., (2005) que estudaram 253 cultivares de trigo para avaliar a diversidade genética durante a domesticação de plantas utilizando 90 marcadores de repetição de sequência simples (SSR), os resultados mostraram que a diversidade genética do trigo foi reduzida de 1950 a 1989, mas aumentou de 1990 a 1997, esta melhora ocorreu devido ao interesse dos melhoristas em evitar o estreitamento da base de germoplasma de trigo. Reif et al., (2005) verificaram que as variedades crioulas possuíam numerosos alelos únicos que estavam ausentes nas variedades modernas, contudo, posteriormente, aumentaram a diversidade genética através da introgressão de novos materiais. Todavia, o impacto ecológico sobre o microbioma do solo-planta não foi avaliado. Rossmann et al., (2020) relatam que a domesticação de plantas causa efeito de perda multitrófica comprometendo a correlação positiva verificada entre protistas e bactérias, rompendo funções benéficas e fragilizando a rede de interações formada no microbioma. Portanto, estreita a especificidade da planta em direção ao melhoramento submetido.

1.6. Isolamento de bactérias benéficas na rizosfera do trigo

Assumindo que existe a dependência do microbioma com o genótipo de planta e considerando a premissa que cultivares modernos perderam algumas características para recrutar microrganismos específicos do hospedeiro durante o processo de seleção de plantas, estudos foram criando foco sobre resgatar microrganismos de genótipo ancestrais/crioulos, por meio de isolamento através de técnica de cultivo, para serem reintroduzidos na agricultura moderna (CARVALHO et al., 2018; ROSSMANN et al., 2020; GODOY et al., 2020). O trabalho de Carvalho et al., (2018), por exemplo, teve como objetivo acessar membros bacterianos da rizosfera de quatro genótipos de trigo, sendo dois genótipos crioulos e dois modernos, através da abordagem dependente de cultivo e identificou as características benéficas das bactérias isoladas, como por exemplo, capacidade de reduzir doença causada por patógeno de solo, através de testes de inibição aos patógenos *Bipolaris sorokiniana* e

Fusarium graminearum e capacidade de produção de ácido indol acéticos e solubilização de fosforo através de testes bioquímicos. Posteriormente, os 71 microrganismos triados por Carvalho et al., (2018), foram estudados por Godoy (2020). Os microrganismos foram novamente submetidos aos testes bioquímicos, acrescentando o teste de capacidade de fixar nitrogênio, além disso os microrganismos foram identificados taxonomicamente até nível de gênero através de sequenciamento do gene rRNA 16S (região V3 e V4). Com os isolados bacterianos devidamente caracterizados, Godoy (2020) testou os inoculantes em três genótipos comerciais de trigo (BRS Marcante, BRS Parrudo e BRS Reponte) para estimar a contribuição destes microrganismos na promoção de crescimento das plantas em bioensaios. De acordo com Godoy (2020), as inoculações foram feitas nas sementes e doses de reforços foram aplicadas quinzenalmente amostrando o solo rizosférico ao longo de todos o experimento para poder identificar como os inoculantes se estabilizam e como a rizosfera se reestrutura diante da introdução dos microrganismos. Nos resultados de Godoy (2020), a melhor resposta para promoção de crescimento foi verificada com a inoculação da bactéria do gênero *Pseudomonas* sp. que havia sido isolada da rizosfera de trigo crioulo (genótipo Karakilcik) e reinoculada no genótipo comercial BRS Parrudo, sugerindo que membros que co-evoluíram com genótipos ancestrais possuem informações benéficas que podem auxiliar e complementar o desenvolvimento dos genótipos modernos. Outros inoculantes que tiveram boa resposta ao genótipo BRS Parrudo, em relação à promoção de crescimento, foram as bactérias do gênero *Streptomyces* sp. (isolada do genótipo crioulo: Iran) e *Paenibacillus* sp. (isolada do genótipo crioulo: Karakilcik). Observando a ecologia e estruturação dos inoculantes apresentados no trabalho de Godoy (2020), foi demonstrando que há enriquecimento do gênero inoculado logo após a dose de reforço, seguido de queda ao decorrer dos dias. A introdução de inoculante é observada com redução de alfa-diversidade devido ao aumento de frequência da bactéria inoculada e enriquecimento de determinados grupos bacterianos, exceto no caso de *Pseudomonas* sp. que aparenta ofertar traços benéficos para o genótipo BRS Parrudo sem reduzir a diversidade de bactérias da rizosfera. Os estudos de bactérias por meio de isolamento por técnicas de cultivo continua sendo uma forma promissora para ser aplicada à agricultura moderna, além disso, as ferramentas moleculares ajudam a entender como os inoculantes se estruturam nos microbiomas, compreender a aplicabilidade biotecnológica e os efeitos na ecologia do solo.

1.7. Interações químicas na rizosfera

As interações da rizosfera não são apenas impulsionadas por raízes, mas também são complementadas e influenciadas por organismos residentes no solo, fatores químicos e edáficos da região estabelecida (ANDREOTE et al., 2016). Os organismos associados às raízes estão ativamente envolvidos na sinalização com a planta hospedeira (CHAPELLE et al., 2016). As raízes das plantas liberam uma ampla gama de compostos que estão envolvidos na atração de organismos benéficos e na formação de associações simbióticas na rizosfera (BADRI et al., 2009). As plantas sintetizam mais de 200.000 metabólitos primários e secundários, incluindo compostos orgânicos voláteis (COVs) e solúveis (HARTMANN et al., 2004). Esses compostos incluem açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos graxos, esteróis, fenólicos, enzimas, proteínas, reguladores de crescimento de plantas e metabólitos secundários (BADRI et al., 2009, BADRI et al., 2012). O carbono orgânico solúvel ofertado pelas plantas durante a exsudação radicular é atrativo a diversos organismos (ROMAGNOLI & ANDREOTE, 2016; MENDES et al., 2013) e a comunicação estabelecida na atração entre microrganismo-planta pode ser mediada por metabólitos (BADRI et al., 2009). Sabe-se, por exemplo, que flavonoides e estrigolactonas influenciam associações simbióticas mutualistas entre as plantas e micorrizas (BADRI et al., 2012; VALADARES et al., 2016). Também foi verificado que ácidos cítricos e fumáricos atraem microrganismos até as raízes de tomate, assim como benzohexazenoides modificam a estrutura microbiana atraindo cepas de *Pseudomonas putida* (BADRI et al., 2012; NEAL et al., 2012). Outro exemplo são os ácidos fenólicos que se mostraram correlacionados com taxa específicos de bactérias na rizosfera de plantas do gênero *Arabidopsis*, enquanto que, ácido salicílico é capaz de modificar a estrutura da comunidade associada à rizosfera de plantas do mesmo gênero (BADRI et al., 2012; LEBEIS et al., 2015).

Estima-se que os COVs representem aproximadamente 1% do total de metabólitos secundários liberados pelas raízes (LIU et al., 2019). O baixo peso molecular e a facilidade em se difundir pela porosidade do solo permite que os COVs desempenhem um papel complementar nas interações entre o solo e as raízes ativando defesas diretas e indiretas da planta. Por exemplo, os COVs emitidos pela conversão de glicosinolatos ou glicosídeos cianogênicos (como cianetos e isotiocianatos) podem servir como defesas diretas das plantas, pois são tóxicos para uma ampla gama de herbívoros e patógenos de solo (HOPKINS et al., 2009).

Contudo, um dos grupos mais intrigantes de metabólitos secundários de plantas e microrganismos são os terpenos, cuja biossíntese é governada por genes de terpeno sintase que podem gerar derivados voláteis, semivoláteis e não voláteis (CHENG et al., 2007). Os terpenos são apolares e voláteis, enquanto os terpenóides estão associados com o aumento da polaridade, ou seja, solubilidade em água, e assim menor volatilidade (AVALOS et al., 2022). De acordo com Avalos et al., (2022), a biossíntese de terpenóides segue três etapas, sendo, metabolismo primário, reação de ciclização e modificação oxidativa. O metabolismo primário consiste em produção de monômeros de terpeno. A etapa de reação de ciclização é catalisada pela enzima terpeno sintase permitindo que os monômeros de terpeno possam ser fundidos e formar oligômeros. Os terpenos de baixa funcionalidade produzidos nessa etapa podem ser classificados baseados no número de unidades monoméricas, por exemplo, por razões históricas compostos que surgem de uma unidade são denominados hemiterpenos, duas unidades compõem os monoterpenos, sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades), sesterterpenos (cinco unidades), triterpenos (seis unidades) e tetraterpenos (oito unidades). Biossinteticamente, os monoterpenos são compostos de duas unidades de isoprenos, o precursor das unidades de isoprenos em sistemas biológicos são os dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e seu isômero isopentenil pirofosfato (IPP) que podem ser formados a partir de acetil-CoA por intermédio do ácido mevalônico na via HMG-CoA redutase (DAVIS e CROTEAU, 2000). Por fim, na modificação oxidativa ocorre clivagem de grupos ou rearranjo esquelético nas enzimas de adaptação, modificando os terpenos à terpenoides. A biossíntese de terpenoides é frequentemente associada à bioatividade, como por exemplo, efeito antimicrobianos, estatização da integridade da membrada celular, alívio de estresse, fotoproteção, atração ou repulsão de outros microrganismos, promoção de crescimento e ativação ou indução de resistência contra patógenos (CHENG et al, 2007; AVALOS et al., 2022).

Considerando a ecologia química estabelecida na rede multitrófica entre a planta e o solo, denota-se que compreender os processos químicos envolvidos na comunicação entre as plantas e membros do microbioma da rizosfera, abre caminhos para compreender e manipular a complexa interação microrganismo-planta e todo o potencial biotecnológico associado a estas interações.

2. HIPÓTESE

Considerando que o processo de domesticação das plantas pode ter causado modificações na composição do microbioma da rizosfera deslocando comunidades de bactérias benéficas importantes para defesa da planta, a reintrodução de bactérias benéficas, recuperadas a partir de materiais crioulos, em materiais modernos de trigo e suscetíveis à doenças no sistema radicular, pode reestabelecer a proteção da planta por meio da atividade antagônica de bactérias benéficas na rizosfera contra a infecção pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*.

3. OBJETIVOS

Elucidar as alterações no microbioma e os mecanismos químicos envolvidos na proteção da planta durante a infecção da rizosfera por um fungo patogênico após a inoculação de bactérias antagônicas ao patógeno.

3.1 Objetivos específicos

- Identificar na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da EMBRAPA Meio Ambiente bactérias antagônicas ao patógeno *B. sorokiniana*, previamente isoladas a partir de materiais crioulos de trigo;
- Confirmar o efeito das bactérias potencialmente antagônicas (inoculantes) ao patógeno *B. Sorokiniana* em bioensaio;
- Acessar e avaliar a comunidade bacteriana da rizosfera de BRS Guamirim associada à supressão do patógeno *B. sorokiniana* na presença ou ausência dos inoculantes;
- Obter o genoma das bactérias antagônicas para minerar e prever o potencial de produção de metabólitos secundários que poderiam auxiliar na defesa contra o patógeno *B. sorokiniana*.
- Avaliar o perfil químico das bactérias antagônicas e correlacionar com as informações preditas no genoma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de estudo: genótipo de trigo BRS Guamirim

O cultivar convencional BRS Guamirim é comum nos biomas da mata atlântica e pampas, possui estatura baixa de aproximadamente 78 cm com ciclo super precoce sendo 75 dias para o espigamento e 125 dias para a maturação. Possui bom perfilhamento e a produtividade média é estimada em 7600 kg/ha (SCHEEREN et al., 2007). A cultivar de trigo BRS Guamirim foi desenvolvida pela Embrapa e resultou do cruzamento entre o genitor materno (Embrapa 27/Buck Nandu) e o genitor paterno PF 93159 (BR 23//CEP 19/PF 85490), realizado na Embrapa Trigo, em Passo Fundo, RS, em 1994. Para a produção desse genótipo foram observadas 8 gerações filiais, sendo que a seleção dos cruzamentos foi com base no tipo agrônomico de planta e na resistência às principais moléstias do trigo, por meio de inoculações artificiais, com o método genealógico (SCHEEREN et al., 2007).

BRS Guamirim está registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o número 20038. A semente genética da cultivar é de responsabilidade da Embrapa Trigo, a básica (S1) é da Embrapa Transferência de Tecnologia e a Certificada (C1) é da Fundação Pró-sementes de Apoio à Pesquisa (SCHEEREN et al., 2007).

Estudos sobre a infecção do patógenos fúngico de solo *B. sorokiniana* sobre variedades de trigos (crioulos e modernas) mostraram que o cultivar de trigo BRS Guamirim é inicialmente suscetível à infecção causada pelo fungo, porém, este genótipo de trigo responde à permanência do patógeno no solo se associando a taxa de bactérias do solo que são antagonistas ao fungo e causando a supressão da doença (COSTA et al., 2019, FARIA et. al., 2020). Por ser um genótipo que responde rápido aos sintomas da doença (sintomas foliares) e possui potencial de se associar a grupos benéficos, entender o processo da construção da rizosfera do cultivar BRS Guamirim pode nos ajudar a compreender como os grupos microbianos são acessados para mudar a conformação do microbioma que torna o solo com a planta de suscetível a supressivo à doença.

4.2 Seleção dos agentes antagonistas à doença causada por *B. Sorokiniana*

Para a realização do teste de inibição *in vitro*, foram selecionados três isolados bacterianos provenientes de genótipos de trigo crioulos cujo potencial na promoção de crescimento e antagonismo já foram previamente descritos (Tabela 1) (CARVALHO et al., 2018; ROSSMANN et al., 2020; GODOY, 2020).

Tabela 1 – Bactérias pré-selecionadas para o teste de inibição *in vitro*

Identificação	Código	Trigo de Origem
<i>Streptomyces</i> *	CMAA 1738	Karakilcik
<i>Paenibacillus</i> *	CMAA 1739	Iran
<i>Pseudomonas</i> *	CMAA1741	Iran

*Traços benéficos - Produtor de ácido indol acético; solubilizador de fósforo; fixador de nitrogênio. Fonte: Carvalho *et al.*, (2018) e Godoy *et al.*, (2020).

As bactérias utilizadas nesse ensaio correspondem às cepas CMAA 1738, CMAA 1739 e CMAA 1741, identificadas como *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp., e *Pseudomonas* sp., respectivamente (GODOY, 2020). As cepas foram descritas bioquimicamente por Carvalho *et al.* (2018) e confirmadas por Godoy (2020). O material foi então depositado na coleção CMAA por Godoy (2020) após estudar o potencial das cepas como bioinoculantes na promoção de crescimento em genótipos de trigo comercial (BRS Parrudo, BRS Reponte, BRS Marcante) e posteriormente resgatamos da coleção para este trabalho de biocontrole.

Por apresentarem características benéficas à agricultura, além de haver informações sobre o crescimento, desenvolvimento das colônias, e como visto por Godoy (2020), estabilidade como inoculante em variedades de trigo comercial, as três estirpes apresentadas acima foram novamente testadas no ensaio *in vitro* para antagonismo ao patógeno *Bipolaris sorokiniana*. Os ensaios de inibição foram baseados nos testes usados por Carvalho *et al.*, (2018) e serviram de critério para as decisões das etapas seguintes.

4.3 Teste de inibição *in Vitro*

Para o teste de inibição, os isolados bacterianos foram inoculados em meio GY e incubados em BOD a 28°C por 24 h e, o fungo *B. sorokiniana* incubado por 15 dias em meio BDA a 25°C. Os microrganismos foram repicados em BDA sob co-cultivo para verificar se haveria inibição. O teste de inibição foi feito em placa de Petri (Ø90 mm) contendo BDA. Os ensaios duraram 7 e 14 dias. As bactérias que apresentaram halo de inibição contra o fungo foram selecionadas para seguir em bioensaio.

4.4 Bioensaio

Para testar o efeito de inibição em bioensaio foi necessário conhecer o ciclo do trigo, o comportamento da doença causada pelo patógeno e o tempo de crescimento das estirpes para

calibração dos inóculos. Todos esses processos precisaram ser sincronizados: a maturação dos esporos de *B. sorokiniana* é de aproximadamente 15 dias, enquanto o tempo de crescimento das colônias de bactérias é em torno de 24 h (eg. *Paenibacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*) a 48h (eg. *Streptomyces sp.*). Os procedimentos para realizar o bioensaio serão descritos a seguir, e estão sumarizados na Figura 2.

4.4.1 Crescimento do fungo *B. sorokiniana* e quantificação de esporos

Culturas do fungo patogênico *B. sorokiniana* foram mantidas em BDA, por 15 dias para obtenção dos esporos. Os esporos foram obtidos por meio da raspagem da superfície das placas com solução Tween 80 (0,05%) e quantificadas em hemacitômetro (Câmara de *Neubauer*). Para a inoculação do bioensaio foram utilizadas soluções em água destilada com suspensão de 10^4 esporos mL^{-1} .

4.4.2 Quantificação de bactérias

Cada uma das cepas de bactéria foram repicadas isoladamente em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubadas à 25-28°C sob agitação de 150 rpm por 48 h. A mensuração do crescimento dos isolados foram feitas por espectrometria óptica, diluindo o meio com bactéria em solução salina (NaCl 0,8%), e posteriormente padronizando os inóculos na concentração de 10^8 UFC mL^{-1} ($D_{0550} = 0,1$).

4.4.3 Microbiolização das sementes

As sementes foram submetidas a desinfestação com álcool 70% por 1 min; hipoclorito de sódio 0,5% por 1 min; lavagem com água abundante. Esta etapa é uma assepsia superficial, pois caso haja algum patógeno na semente será neutralizado, podendo prevenir doenças tardias. Antes da semeadura, as suspensões bacterianas foram calibradas conforme descrito anteriormente (ver item 4.4.2) e microbiolizadas nas sementes, que ficaram expostas aos microrganismos em agitação por 1 h.

4.4.4 Preparo do solo

O solo foi coletado na área experimental 2 da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP) e peneirado de acordo com as informações técnicas da Embrapa Trigo (CUNHA et al.,

2014). A saturação por bases foi corrigida à 70%, indicação para cultivar de trigo não tolerante à acidez, conforme o boletim 100 do Instituto Agronômico de Campinas (MASCARENHAS, 1985). O solo corrigido foi mantido em pousio por 15 dias.

4.4.5 Montagem do bioensaio

Após o pousio, o solo foi distribuído em vasos de 300 mL e as sementes de BRS Guamirim plantadas. O tempo de crescimento até a primeira plântula foi de aproximadamente 7 dias, momento em que o fungo *B. sorokiniana* foi inoculado (1mL de solução de esporos por planta). O experimento foi montado conforme apresentado na Figura 2.

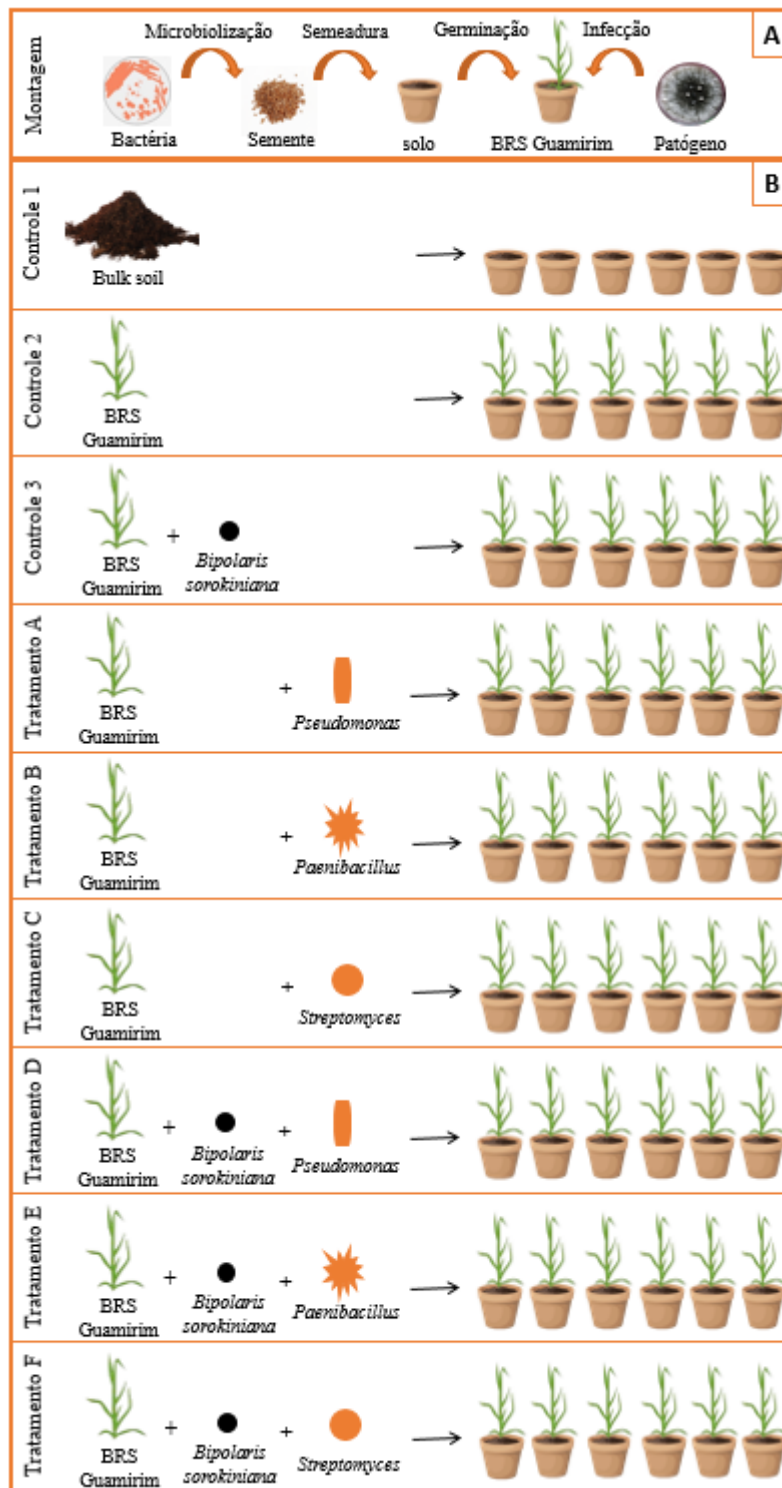


Figura 2 - Esquema experimental. (A) Processo de montagem do experimento, tratamentos inteiramente casualizados (n=6); (B) Descrição dos controles e dos tratamentos avaliados. As bactérias foram inoculadas nas sementes de trigo em todos os tratamentos exceto nos controles, o desenvolvimento do patógeno foi avaliado na presença e ausência de bactérias. O patógeno foi inoculado no sétimo dia da germinação. O bioensaio durou cinco semanas. C1: Controle neutro; C2: Controle positivo; C3: Controle negativo.

4.4.6 Avaliação de doença

Após quatro semanas da inoculação do patógeno, as plantas foram submetidas à avaliação do Índice de Severidade da Doença (ISD). Ainda nos vasos, os sintomas da doença das plantas foram ranqueados pelas injúrias observadas no coleóptilo do trigo. De acordo com Faria et al., (2020), o ISD pode ser calculado da seguinte forma (Fórmula 1)

Fórmula 1
$$ISD = \frac{(ncat1\% \times 1) + (ncat2\% \times 2) + (ncat3\% \times 3)}{3}$$

onde ISD = índice de severidade de doença; ncat1% = porcentagem de plantas encontradas na categoria 1; ncat2% = porcentagem de plantas na categoria 2; ncat3% = porcentagem de plantas encontradas na categoria 3 (ncat3); número de categorias = 3.

A proporção de raízes infectadas para cada sistema radicular estimada com base na fórmula acima foi então classificada em quatro categorias (Figura 3):

Categorias 0 = sem lesão;

Categoria 1 = lesão leve, leve lesão escura apenas na folha do cotilédone;

Categoria 2 = lesão moderada, lesões moderadas escuras ou avermelhadas no caule;

Categoria 3 = lesão severa, lesões escuras e severas no caule, acima da primeira folha e plantas mortas.

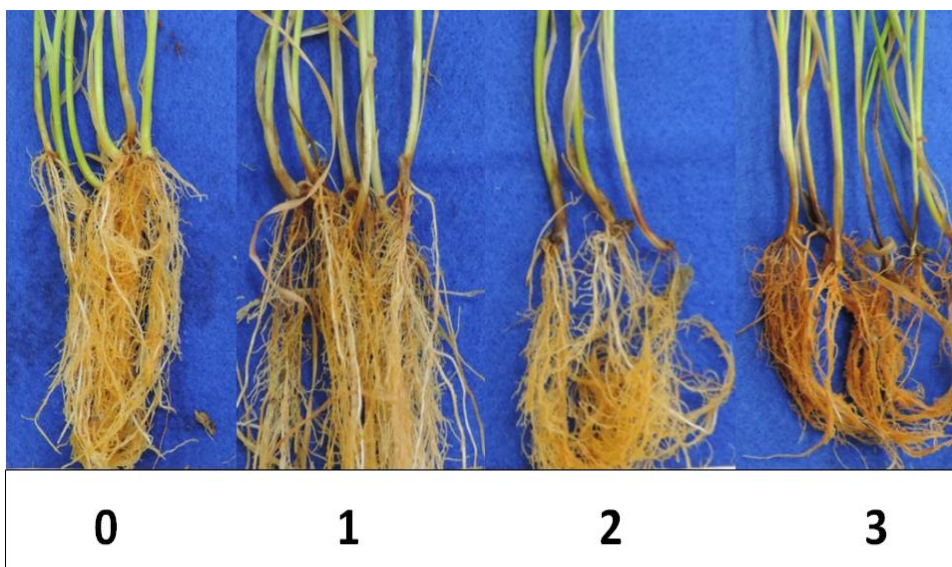


Figura 3 - Escala de categorização de nível de doença: Categoria 0, sem lesão; categoria 1, lesão leve, leve lesão escura apenas na folha do cotilédone; categoria 2, lesão moderada, lesões moderadas escuras ou avermelhadas no caule; categoria 3, lesão severa, lesões escuras e severas no caule, acima da primeira folha e plantas mortas.

4.4.7 Índice relativo de clorofila foliar

O índice relativo de clorofila foliar (índice SPAD) foi estimado de forma não destrutiva, utilizando o medidor de clorofila SPAD-502 (*Minolta Corp., Ramsey, NJ, USA*). Foram analisadas 5 folhas por vaso e usado para análise o valor médio por vaso.

4.4.8 Amostragem do solo rizosférico

As plantas foram removidas do vaso junto com o solo. O solo distante das raízes primárias foi cuidadosamente removido com as mãos. As raízes foram agitadas vigorosamente dentro de sacos autoclaváveis estéreis para a remoção do solo mais proximamente aderido as raízes, o solo rizosférico. O solo rizosférico foi transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer (-20°C) até o momento da extração do material genético total.

4.4.9 Altura e biomassa da planta

A altura das plantas foi medida utilizando uma régua ($\pm 0,5$ cm) da base do caule no solo até a maior folha bandeira. Foram medidas 5 plantas por vaso e usado para as análises o valor médio obtido.

Após a coleta do solo rizosférico, as folhas e caules foram removidas das raízes e lavadas. A parte aérea e as raízes foram pesadas, separadamente, em balança semi-analítica ($\pm 0,01$ g) para obter o valor da biomassa fresca da planta. Posteriormente, o material foi seco em estufa à 65°C durante 7 dias para estabelecer o peso seco.

4.5 Caracterização da comunidade bacteriana da rizosfera do trigo

4.5.1. Extração e purificação do DNA

O DNA genômico dos isolados antagonistas *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. e *Paenibacillus* sp. foi obtido com auxílio do kit *DNeasy Ultraclean Microbial kit* (*QIAGEN* catalog #12224-250), de acordo com as instruções do fabricante. Para as análises das comunidades bacterianas e fúngicas, o DNA das amostras de solo rizosférico foi extraído com o auxílio do kit *DNeasy PowerSoil® Kit* (*QIAGEN* catalog #12888-50), seguindo as instruções do fabricante. O grau de pureza do material foi estimado utilizando-se o *NanoDrop®* ND-2000 Spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA*), e a integridade do material foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X. As amostras de DNA foram purificadas com o auxílio do *DNeasy*

PowerClean Pro Cleanup® Kit (QIAGEN catalog #12997-50), de acordo com as instruções do fabricante, a fim de evitar qualquer tipo de interferência e melhorar a qualidade das etapas posteriores. Por fim, as concentrações de DNA foram estimadas com o fluorímetro QUBIT® 2.0 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA*).

4.5.2 Análises quantitativas do DNA genômico bacteriano e do patógeno

A análise quantitativa das amostras de DNA foi feita por meio de PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), utilizando os conjuntos de primers 926F e 1062R e CosA_F_519 e CosA_R_248, referentes a região 16S rRNA e ao gene específico do *Bipolaris sorokiniana*, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* para a quantificação total de bactérias e do patógenos nos bioensaios

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
16S rRNA	926F	AACTCAAAGGAATTGACGG	LANE, 1991
	1062R	CTCACRRCACGAGCTGAC	ALLEN et al., 2005
CosA	CosA_F_519	TCAAGCTGACCAAATCACCTTC	MATUSINSKY et al., 2010
(<i>B. sorokiniana</i>)	CosA_R_248	AATGTCGAGCTTGCCAAAGT	HORNE, 2015

As reações de qPCR referentes as comunidades bacterianas na região 16S tiveram volume final em 10 µL, utilizando: 5 µL do *SYBR Green ROX* no qPCR (*Thermo Fisher Scientific, Middletown, VA, USA*), 1 µL de cada primer (5 µM), 1 µL de DNA (padronizado em 10 ng.µL⁻¹) e 2 µL de água ultrapura (*Milli-Q*) autoclavada. Para cada gene, foi construída uma curva padrão por meio de diluições seriadas (1:10) de uma quantidade conhecida de cada gene alvo. Os padrões foram obtidos pela técnica de PCR tradicional, utilizando DNA padrão a partir de cepas provenientes da coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente, sendo o padrão para 16S proveniente das bactérias *Streptomyces sp.* (CMAA 1738), *Paenibacillus sp.* (MMAA 1739), *Pseudomonas sp.* (CMAA 1741) e o padrão do *CosA* advindo do fungo *Bipolaris sorokiniana* (BS 0208). A curva padrão foi feita em triplicata para a minimização de erros, totalizando, no mínimo, cinco pontos para curva. Os experimentos de quantificação ocorreram no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR - CNPEM/MCTIC), na instalação aberta de Sequenciamento de Alta Performance (NGS).

4.5.3 Sequenciamento metataxonômico do 16S rRNA e ITS1

As amostras de DNA foram liofilizadas e enviadas para construção das bibliotecas e sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA e ITS, utilizando a plataforma Miseq-Illumina. O preparo para envio foi realizado de acordo com especificações da *Argonne National Laboratory* (Lemont, IL, EUA), empresa responsável pelo serviço de sequenciamento. Os primers utilizados na reação de amplificação do gene 16S rRNA, o qual delimita a região V4 da subunidade 16S do RNA ribossomal de bactéria (APPRILL et al., 2015; PARADA et al., 2015), e para os ITS1, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – *Primers* usados para o sequenciamento de amplicons

Gene	Primer	Sequencia (5'-3')	Referência
16S rRNA	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	APPRILL et al., 2015;
	806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	PARADA et al., 2015
ITS1	ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	WHITE et al., 1990
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	

4.5.4 Montagem do genoma dos isolados bacterianos

Os dados dos genomas dos isolados bacterianos foram analisados utilizando a plataforma aberta Galaxy, seguindo as etapas de filtragem e controle de qualidade (fastp) (CHEN et al., 2018), alinhamento (Bowtie2) (LANGMEAD et al., 2009; LANGMEAD e SALZBERG, 2012) e montagem de genoma (SPAdes) (BANKEVICH et al., 2012), seguida da análise de qualidade da montagem pela ferramenta Quast (GUREVICH et al., 2013). As anotações dos genomas ocorreram por meio da ferramenta Prokka (CUCCURU et al., 2014; SEEMANN, 2014). Considerando a classificação taxonômica, utilizou-se o conjunto de ferramentas e base de dados Genome Taxonomy (GTDB-Tk) (CHAUMEIL et al., 2019), seguido da análise de cluster gênicos pelo AntiSMash (BLIN et al., 2021). A árvore foi implementada no KBase usando o aplicativo “insert set of genome into species tree”, sendo executado no RPS-BLAST v0.3.3 com 49 genes marcadores conservados referentes aos agrupamentos de grupos ortólogos (COGs) do NCBI (<https://github.com/kbaseapps/SpeciesTreeBuilder/tree/master/data/cogs>) em contraste com um genoma de referência para cada gênero.

Os alinhamentos RPS-BLAST de genes marcadores do genoma preliminar, intimamente relacionados com o banco de dados, foram concatenados e a árvore foi então construída. A árvore de probabilidade foi construída usando FastTree v2.1.10 com

configurações padrão (10), com base no alinhamento de sequências múltiplas concatenadas de genes marcadores em todos os genomas.

4.5.4 Análise de metabólitos

Esta etapa de análise química abordando voláteis foi baseada na metodologia de Terra *et al.*, (2020). A metodologia consistiu em capturar voláteis a partir de culturas cultivadas em placas de Petri de 90mm postas dentro de frasco hermético com tampa adaptada com septo. O septo foi perfurado por uma seringa SPME acoplada com fibra DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane), responsável pela absorção dos compostos químicos voláteis produzidos pelos microrganismos. A fibra foi analisada em GC-MS (Figura 4).

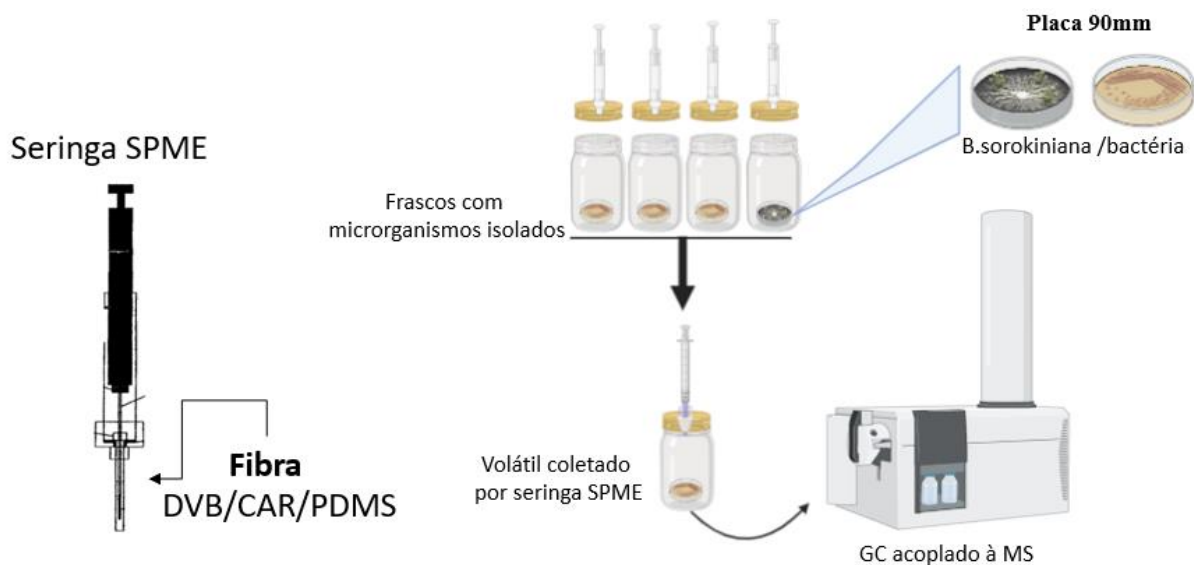


Figura 4 – Frascos herméticos adaptados com septos para coleta de voláteis. Placas com microrganismos cultivados por 7 dias foram abertas dentro dos frascos e em seguida fechados por 35 minutos para acumular os compostos voláteis. Após o tempo de fechamento, a fibra DVB/CAR/PDMS foi exposta dentro do frasco por 15 minutos. A fibra então foi removida do frasco e inserida no GC-MS onde os compostos da fibra foram dessorvidos e detectados no equipamento.

4.5.4.1 Cultivo de microrganismos

Os isolados de fungo e bactérias foram fornecidos pela Coleção CMAA. O fungo *Bipolaris sorokiniana* (BS 0208) foi ativado no meio BDA em placa de 60mm. A borda externa da cultura, com o crescimento mais recente da colônia, foi repicada no centro de placa de 90mm contendo meio BDA. Os fungos foram mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C em B.O.D durante seu crescimento.

As bactérias *Streptomyces sp.* (CMAA 1738), *Paenibacillus sp.* (CMAA 1739) e *Pseudomonas sp.* (CMAA 1741) foram ativadas no meio GY em placa de 60 mm. A colônia isolada mais fidedigna foi repicada em placa de 90 mm contendo meio BDA. As bactérias foram mantidas em temperatura de 25 ± 2 °C em B.O.D durante o crescimento. As amostras em co-cultivo foram preparadas com inoculação de 10 µL de suspensão de bactérias em 4 pontos da placa enquanto um disco de fungo foi ajustado no meio da placa. As bactérias não foram espalhadas pela placa em nenhum tratamento para evitar discrepância de biomassa.

4.5.4.2 Análise de voláteis

4.5.4.2.1 Headspace SPME

Os frascos herméticos (volume 2280 mL) foram higienizados em autoclave e expostos a raios UV por 20 min. Dentro da câmara de fluxo laminar, as placas de Petri com culturas já desenvolvidas foram abertas e colocadas dentro dos frascos herméticos. Os frascos foram selados com as tampas adaptadas com septos. Após 10 min, os compostos voláteis foram absorvidos pelo polímero metilado polidimetilsiloxano que reveste a fibra DVB/CAR/PDMS acoplada à seringa SPME. A fibra foi mantida dentro do frasco por 45 min para que ocorresse absorção dos compostos químicos. Frascos contendo placas de BDA sem inóculos foram usadas como controle do ensaio.

4.5.4.2.2 Parâmetros cromatográficos

Os compostos voláteis foram analisados usando um GC (Agilent Technologies, modelo 7890B) acoplado a um sistema MS (Detector seletivo de massa Agilent Technologies 5977B), utilizando uma coluna capilar HP-5MSUI (Agilent, 30 m de comprimento \times 0,25 mm de diâmetro interno \times 0,25 µm de espessura da fase estacionária). No GC-MS a detecção foi feita usando uma energia de ionização de 70 eV no intervalo de 50 a 550 a.m.u. de faixa de

massa. A temperatura da coluna foi aumentada de 40°C para 250°C no programa de temperatura: começando em 40°C com um tempo de espera de 1 min, para subsequentemente ser aumentado para 150°C (5°C min⁻¹) com um tempo de espera de 1 min. Finalmente, a temperatura foi aumentada para 250°C (10 °C min⁻¹) com um tempo de espera de 1 min e um tempo total de execução de 35 min. A temperatura do injetor foi configurada à 250°C em modo *splitless*. Estas alterações de temperatura dentro da coluna são necessárias para a separação dos compostos químicos que serão lidos pelo detector. Recomenda-se configurar a temperatura da fonte de íons à 280°C e a temperatura da interface à 250°C. O fluxo foi de 1,2 mL por minuto. O gás hélio foi usado como carreador de elétrons. A deconvolução do cromatograma foi feita pelo *MassHunter*, que opera no software *Unknowns Analysis v. 10.0* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA). Os VOCs foram identificados por comparação dos espectros experimentais da *NIST Tandem Mass Spectral Library v. 2.3* (NIST, Washington, DC, EUA).

4.5.4.2.3 Roteiro do ensaio de análises químicas

O ensaio foi conduzido em triplicata com placas contendo: (i) o fungo *B. sorokiniana*; (ii) o isolado *Pseudomonas sp.*; (iii) o isolado *Paenibacillus sp.*; (iv) o isolado *Streptomyces sp.*; (v) co-cultivo de fungo *B. sorokiniana* e *Pseudomonas sp.*; (vi) co-cultivo de fungo *B. sorokiniana* e *Paenibacillus sp.*; (vii) co-cultivo de fungo *B. sorokiniana* e *Streptomyces sp.* e; (viii) placas do meio BDA sem inóculo (controle). As amostras utilizadas foram destrutivas, após análise, a placa foi descartada. Foram feitas 25 análises, sendo que para cada análise foram utilizadas placas com inóculo maturado em 7 dias.

4.5.4.3. Análise de não-voláteis

4.5.4.3.1 Preparo da amostra

Foram preparados 7 tratamentos e 1 controle para analisar os compostos químicos produzidos pelos microrganismos isolados e em co-cultivo (Figura 5). Amostras do meio de cultura contendo o halo de inibição, formado durante o co-cultivo *in vitro* entre *B. Sorokiniana* e os isolados bacterianos testados foram coletadas para análise (Figura 6). Esta região de inibição pode conter exsudados liberados tanto pela bactéria quanto pelo fungo. Para analisar os compostos exsudados, o halo de inibição formado entre as culturas foi recortado e coletado. A amostra foi extraída por solvente orgânico e analisada por

cromatografia líquida (Figura 5 e 6) (FRITZ & MACKA, 2000). A escolha do solvente de eluição é um parâmetro relacionado com a polaridade da substância amostrada. Os solventes de extração escolhidos foram acetato de etila para extração de moléculas polares e diclorometano para moléculas apolares. Para explorar o perfil dos inoculantes e seus compostos exsudatos, o isolado bacteriano também foi cultivado em meio de cultura à base de aveia (ISP-3) e meio de cultura à base de soja (TSB), as etapas para o preparo da amostra estão resumidas na extração da amostra, concentrações e ressuspensão em solvente orgânico.

4.5.4.3.2 Extração de metabólitos polares e análise dos análitos

As amostras foram analisadas em UPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, Waters™). O UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa com detector Q-ToF (Micromass, Waters™). A fase móvel **A** foi composta por solução aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico, e a fase móvel **B** por acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas com uma vazão de 0,45 mL min⁻¹ seguindo o gradiente linear: 0 a 3 min, 5% de B; 3 a 20 min, 5% de B a 70% de B; 20 a 25 min 70% de B a 100% de B; 25 a 30 min, 100% de B. Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados foram: VCap 3000 V; tensão do fragmentador a 150 V; OUT 1RF Vpp a 750 V; temperatura do gás a 290°C; temperatura do gás de revestimento a 350°C; gás de secagem a 12 L min⁻¹. Os espectros de massa foram ajustados no modo de perfil e o intervalo de aquisição foi de 50 - 1700 *m/z* (SWENSON & NORTHEN, 2019).



Figura 5 – Processo de preparo da amostra a) Controle (BDA); b) Fungo *B. sorokiniana*; c) bactéria *Paenibacillus* sp.; d) bactéria *Streptomyces* sp.; e) bactéria *Pseudomonas* sp.; f) co-cultivo de *Paenibacillus* sp. com *B. sorokiniana*; g) co-cultivo de *Streptomyces* sp. com *B. sorokiniana*; h) co-cultivo de *Pseudomonas* sp. com *B. sorokiniana* i) bactérias em meio líquido; foram testados os meios BD, ISP-3 e TSB. Separação sólido-líquido: Para extração dos compostos contidos no ágar, o meio de cultura foi cortado para aumentar a superfície de contato e exposto a 90mL de solvente orgânico. As amostras foram filtradas, expostas em ultrassom e as massas obtidas foram pesadas após rotovaporar. Separação líquido-líquido: O meio líquido passou pela mesma etapa de filtragem. Os extratos obtidos tanto do meio líquido quanto do meio sólido tiveram a concentração calibrada para 2mg/mL antes de serem injetados no UPLC-MS.

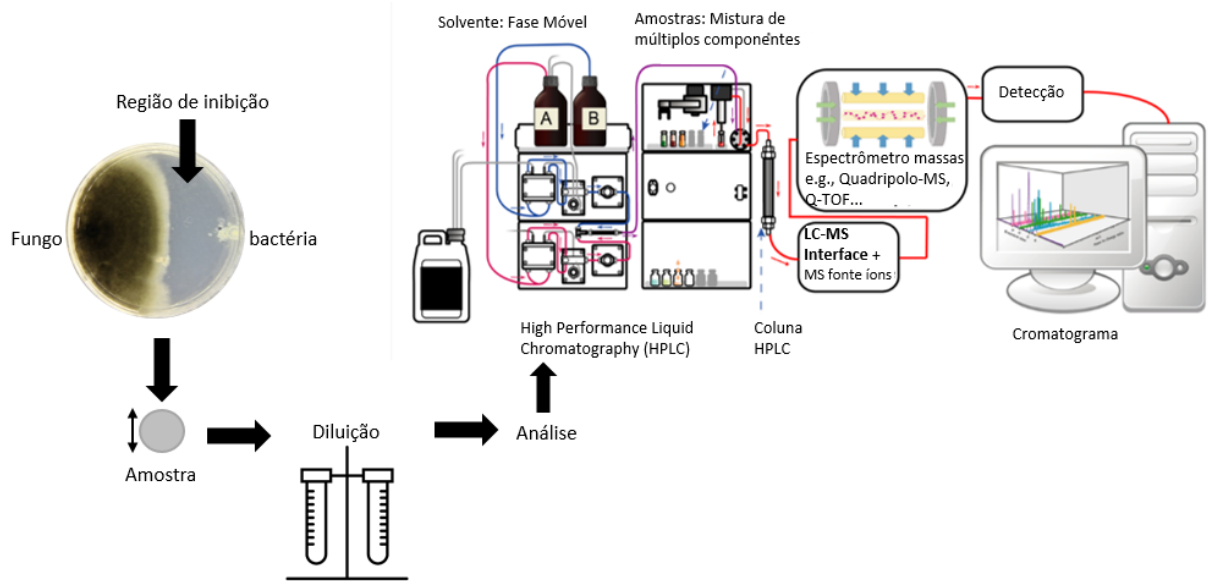


Figura 6 - Etapa de análise no UPLC acoplado a um espectrômetro de massas. A amostra calibrada em 2mg/mL foi injetada no UPLC-MS. A detecção da massa foi feita pelo detector Q-TOF e os dados obtidos foram processados pelo software Masslynx.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.3.1 Análise do bioensaio

Para analisar o bioensaio, os efeitos dos inoculantes nas plantas e o ISD entre os tratamentos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) após a verificação dos pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Barlett). Para a verificação da existência de diferenças significativas o teste de comparação de médias *Tukey* foi aplicado. As análises estatísticas e gráficos foram realizadas através do software R, na interface RStudio, utilizando os pacotes *ExpDes.pt* (FERREIRA *et al.*, 2013) *ggplot2* (WICKHAM *et al.*, 2016) e *multcomp* (HOTHORN *et al.*, 2008).

5.3.2 Análise do microbioma

Considerando as análises de metataxonomia do rRNA16S, região ITS e a complexidade dos dados de microbioma, o fluxograma analítico incluiu análises de alfa-diversidade e estimativa riqueza de cada tratamento. As sequências de amplicons dos genes 16S e ITS foram processadas usando o pipeline Dada2 (Callahan *et al.* 2016), seguido de atribuição de taxonomia usando o banco de dados Silva e UNITE, respectivamente (Quast *et al.* 2012; Nilsson *et al.* 2018 ; Kõljalg *et al.* 2020). Além disso, foram realizadas análises exploratórias de ordenação, como a análise PCoA (Análise de Coordenadas Principais / Escalonamento Multidimensional) para entender qual o grau de semelhança das unidades amostrais de acordo com a composição/abundância de espécies. Esta análise baseia-se em dados de dissimilaridade, em relação à abundância (Bray-Curtis) ou distâncias filogenéticas (Unifrac) (LEGENDRE *et al.*, 2005), o que permite explorar os dados de beta-diversidade. A α -diversidade foi analisada considerando os índices de Chao1 e Shannon, enquanto a β -diversidade foi aplicada o método de distância de Bray-Curtis e a Análise Principal de Coordenadas (PCoA) para analisar a matriz de proximidade entre os tratamentos.

5.3.3 Processamento dos dados de Cromatografia Gasosa (GC-MS)

O processamento dos dados gerados por cromatografia gasosa (GC-MS) foram feitos através do software MS-Dial. O software foi lançado como um programa universal para metabolômica que suporta vários instrumentos (eg. GC-MS) (LAI *et al.*, 2018). Nos equipamentos da Agilent Technologies, os dados precisam ser convertidos para o formato AIA através da ferramenta CHEMSTATION, e então, exportados para a plataforma MS-DIAL.

Os dados gerados por cromatografia mostram o perfil químico produzido pelos microrganismos, como se fossem impressões digitais. Este dados podem ser organizados em formato de matriz $X(i \times j)$, onde cada repetição (i) representa uma amostra e seu perfil químico (j). É feita uma matriz X para cada amostra e para os controles. As matrizes são submetidas ao processamento pelo software *MatLab R2016a* (The MatWorks, Co. Natick, MA, EUA). A Ferramenta *PLS_Toolbox versão 8.2 (Eigenvector, CA)*, acoplada ao software MatLab, foi utilizado para o pré-processamento dos dados. Foi feito uma ANOVA para decompor a influência das classes. A matriz foi decomposta em média geral, matriz de contribuição e matriz de tempo. As matrizes reduzidas foram somadas com o resíduo. A análise PLS-DA (análise discriminante supervisionada) tem a finalidade de testar se o tratamento indicado difere dos demais. A supervisão em questão está sobre prever as amostras que estão em co-cultivo e buscar através do vetor de regressão qual composto aumenta significativamente quando em co-cultivo. O vetor de regressão mostra quais comprimentos cromatográficos variados foram mais relevantes e o tempos de retenções. As porções processadas dos dados gerados pelo cromatograma são interpretadas sem ruídos, a remoção dos ruídos é feita de forma arbitrária visando a estabilidade dos picos. A correção da linha de base foi feita pelo algoritmo “mínimos quadrados ponderados automáticos”. Os alinhamentos do cromatograma são feitos usando o algoritmo de alinhamento de pico *PLS-Toolbox (slack = 5)* e, por último, a matriz X é dimensionada em colunas pelo método Pareto. Os dados são trabalhados no intervalo de confiança de 95% (GEURTS *et al.*, 2017). As análises de exploração foram feitas através de PCA e Boxplot por meio do software MSDial versão 4.80 (UC, Davis). Os espectros de fragmentação de massa e os tempos de retenção relevantes (RT) foram correlacionados com a biblioteca NIST usando o software UNKNOWN (Agilent Technologies).

5.3.4 Processamento dos dados de Cromatografia Líquida (UPLC-MS)

As técnicas de espectrometria de massa são adequadas para caracterização compostos naturais, no entanto há necessidade premente de uma infraestrutura para permitir o compartilhamento e a curadoria de dados (WANG *et al.*, 2016). Por isso, os dados obtidos por UPLC-MS (Micromass, Waters™) foram analisados na plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) para correlacionar com a biblioteca de dados da própria plataforma. A abordagem usando redes moleculares tornaram-se chave para visualizar e anotar o espaço químico em dados de espectrometria de massa não direcionados (NOTHIAS

et al., 2020). A complementação da análise foi feita pela ferramenta *Feature-based molecular networking* (FBMN), utilizada para análises na infraestrutura GNPS que se baseia em detectar e alinhar recursos cromatográficos (NOTHIAS et al., 2020).

Os clusters de genes de metabólitos secundários putativos foram identificados usando antiSMASH, sendo a busca direcionada por estes compostos preditos no genoma realizada usando o software Masslynxs (Waters™).

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação de controle biológico

6.1.1 Teste de inibição *in vitro*

O teste de inibição *in vitro* foi feito para confirmar a capacidade das cepas isoladas em inibir o crescimento do fungo *Bipolaris sorokiniana* co-cultivadas em meio BDA (Figura 7).

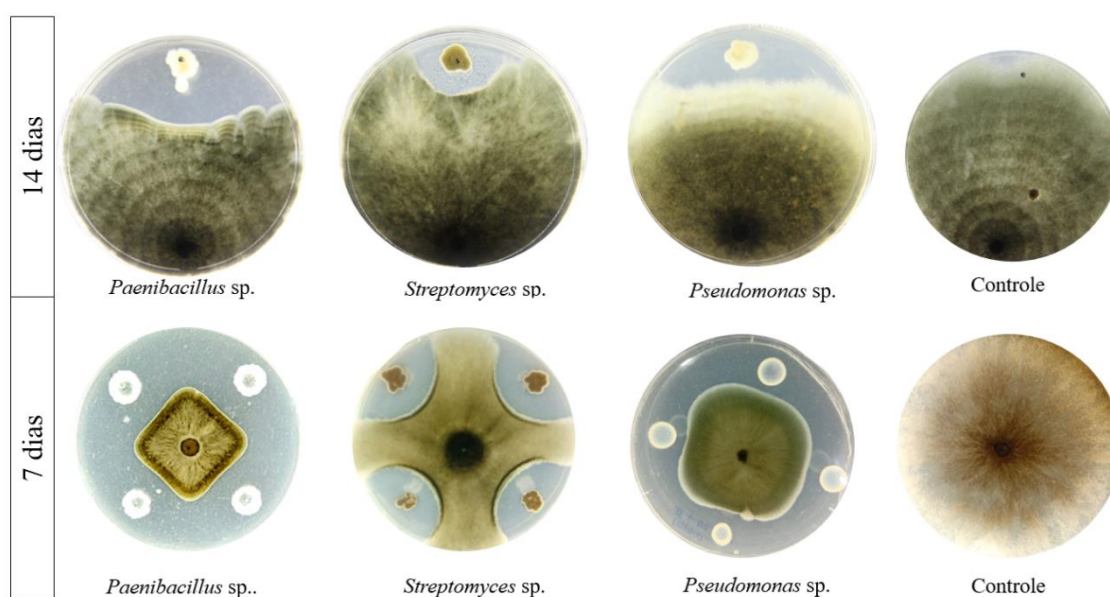


Figura 7 - Avaliação da atividade antagonística dos isolados bacterianos contra o fungo *Bipolaris sorokiniana*. Houve formação de halo de inibição nos tratamentos em co-cultivo devido efeito de antibiose

As cepas de *Paenibacillus sp.*, *Streptomyces sp.* e *Pseudomonas sp.*, demonstraram capacidade de inibir o crescimento do fungo *Bipolaris sorokiniana*. Portanto, todas as cepas avaliadas foram consideradas aptas para seguir experimento em bioensaio.

6.1.2 Bioensaio 1 – Ensaio piloto para estabelecimento da metodologia de avaliação de sintomas de doença

A avaliação do desenvolvimento do genótipo de trigo e da doença foi realizada por meio do bioensaio. Após quatro semanas da germinação, as plantas atingiram o estágio de avaliação (Figura 8A). As plantas estavam em estágio de início de emborrachamento (Estádio entre 6-7 na escala Feeks, SCHEEREN et al., 2015; GODOY, 2020). Nessa etapa do crescimento, as plantas inoculadas com o patógeno já apresentaram sintomas da doença com

diferentes níveis de lesões na estrutura do coleóptilo (Figura 8B). Os sintomas da doença foram mensurados pelo ISD e os resultados estão apresentados na Figura 9.

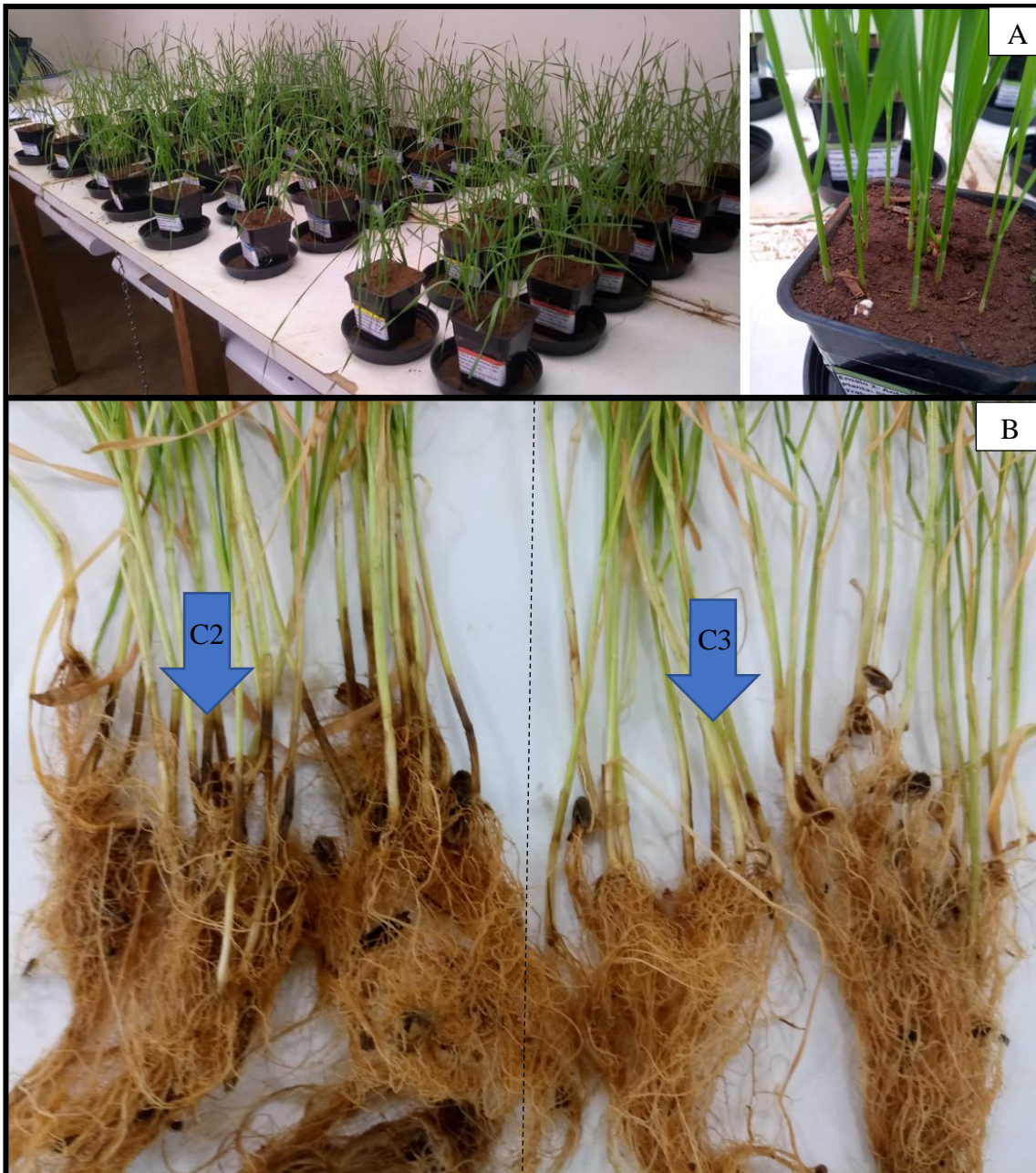


Figura 8 – Sintomas da doença. A) Os vasos dos diferentes tratamentos foram posicionados de forma randômica (desenho experimental inteiramente casualizado); B) lado esquerdo C2 (controle com patógeno), lado direito C3 (planta sem patógeno). As lesões causadas pela doença são visíveis na estrutura do coleóptilo da planta (seta azul).

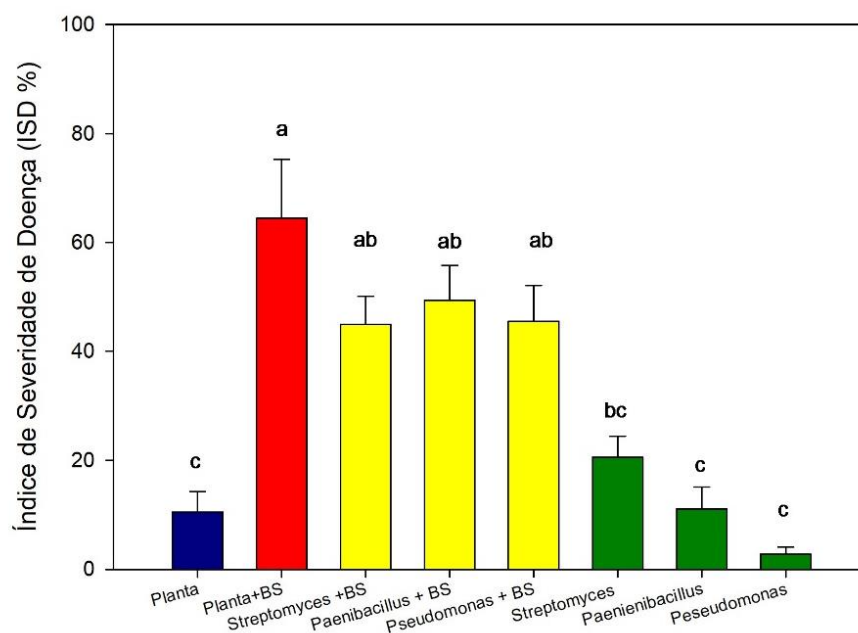


Figura 9 - Índice de Severidade de Doença (ISD) causado pelo patógeno *B. sorokiniana* (BS) em plantas de trigo inoculadas com bactérias benéficas na presença ou ausência de patógeno fúngico. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

O tratamento “Planta + BS” representa nosso controle negativo, nesse tratamento foi inoculado patógeno para se desenvolver na planta. O índice de severidade da doença foi calculado, nosso controle negativo apresentou cerca de 64% de ISD, enquanto os tratamentos que tiveram as sementes microbiolizadas com antagonistas (Streptomyces + BS, Paenibacillus + BS e Pseudomonas + BS) apresentaram em média 44% de ISD. Isso demonstra menor severidade de doença nas plantas com bactérias inoculadas na semente do trigo, todavia, este efeito não foi estatisticamente significativo. Nota-se também que, apesar de não ter sido inoculado patógeno no tratamento “Planta” (controle positivo), a planta manifestou a doença. Esse resultado já era esperado, uma vez que *B. sorokiniana* é um patógeno residente do solo.

Embora os isolados bacterianos tenham sido triados sobre traços benéficos para promoção de crescimento (GODOY, 2020), não foi observado ganho significativo de biomassa no genótipo BRS Guamirim durante o tempo observado (Figura 10).

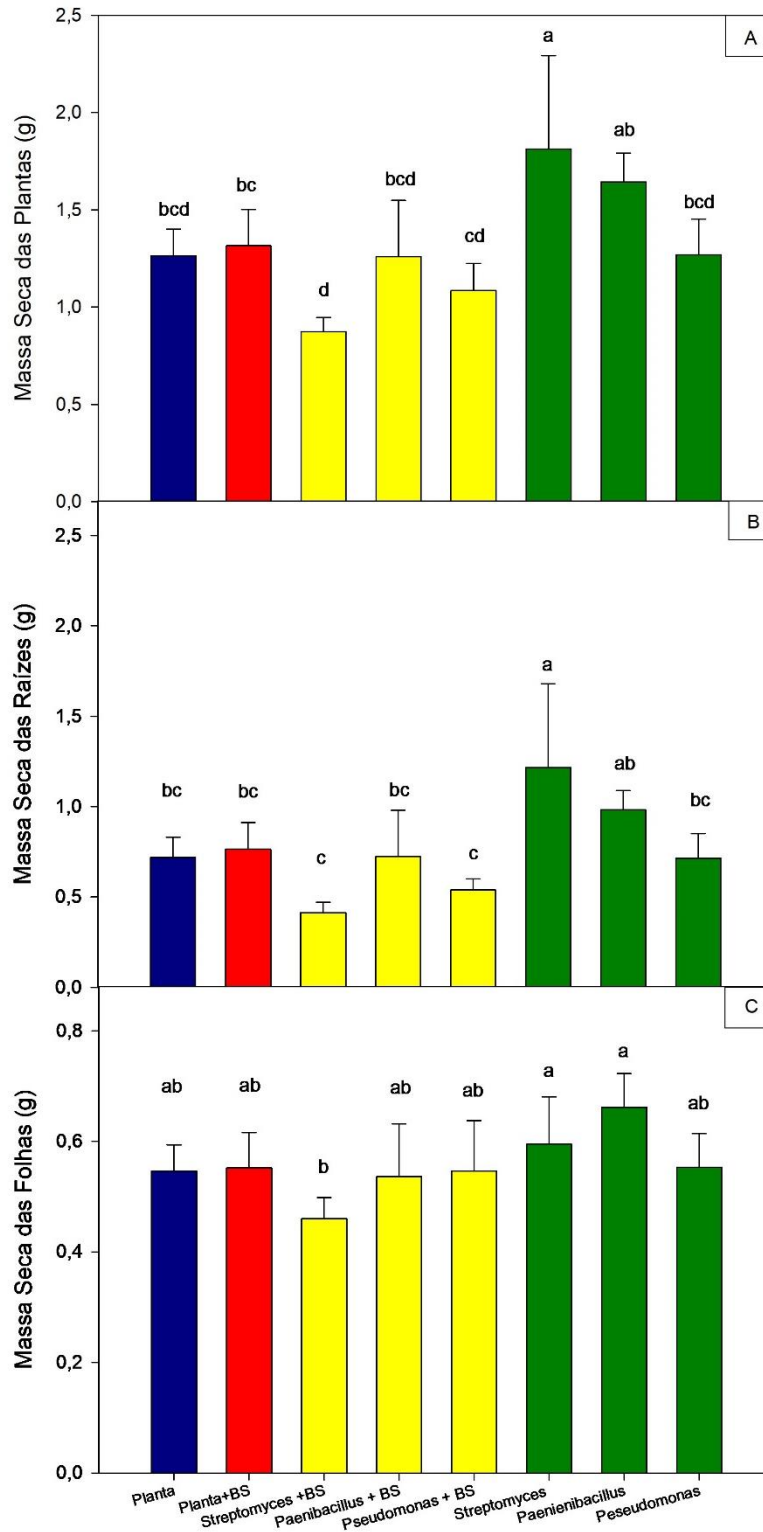


Figura 10 - Efeito do tratamento na biomassa seca da planta. (A) peso da biomassa seca total das plantas; (B) peso da biomassa seca das raízes das plantas; (C) peso da biomassa seca das folhas e caules das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

O melhor resultado para ganho de biomassa foi observado no tratamento com *Streptomyces* sp. (sem adição de patógeno). Todavia, esse efeito não é observado no tratamento “*Streptomyces* + BS” que apresenta patógeno e semente microbiolizada com antagonista.

Não foi observada nenhuma diferença entre os resultados dos tratamentos em relação à altura e o índice de clorofila foliar das plantas avaliadas (Figura 11).

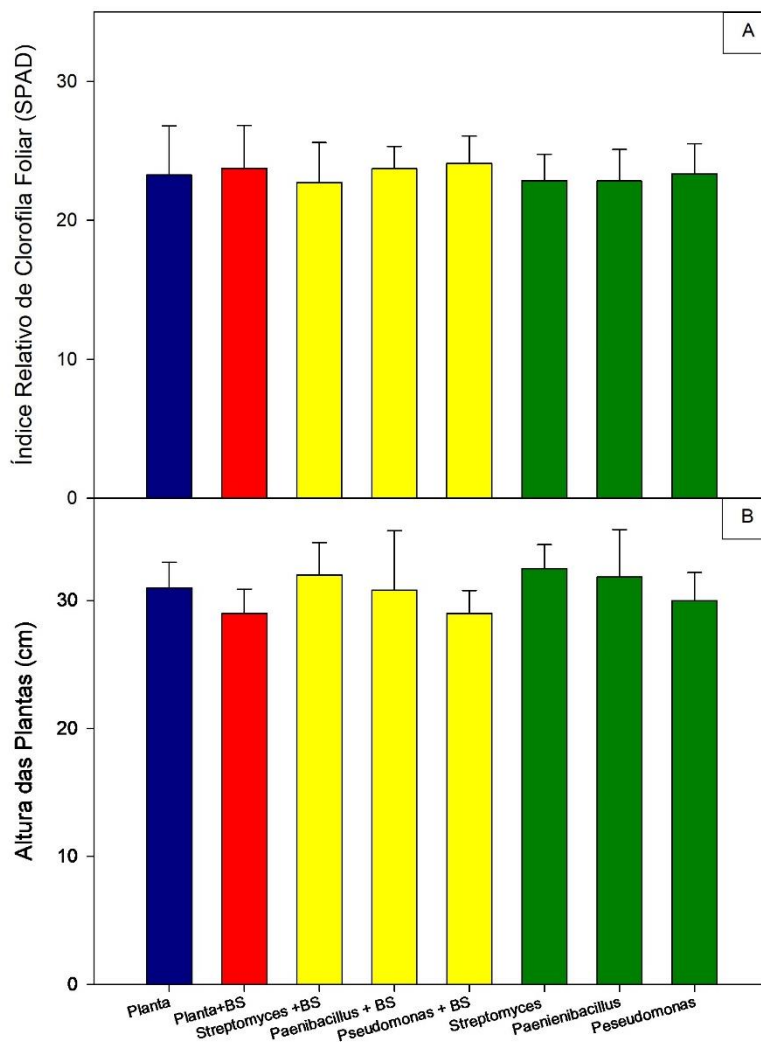


Figura 11 - Efeitos do tratamento na altura e SPAD das plantas. (A) clorofila medida em SPAD das plantas; (B) altura das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Não gerou agrupamento pelo teste Tukey. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

Nesse bioensaio, ao decorrer de sete dias, não obtivemos a quantidade de esporos estimada para calibrar a suspensão de patógeno. Em virtude disso, a planta foi infectada com o patógeno 14 dias depois da sementeira, diferentemente da metodologia inicialmente proposta. Todavia, os dados foram anotados e a metodologia ajustada para o ensaio seguinte (Bioensaio 2).

6.1.3 Bioensaio 2 – Avaliação de sintomas de doença

Após avaliação do bioensaio piloto e dos ajustes na metodologia proposta, um novo bioensaio foi montado e avaliado. A doença teve severidade alta em todos os tratamentos que o patógeno foi inoculado (variando de 50 a 62%), enquanto nos tratamentos com bactérias, sem inoculação do patógeno, a incidência da doença permaneceu entre 7 e 10%. O tratamento “Plant + BS” (controle negativo) apresentou índice de 93% na avaliação da severidade da doença. Os tratamentos cujas sementes foram microbiolizadas com *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. antes do plantio, apresentaram ISD de 50%, 57% e 62%, respectivamente (Figura 12).

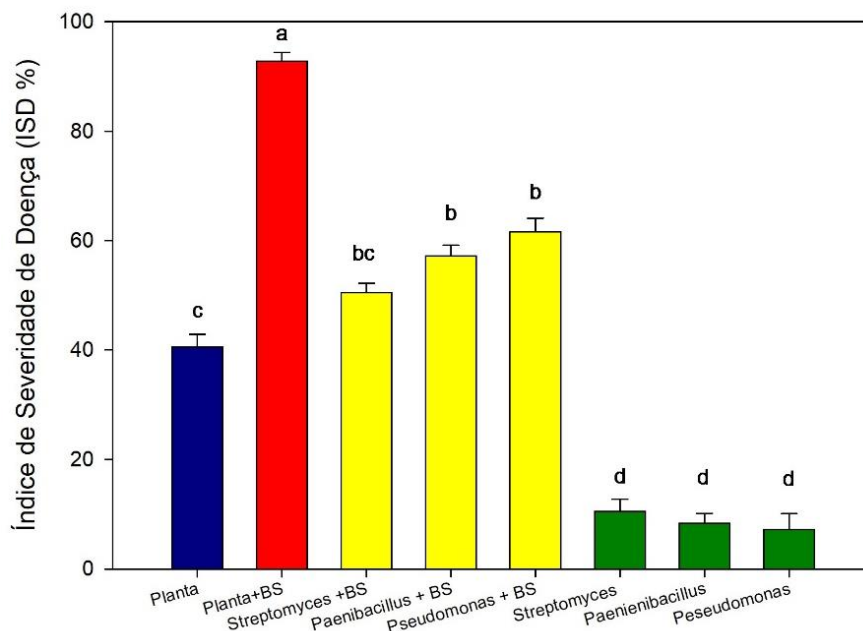


Figura 12- Índice de Severidade de Doença (ISD) causado pelo patógeno *B. sorokiniana* (BS) em plantas de trigo inoculadas com bactérias benéficas na presença ou ausência de patógeno fúngico. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

Embora a doença tenha se manifestado de forma severa nos tratamentos com a presença do patógeno, os tratamentos com sementes tratadas com bactérias antagonistas obtiveram ISD similar ao apresentado pelo controle positivo, conduzido apenas com trigo (tratamento “Planta”) (Figura 12). Porém, a despeito da presença natural do patógeno no solo (patógeno residente), as sementes microbiolizadas com as bactérias antagonistas apresentaram ISD menor que 10% (Figura 12). Esse resultado, possivelmente, está relacionado a defesa das bactérias antagonistas quando em detrimento às concentrações menores do patógeno.

Em relação aos dados de biomassa, nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 13A e B). Todavia, é possível observar uma tendência de valores maiores de biomassa seca total e biomassa seca da raiz nos tratamentos cujas sementes de trigo foram microbiolizadas com as bactérias antagonistas e não infectados pelo patógeno *B. sorokiniana* (*Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp. e *Pseudomonas* sp.) (Figura 13A e B). Isso demonstra que sem a presença do patógeno, o inoculante pode atuar promovendo crescimento.

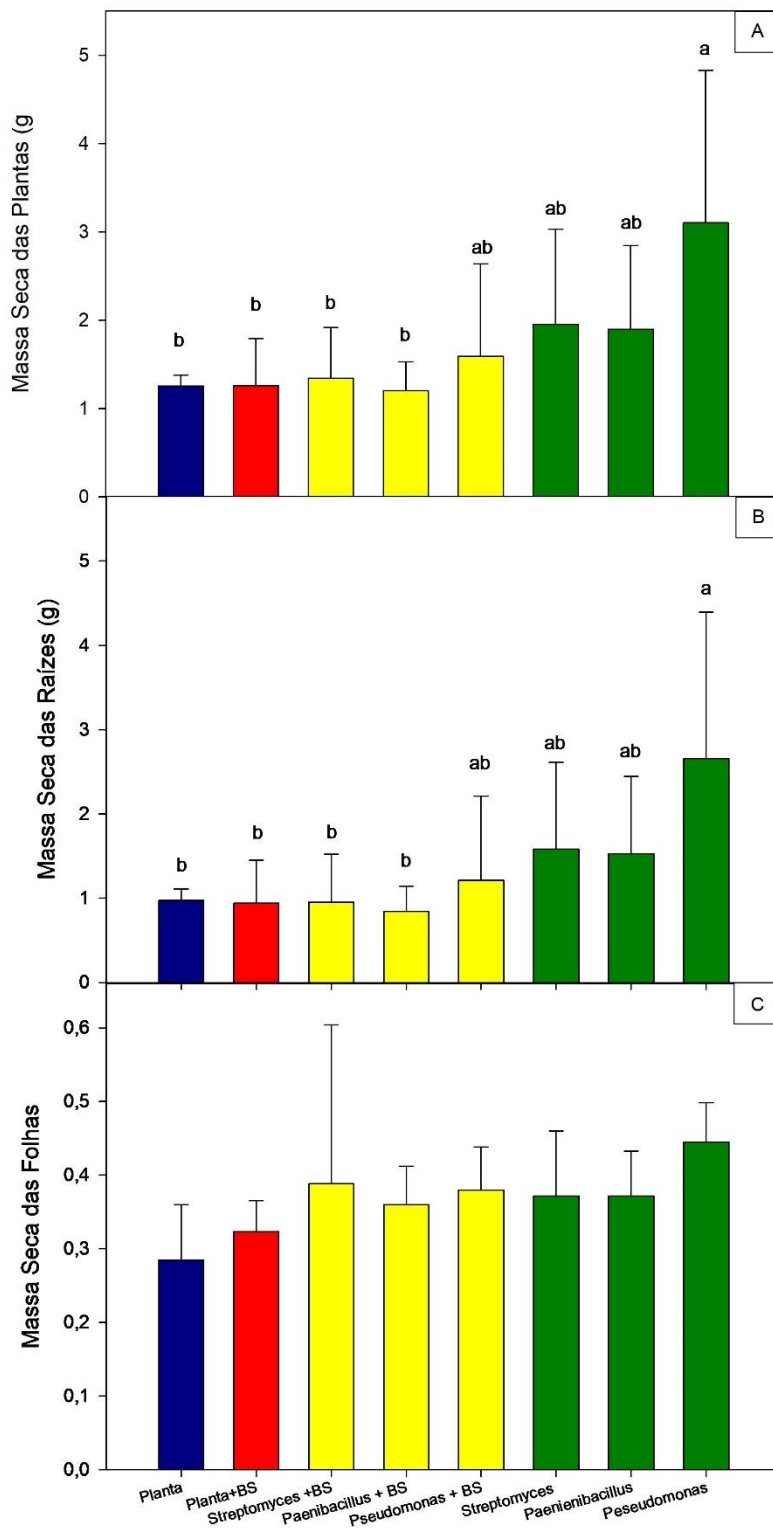


Figura 13 - Efeito do tratamento na biomassa seca da planta. (A) peso da biomassa seca total das plantas; (B) peso da biomassa seca das raízes das plantas; (C) peso da biomassa seca das folhas e caules das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (C) Não gerou agrupamento pelo teste Tukey. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

Os maiores valores de biomassa fresca da parte área da planta foram observados nos tratamentos microbiolizados (Figura 14), apresentando padrão similar ao observado na biomassa seca (Figura 13). Em relação à altura e ao teor de clorofila das plantas, não foi verificado diferença significativa entre os tratamentos co-inoculados (Figura 15 e 16).

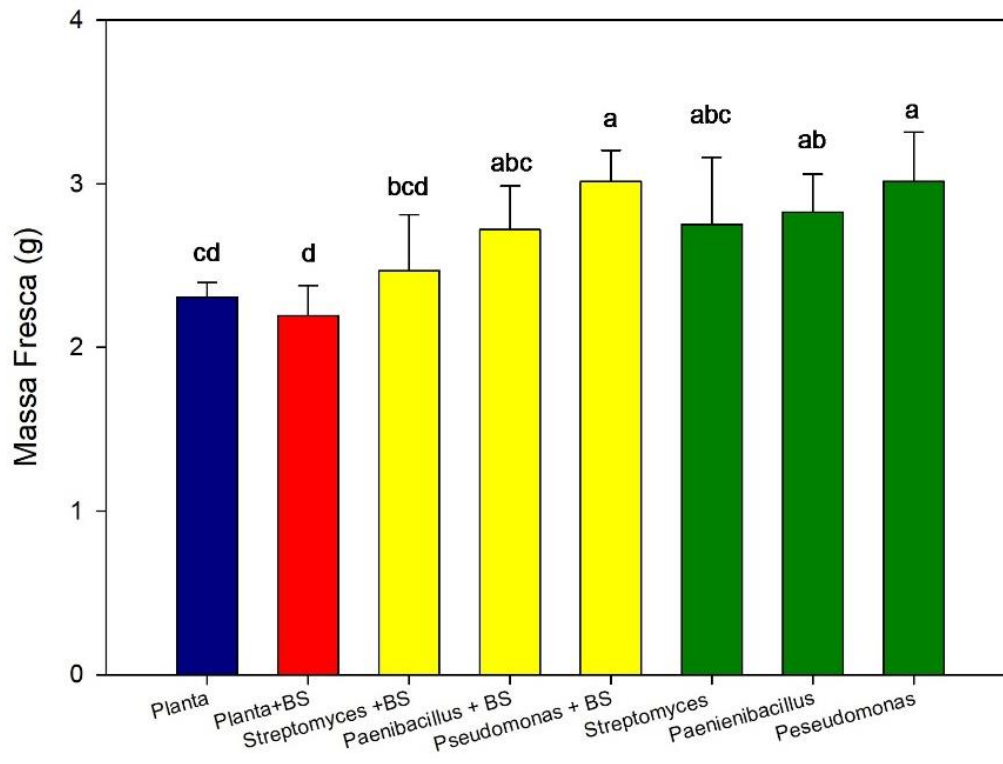


Figura 14- Efeito do tratamento no comprimento das plantas. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

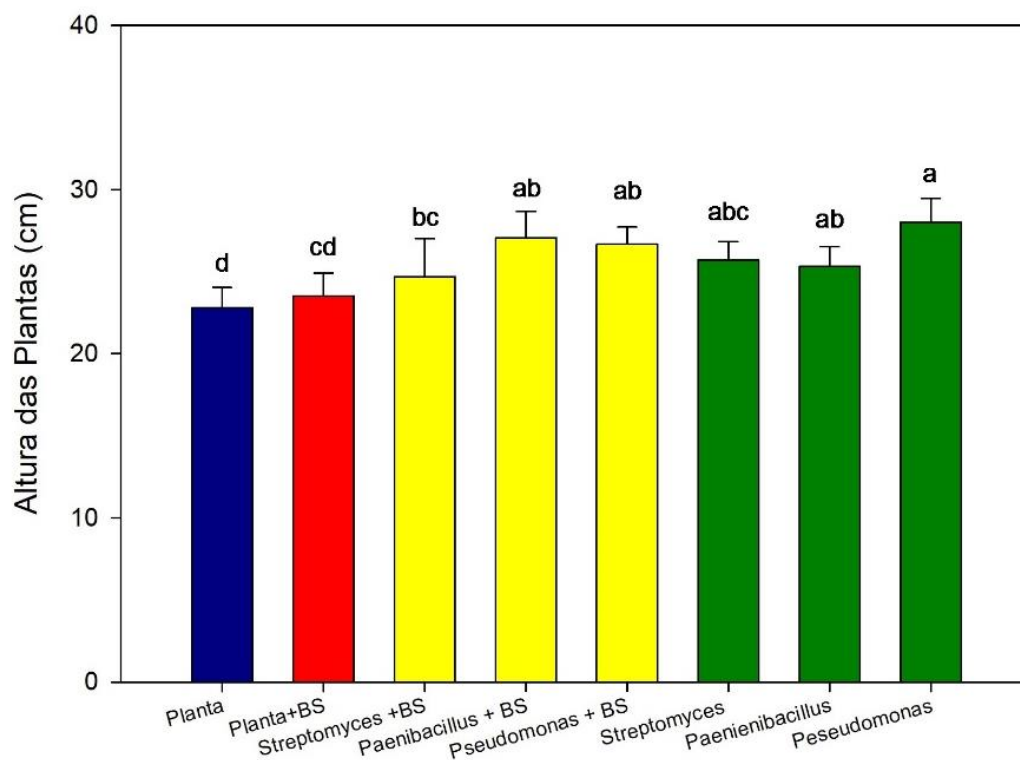


Figura 15 - Efeito dos tratamentos na biomassa fresca da planta, avaliação da parte aérea (caule e folhas). Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

Apesar de não termos observado diferença significativa entre os tratamentos co-inoculados, podemos observar que há tendência das plantas serem mais altas no tratamento “Pseudomonas”. O controle positivo (Planta) apresentou a menor altura. No geral, podemos observar uma tendência de promoção de crescimento em todos os tratamentos inoculados com bactérias, inclusive nos tratamentos co-inoculados bactéria e patógeno.

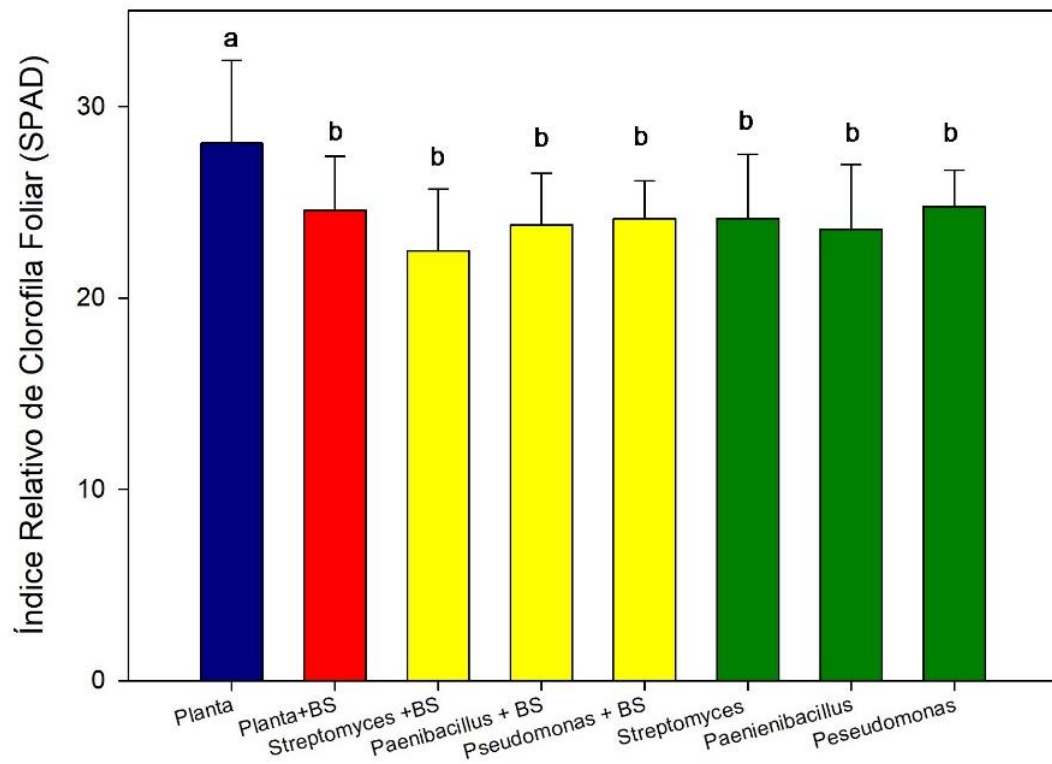


Figura 16- Efeito do tratamento no teor relativo de clorofila das plantas medido em SPAD. Barra representa o erro padrão das amostras (n = 6). Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

Plantas sem inoculação de bactéria ou patógeno (controle positivo) apresentaram maiores índice relativo de clorofila.

6.2 Caracterização dos inoculantes bacterianos

Para validação sobre as informações da caracterização previa dos isolados bacterianos (Tabela 4), os testes de inibição foram refeitos (Figura 6, anexo I). As bactérias aptas para biocontrole (Figura 6) foram sequenciadas e os resultados foram disponibilizados na tabela a seguir (Tabela 4):

Tabela 4 - Caracterização dos isolados bacterianos para produção de ácido indolilacético (AIA), solubilização de fósforo (P), fixação de nitrogênio (N), antagonismo aos patógenos *B. sorokiniana* (BS), *Fusarium graminearum* (FG), dados do sequenciamento dos genomas bacterianos.

Cepas	Genoma				GC (%)	total length (pb)
	AIA	P	N	BS		
<i>Pseudomonas</i> sp. CMAA 1741	+	+	+	+	63,05	5,649,125
<i>Streptomyces</i> sp. CMAA 1738	+	+	-	+	75,50	8,110,069
<i>Paenibacillus</i> sp. CMAA 1739	+	+	+	+	42,02	5,679,554

Na montagem preliminar dos *drafts* dos genomas observamos que o *total length* para *Pseudomonas* sp. foi de 5.649.125, sendo o maior *contig* obtido com 300.042 bp e 63,05% GC, para o *Streptomyces* sp. o *total length* foi de 8.110.069, sendo o maior *contig* obtido com 626.047 bp e 72,50% GC e para o *Paenibacillus* sp. o *total length* foi de 5.679.554, sendo o maior *contig* obtido com 1.266.295 bp e 45,02% GC.

As anotações taxonômicas obtidas através das plataformas GTDB-Tk, NCBI e Kbase permitiram confirmar os grupos de isolado bacterianos até nível de gênero (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação taxonômica dos genomas bacterianos utilizando o Genome Taxonomy Database – Toolkit (GTDB-Tk) e o National Center for Biotechnology Information (NCBI)

	<i>Paenibacillus</i> sp. CMAA 1739	<i>Streptomyces</i> sp. CMAA 1738	<i>Pseudomonas</i> sp. CMAA 1741
Filo	Fermicutes	Actinobacteriota	Proteobacteria
Classe	Bacili	Actinomycetia	Gamaproteobacteria
Ordem	Paenibacillales	Streptomycetales	Pseudomonadales
Família	Paenibacillaceae	Streptomycetaceae	Pseudomonadaceae
Gênero	Paenibacillus	Streptomyces	Pseudomonas
Espécie (GTDB)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Streptomyces erythrochromogenes</i>	<i>Pseudomonas inefficax</i>
Espécie (NCBI)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Streptomyces virginiae</i>	<i>Pseudomonas inefficax</i>
ANI (%)	98,97	98,23	98,41

ANI = Average Nucleotide Identity (referente ao GTDB)

Através da plataforma Kbase, as análises indicadas para o genoma de CMAA 1739 demonstraram estar profundamente inserido no gênero *Paenibacillus* sp. com máxima homologia com *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus jamilae* (Figura 17).

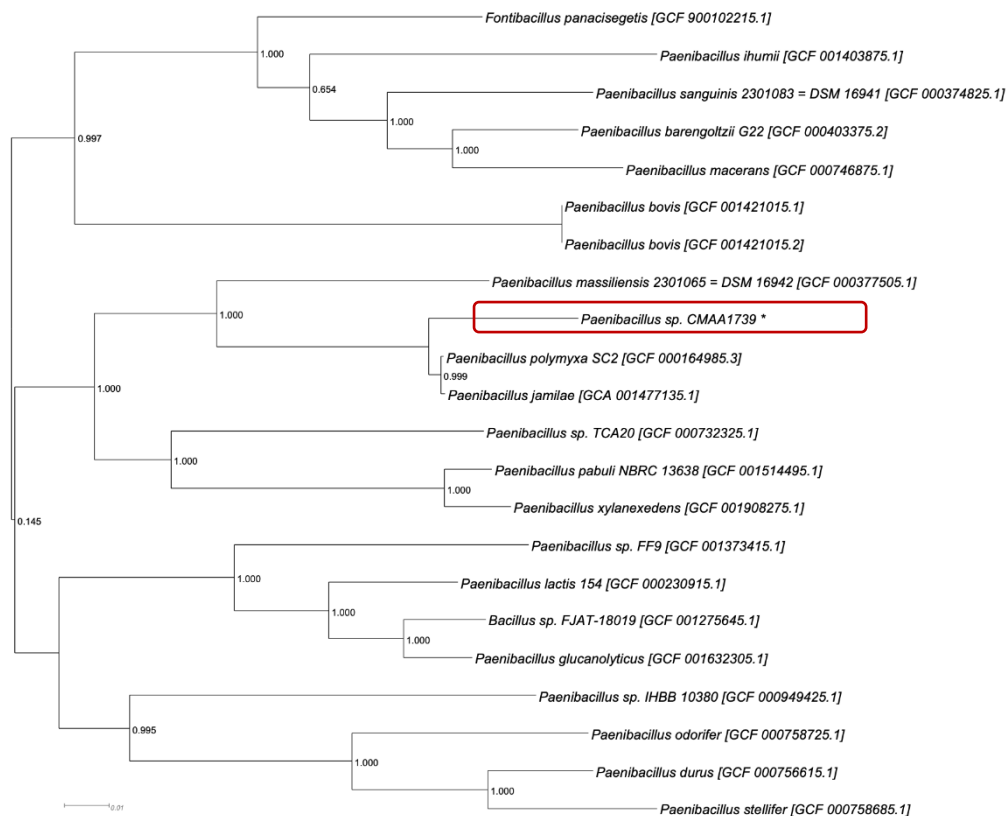


Figura17 - Filogenia de CMAA_1739 em comparação com a de diferentes espécies de *Paenibacillus* sp. (números de acesso RefSeq são fornecidos entre parênteses) selecionados a partir do Kbase, banco de genomas públicos. Os genomas inteiros foram alinhados e a árvore de de probabilidade máxima do CMAA_1739 foi construída usando as configurações padrão do FastTree v2.1.10. Os valores na árvore representam os valores de suporte local para os nós da árvore calculados usando o teste Shimodaira-Hasegawa (SH) no FastTree v2.1.10.

A análise filogenética do isolado CMAA 1738, com base no genoma, revelou que a bactéria está inserida no gênero *Streptomyces* sp. com máxima homologia com *Streptomyces virginiae* (Figura18)

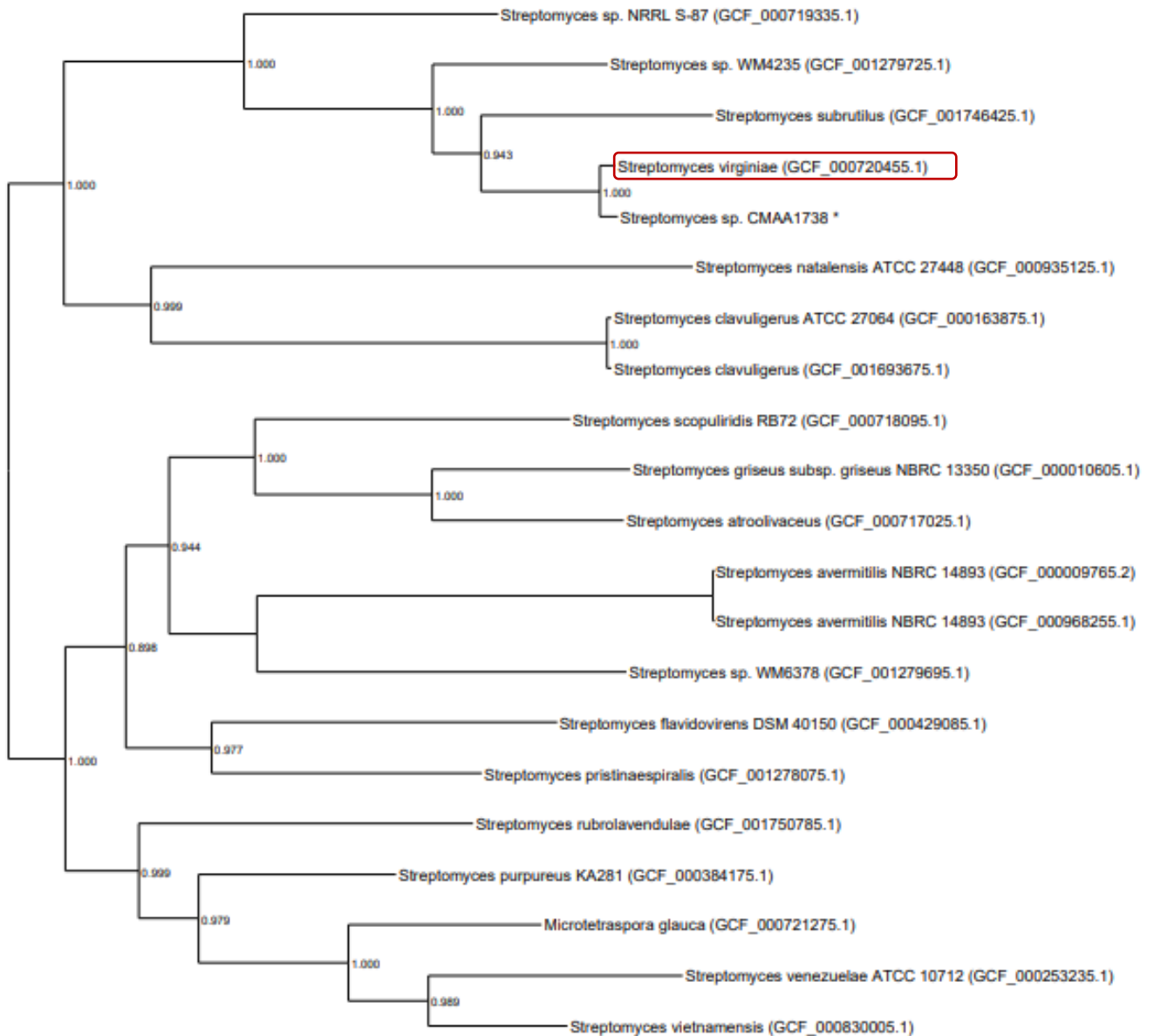


Figura 18 - Filogenia de CMAA_1738 em comparação com a de diferentes espécies de *Streptomyces* sp. (números de acesso RefSeq são fornecidos entre parênteses) selecionados a partir do Kbase, banco de genomas públicos. Os genomas inteiros foram alinhados e a árvore de probabilidade máxima do CMAA_1738 foi construída usando as configurações padrão do FastTree v2.1.10. Os valores na árvore representam os valores e suporte local para os nós da árvore calculados usando o teste Shimodaira-Hasegawa (SH) no FastTree v2.1.10.

As análises indicadas para o genoma de CMAA 1741 demonstra estar inserido no gênero *Pseudomonas* sp. com máxima homologia com *Pseudomonas inefficax* (Figura19).

O refinamento da montagem dos três genomas permitirá a realização da anotação e mineração que nos auxiliará na identificação de *biosynthetic gene clusters* (BGC) dos isolados benéficos. As informações dos genótipos podem servir de ferramenta para buscar fenótipos específicos dependente do perfil químico resultante das análises de metabólitos (tópicos 5.3.3 e 5.3.4). O processamento do genoma através do software *Antismash*® resultou na predição de 22 clusters para *Paenibacillus* sp., 33 clusters para *Streptomyces* sp. e 8 clusters para *Pseudomonas* sp. Estes clusters representam agrupamentos de genes que codificam a biossíntese de metabólitos secundários. Todavia, poucos clusters foram identificados com similaridade significativa através dos bancos de dados (Tabela 6), sendo que o genoma da *Pseudomonas* sp., não apresentou nenhum cluster relevante.

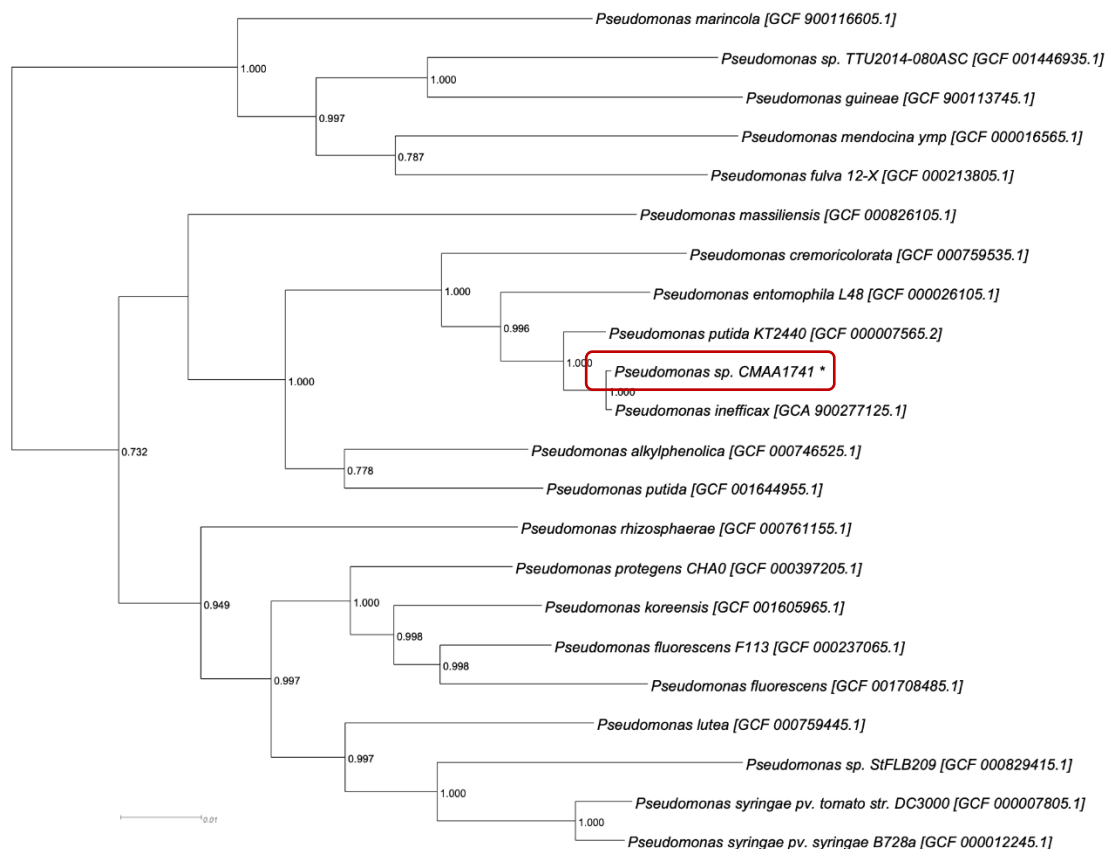


Figura 19 - Filogenia de CMAA_1741 em comparação com a de diferentes espécies de *Pseudomonas* sp. (números de acesso RefSeq são fornecidos entre parênteses) selecionados a partir do Kbase, banco de genomas públicos. Os genomas inteiros foram alinhados e a árvore de probabilidade máxima do CMAA_1741 foi construída usando as configurações padrão do FastTree v2.1.10. Os valores na árvore representam os valores e suporte local para os nós da árvore calculados usando o teste Shimodaira-Hasegawa (SH) no FastTree v2.1.10.

Cruzando os resultados de saída do antiSMASH dentro do pipeline MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*), foi possível prever com mais precisão certos metabólitos e/ou a classe mais provável que o cluster de genes se encaixam conforme apresentado em Tabela 6:

Tabela 6- Agrupamentos de genes significativos codificados no genoma de *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. (saída antiSMASH-MIBiG)

	Cluster Overview	Coordinates (nt location in the contig)	Gene cluster type	Predicted metabolite	Genes similarity (%)
<i>Paenibacillus</i> sp.	Cluster 16.1	50628 - 95965	NRPS	Fusaricidin B	100
CMAA 1738	Cluster 21.3	1 - 23364	NRPS	Tridecaptin	100
<i>Streptomyces</i> sp.	Cluster 2.1	196137 - 266136	NRPS-like /NRPS	Streptothricin	83
CMAA 1739	Cluster 2.4	446615 - 497576	NRPS	Coelichelin	100
.	Cluster 3.2	314852 - 337488	lanthipeptide class III	SapB	100
.	Cluster 8.1	45273 - 67939	lanthipeptide class IV	Venezuelin	100
.	Cluster 9.1	114629 - 181898	NRPS-like/ NRPS	JBIR -126	100
.	Cluster 11.1	24354 - 36135	siderophore	Desferrioxamin B/E	83
.	Cluster 61.1	240 - 26378	T3PKS	Alkylresorcinol	100

As anotações geradas pelo software *Antismash*® mostraram que as informações genotípicas de *Paenibacillus* sp. apresentam alta similaridade para a expressão do fenótipo fusaridin B (100%) e tridecaptin (100%), antifúngico e antibiótico, respectivamente (CHOI et al., 2008; COCHRANE et al., 2015).

As informações genotípicas de *Streptomyces* sp. apresentam alta similaridade para 7 grupos fenotípicos sendo eles os compostos coelichelin (100%), streptothricin (83%) e desferrioxamin B/E (83%) que são sideróforos (ANGOLINI et al., 2016; BENAUD et al., 2021); sapB (100%) que pertence à classe dos surfactantes (KODANI et al., 2014; BENAUD et al., 2021); venezuelin (100%) peptídeo do grupo lanthipeptídeo, classe dos lantibióticos (KODANI et al., 2014); JBIR -126 (100%), também conhecido como “tambromycin” um tipo de NRPS-like, peptídeo não-ribossomal com potencial antifúngico (BENAUD et al., 2021) e alylresorcinol (100%), um polyketídes relacionado a um composto com potencial antimicrobiano com efeito antifúngico e bactericida (BENAUD et al., 2021). Por fim, as informações genotípicas de *Pseudomonas* sp. não apresentaram nenhuma similaridade relevante para produção fenotípica de composto de interesse antimicrobiano.

6.2.1 Análise de metabólitos secundários

6.2.2 Busca dirigida pelos compostos preditos a partir dos genomas bacterianos

Os genomas das bactérias estudadas apresentam predições de metabólitos secundários (Tabela 7), informando o potencial para produzir, por exemplo, surfactinas, antimicrobianos e sideróforos. Para investigar se os fenótipos estão sendo exsudados, fizemos a busca dirigida dos compostos, usando os extratos lidos no UPLC – MS, a partir das informações encontradas na literatura referente à taxa de massa sobre a carga (m/z). As informações sobre m/z dos compostos preditos no genoma foram sumarizadas na tabela abaixo:

Tabela 7 - Compostos químicos preditos no genoma das bactérias com sua respectiva relação de massa/carga (m/z)

	Composto	m/z	Referência
<i>Streptomyces sp.</i>	coelichelin	566	Lautru et al., 2005
CMAA 1738	sapB	2027.8850	Kodani et al., 2004
.	venezuelin	723.3822	Kodani et al., 2014
.	JBIR -126	536.191	Izumikawa et al., 2015
.	alkylresorcinol	338.3	Nakano et al., 2012
.	streptothricin	758.42	Ashraf et al., 2021
.	desferrioxamin E	601	Traxler et al., 2013
.	desferrioxamin B	561.3640	Angolini et al., 2016
<i>Paenibacillus sp.</i>	fusaricidin B	897.6	Mikkola et al., 2017
CMAA 1739	tridecaptin	1488.8246	Jangra at al., 2019

Ao realizar a busca pelas massas (Tabela 7), nas análises por LC(ESI)-MS, foi possível localizar a possível presença desses metabólitos nos extratos e identificar em quais tempo de retenção (RT) esses compostos podem ser encontrados. A massa exata dos compostos coelichelin (RT: 7.5 e 8.3), JBIR-126 (RT:6.3), alkylresorcinol (RT:10.1), streptothricin (RT:21.3 e 21.9), desferrioxamin_E (RT:18.9 e 21.6) foram localizadas, utilizando o software masslynx, indicando que este compostos podem estar sendo exsudados pela bactéria *Streptomyces sp* (Figura 20). Contudo o espectrômetro usado apesar de ser um q-ToF é um equipamento de baixa resolução (5000) e, portanto, além da massa é necessário confirmar com o espectro de fragmentação.

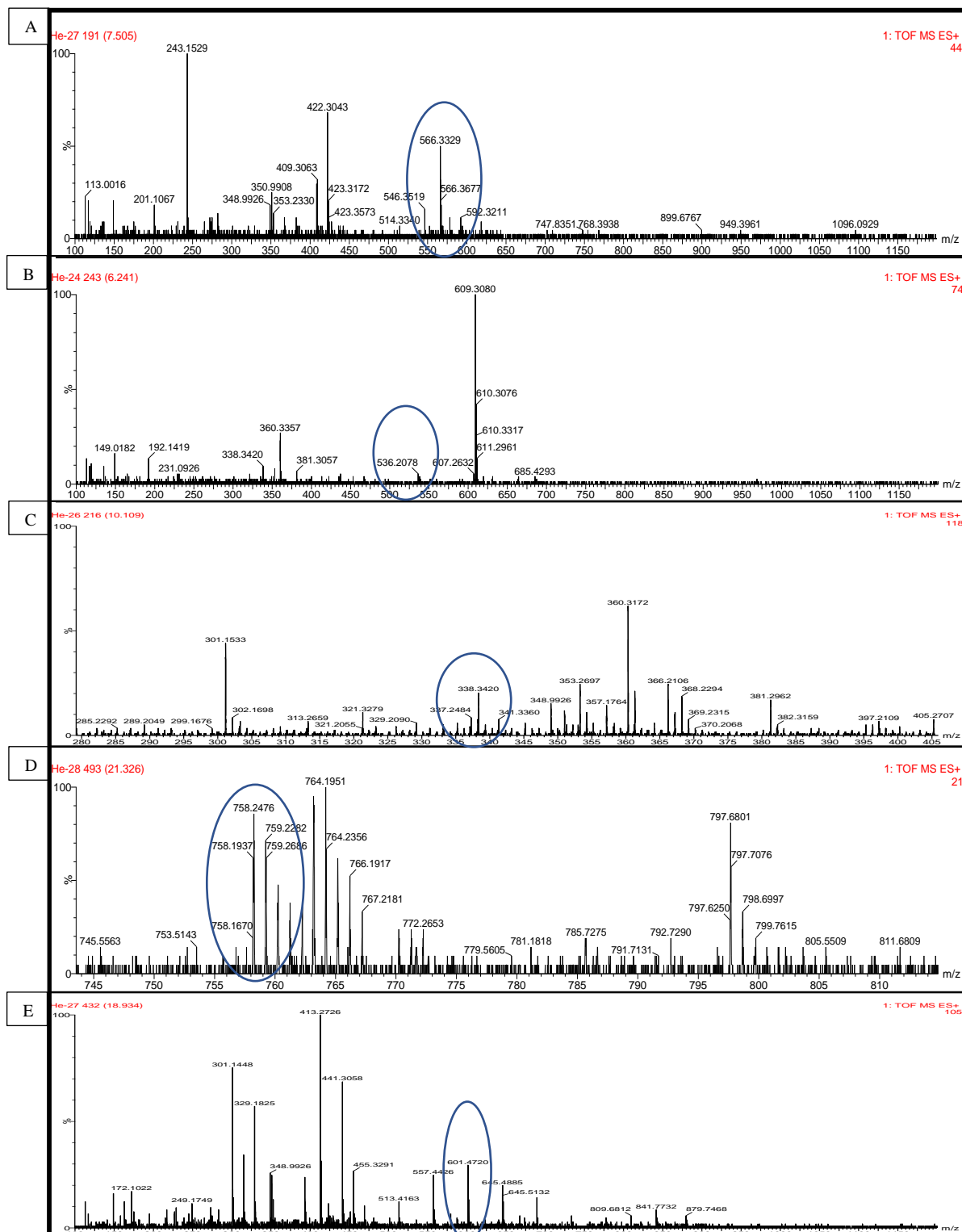


Figura 20 - Massas exatas dos compostos preditos no genoma de *Streptomyces* sp.; (A) Espectro da massa 566 do composto Coelichelin; (B) Espectro da massa 536.191 do composto JBIR-126; (C) Espectro 338.3 do composto Alkylresorcinol; (D) Espectro da massa 758.42 do composto Streptothricin; (E) Espectro da massa 601 do composto Desferrioxamin E.

A massa do composto Fusaricidin B (RT: 18.3 e 19.1) foi localizada, dentro do software masslynx, indicando que o fenótipo está sendo exsudado pela bactéria *Paenibacillus* sp. (Figura 21), contudo para se confirmar a estrutura desses compostos é necessário além da massa ter um espectro de fragmentação compatível com a estrutura já conhecida, para facilitar essa busca nessas análises utilizou-se a plataforma do GNPS.

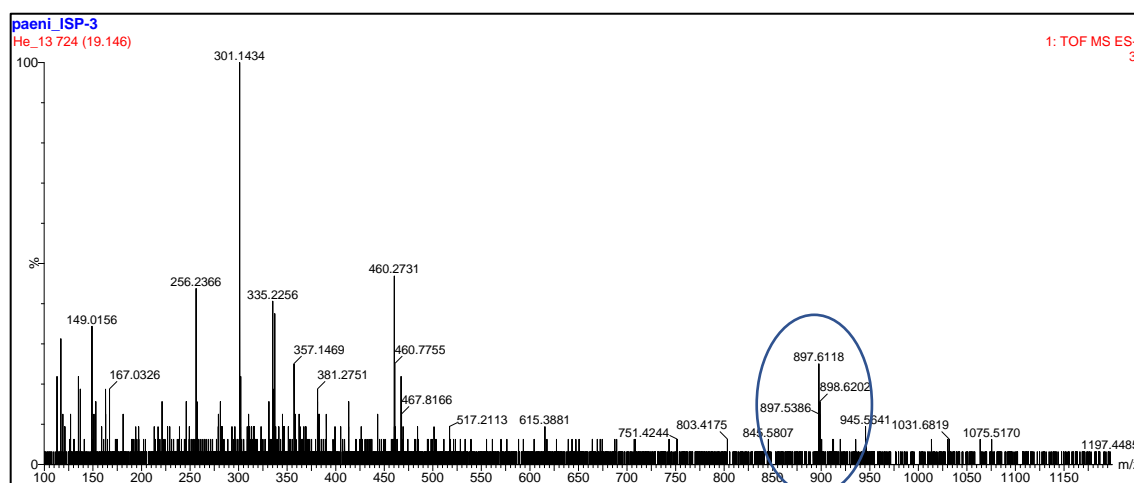


Figura 21 - Espectro da massa 897.6 que corresponde ao composto Fusaricidin B predito no genoma de *Paenibacillus* sp.

6.2.3 Tratamento dos dados lidos em UPLC-MS na plataforma GNPS

O processamento de dados através da plataforma GNPS consiste em analisar os átomos e moléculas por meio da relação massa/carga (m/z) dos íons de analitos detectados no equipamento UPLC-MS e correlaciona-los com a biblioteca de dados (MassBank) da plataforma. A maioria dos íons detectáveis estavam relacionados a composto que não tiveram a identidade revelada pela biblioteca de dados. Apesar disso, foi possível a identificação de compostos de interesse, Tabela 8:

Tabela 8 - Compostos identificados na plataforma GNPS pela biblioteca de dados após processamento das amostras em UPLC-MS

id	Nutriente	Composto	Função	Referencia
<i>B. sorokiniana</i>	BDA	Walleminone	Sequisterpeno	Frank et al., 1999
(patógeno)	BDA	Anhydrococlhoquinone A	Bicyclo-Sesquiterpeno	Suthiphasilp et al., 2021
.	BDA	Surfactina_C	Biosurfactante	Yi et al., 2021
.	BDA	Barangamides_D	NRP	NORINE
.	BDA	Dolastatin	peptideo	Amador et al., 2003
.	BDA	Majuculamide_C	lipopeptideo/antibiotico	Xu et al., 2020
<i>Pseudomonas</i> sp.	ISP	Surfactina_C	Biosurfactante	Dimkić et al., 2021
CMAA 1741	ISP	BK_10_101A-form	Lipopeptideo	Behsaz et al., 2020
.	TSB	Cycloamanide_C	peptideo/Imunosupressor	Wieczorek et al., 1993
.	BDA	Aureobasidin_H	peptideo/antimicrobiano	Takesano et al., 1993
.	BDA	Laguramide_C	peptideo	-
<i>Streptomyces</i> sp.	BDA	4-(3,4-dihydroxyphenyl)...	Glicosídeo/Antioxidante	Pubchem
CMAA 1738	BDA	Ciclinopeptide_X	peptideo/Imunosupressor	Górski et al., 2001
.	BDA	Bistratamide_I	peptideo/antibiotico	Pubchem
.	BDA	Myriastramide_A	peptideo	Erickson et al., 2003
.	BDA	Tiahuramide_B	lipopeptideo/antibiotico	Xu et al., 2020
<i>Paenibacillus</i> sp.	BDA	Diamide	peptideo/lantibiótico	Malabarba et al., 1990
CMAA 1739				

Nas amostras de fungo cultivado em BDA, foi verificada a presença da fitotoxina Cloqueoquina A e Anidrocloquioquina A (Figura 22).

O composto Walleminone (Figura 23) tem estrutura similar a um isocariofileno, sesquiterpeno bicíclico cujo destaque é conter um anel de ciclobutano (FRANK et al., 1999), apresenta propriedades anti-inflamatórias e antibióticas (DAS et al., 2022).

Nas amostras de fungo também foi verificada a presença do composto Surfactina_C (Figura 22) que tem função surfactante. Utilizando a ferramenta “Dereplicator” alguns peptídeos foram correlacionados indicando os compostos Barangamides D, que é um peptídeo não ribossomal e Majuculamide C que tem a síntese relacionada com antibióticos.

Nas amostras de *Pseudomonas* sp., cultivadas em meio ISP, o banco de dados também localizou o composto Surfactina_C (Figura 24). Utilizando a ferramenta “Dereplicator” alguns peptídeos foram correlacionados indicando os compostos Surfactina_C15, BK_10_/BK_101A-form (lipopeptideo), Cycloamanide_C, Aureobasidin_H e Laguramide_C.

Nas amostras de *Streptomyces* sp., o banco de dados localizou o composto 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-2-one, na plataforma *Pubchem* este composto esta correlacionado com

“Cynaroside” cujo função é antioxidante (Figura 24). Utilizando a ferramenta “Dereplicator” alguns peptídeos foram correlacionados indicando os peptídeos Bistratamide_I e Myriastramide_A e o antibiótico Tiahuramide_B.

Nas amostras de *Paenibacillus* sp., somente o peptídeo Diamide foi identificado através da ferramenta “Dereplicator”. Este peptídeo está relacionado com a classe dos lantibióticos.

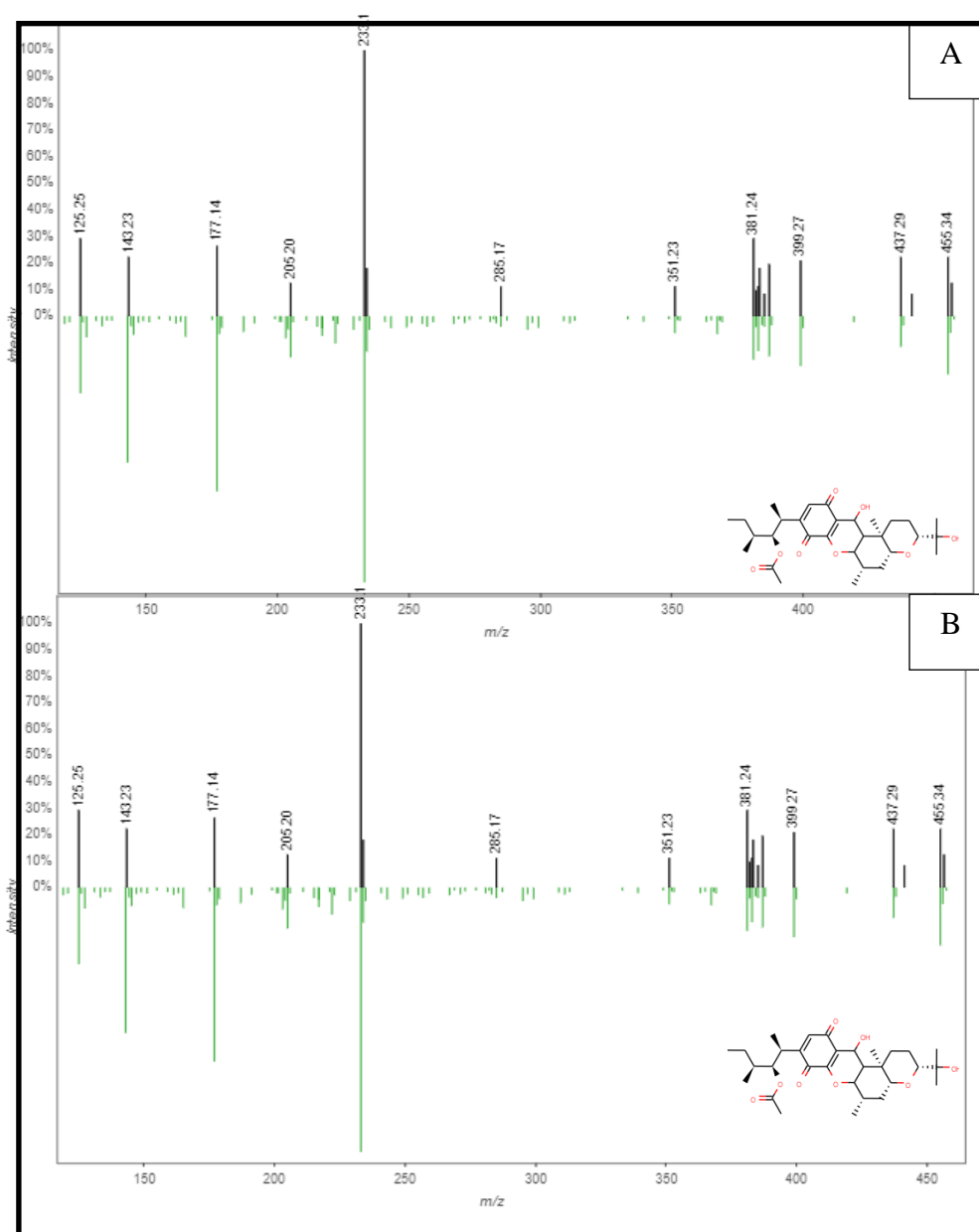


Figura 22 - Compostos identificados pela plataforma GNPS através das amostras de *B. sorokiniana*. Os sinais verdes representam o banco de dados e são comparados com os sinais pretos que representam a amostra. (A) Cochlioquinone A C; (B) Anhydrocochlioquinone A.

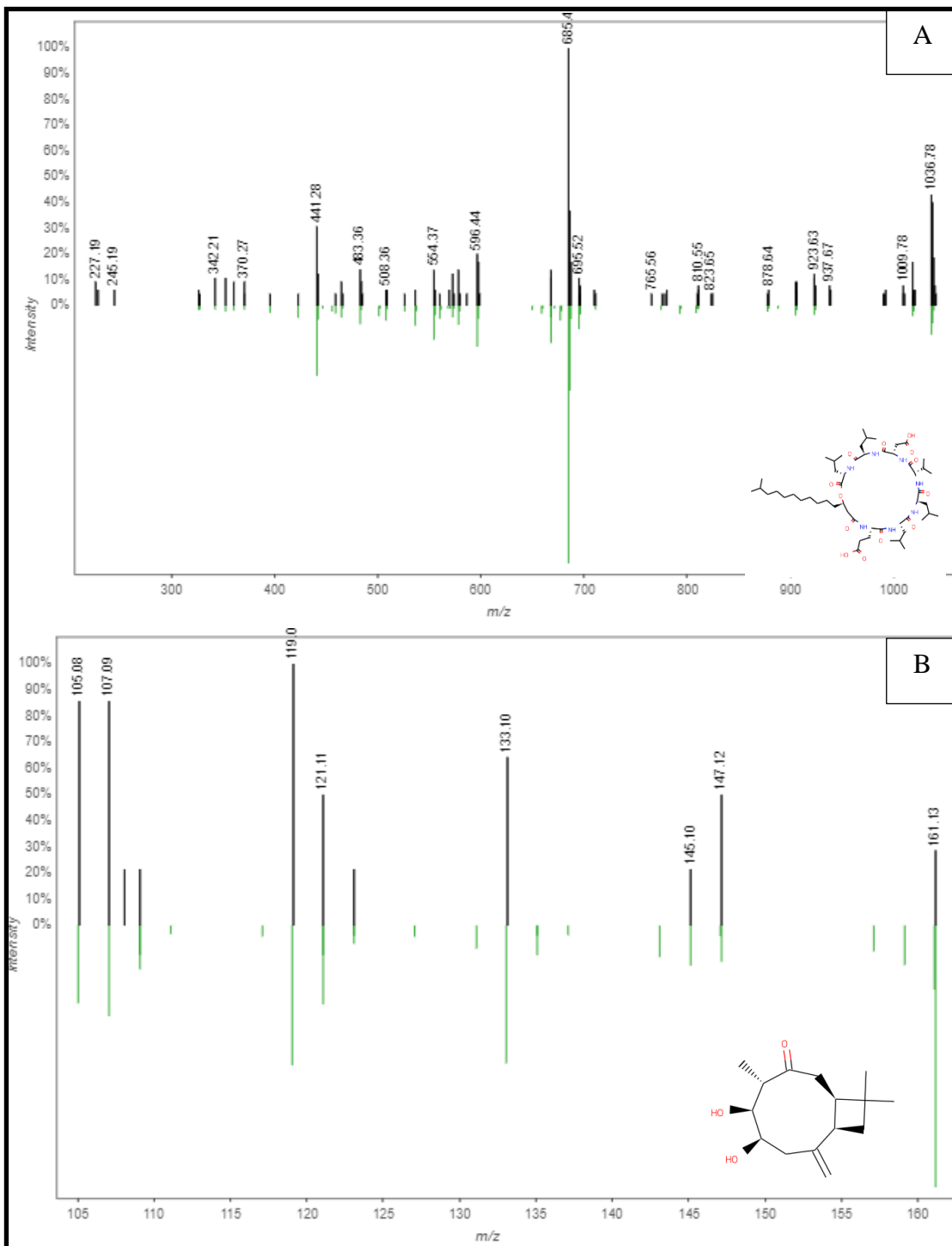


Figura 23- Compostos identificados pela plataforma GNPS através das amostras de *B. sorokiniana*. Os sinais verdes representam o banco de dados e são comparados com os sinais pretos que representam a amostra. (A) Surfactina C; (B) Wallemione.

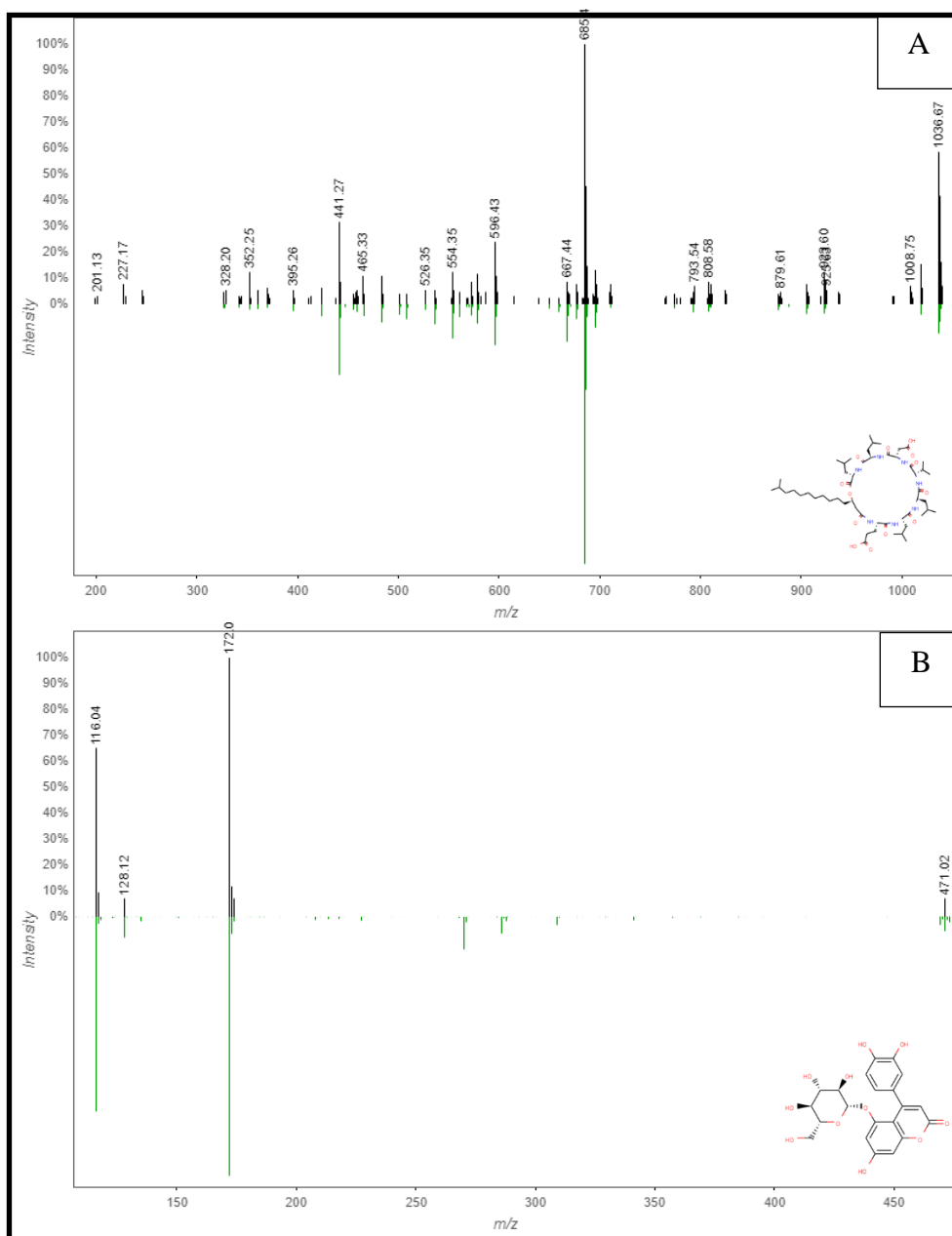


Figura 24 - Compostos identificados pela plataforma GNPS através das amostras de bactérias. Os sinais verdes representam o banco de dados e são comparados com os sinais pretos que representam a amostra. (A) Surfactina C identificada em *Pseudomonas* sp.; (B) Cynaroside, identificada em *Streptomyces* sp.

6.2.4 Tratamento dos dados de GC-MS pelas plataformas MSDial, Unknown e MatLab

6.2.5 Análise de voláteis

Na abordagem apresentada nesse tópico, priorizamos a identificação dos compostos prospectados em co-cultivo entre o patógeno fúngico e o antagonista bacteriano. Combinando a interpretação dos dados obtidos pelo GC-MS com dois softwares: *Msdial*, que indica abundância relativa dos íons mais intensos, e o software *Unknown*, que correlacionam as

massas com a biblioteca de massas *NIST14*. Os dados obtidos nessa interação estão apresentados na tabela abaixo:

Nas amostras de fungo, foram identificados pela biblioteca NIST o sesquiterpeno 1,4-Methano-1H-indene (98,2% - similaridade), ácido oxálico (90%), ácido pentanoíco (83%) e Antranilato de metila (96,3%). Nas amostras de *Streptomyces* sp., foram identificados o monoterpeno 2-Methylisoborneol (95,4%) e o álcool amílico 1-Butanol, 2-methyl (91,2%). Nas amostras de *Paenibacillus* sp., foram identificados os álcoois 1-Pentanol (96,6%), 2,3-Butanediol (91,2%), 2-fenil-etanol (90,1%), o terpeno Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl (92,6%) e o monoterpeno trans-.beta.-Ocimene (93,6%). Todos os compostos identificados possuem funções relacionadas com comunicação química ou são precursores de toxinas em competição interespecífica (Tabela 9).

Tabela 9 - Compostos Orgânicos Voláteis, prospectados em co-cultivo (fungo e bactérias), que foram detectados pela biblioteca NIST 14 através de análise de MSDial com dados GC-MS. p-value <0.001 (ANOVA).

Tratamento	RT [*]	composto	match (%)	Função	Referência
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	23,955	1,4-Methano-1H-indene	98,2	-	NIST
(patógeno)	10,755	Oxalic acid, butyl cyclobutyl ester	90	Flavonoide	Chachaiya et al., 2019
	11,988	Pentanoic acid/ Valeric acid	83	Antimicrobiano	Kovanda et al., 2019
	22,523	Methyl anthranilate	96,3	Antifúngico	Chen et al., 2020
<i>Streptomyces</i> sp.	18,248	2-Methylisoborneol	95,4	Monoterpeno	Becher et al., 2020
CMAA 1738					
<i>Paenibacillus</i> sp	5,702	1-Butanol, 2-methyl	91,1	Alcool amílico/ Antifungico	Sudha et al., 2022
CMAA 1739	5,719	1-Pentanol	96,6	Alcool/Indutor de resistencia	Song et al., 2015
	6,666	2,3-Butanediol	91,2	Produto de fermentação	Schilling et al., 2020
	16,169	Phenylethyl Alcohol	90,1	Alcool/ potencial antifungico	Passera et al., 2017
	10,866	trans-.beta.-Ocimene	93,6	Monoterpeno	Pubchem
.	10,843	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl	92,6	Terpeno	Pubchem

*RT – Retention Time (Tempo de Retenção).

Apesar das análises exploratórias indicarem resultados interessantes, a discriminação dos dados só foi possível através da abordagem PLS-DA (Figura 25). Nessa abordagem, um modelo foi criado para entender se o tratamento em co-cultivo diferia dos demais. Após a verificação, os dados discriminados foram submetidos a “cross-validação” pontuando quais RT’s foram relevantes durante o teste de antibiose. Os valores de RT foram cruzados com a biblioteca NIST revelando os compostos envolvidos na interação antagônica entre bactéria e fungo (Tabela 10).

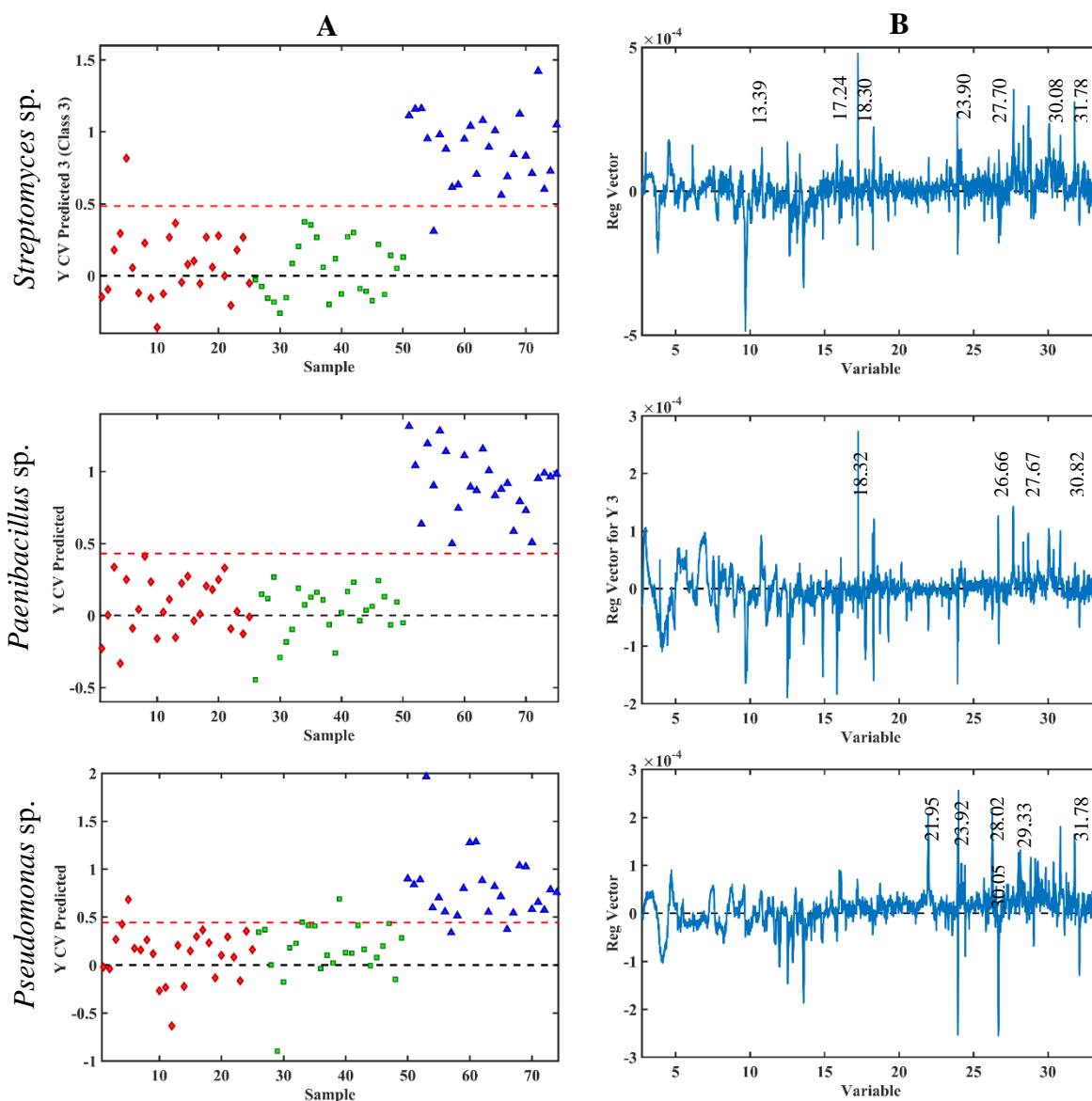


Figura 25 – Modelo de Discriminação obtido por ANOVA-PLS-DA. (A) Cross-validação e (B) Vetor de Regressão. Os diamantes vermelhos são as amostras de fungo, os verdes são as amostras de bactérias e os azuis são as amostras de co-cultura. Houve discriminação do tratamento co-cultura, portanto, o vetor de regressão pode ser aplicado para encontrar os principais Tempos de Retenções e indicar os metabólitos responsáveis pela discriminação através da similaridade com a biblioteca NIST.

Tabela 10 - Compostos Orgânicos Voláteis prospectados em co-cultivo (fungo e bactérias) detectados pela biblioteca NIST 14 através do método PLS-DA com dados GC-MS

Tratamento	RT*	Composto	NIST (%)
<i>Streptomyces</i> sp.	17,24	Formic acid, 1-methylethyl ester	71,88
CMAA 1738	18,30	2-Methylisoborneol	92,43
	23,90	1,4-Methano-1H-indene, octahydro-4-methyl-8-methylene-7-(1-methylethyl)-	92,81
	27,70	Cyclohexene, 1,5,5-trimethyl-6-(2-propenylidene)-	73,77
	30,08	Benzene, [1-(2-propenyloxy)-3-butenyl]-	81,40
<i>Paenibacillus</i> sp.	18,3	Phenol, 4-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-	74,53
CMAA 1739	26,7	Butylated Hydroxytoluene	97,97
	27,7	2-Octenoic acid, 4-isopropylidene-7-methyl-6-methylene-, methyl ester	68,52
	30,1	Benzene, (1,1-diethylpropyl)-	78,6
	30,8	3,4-Methylenedioxymandelic acid	84,50
<i>Pseudomonas</i> sp.	21,95	2-Methoxy-1,3-dioxolane	69,69
CMAA 1741	23,9	1,4-Methano-1H-indene, octahydro-4-methyl-8-methylene-7-(1-methylethyl)-	98,02
	28	1-Propanol, 3-bromo-2,2-bis(bromomethyl)-	83,09
	29,3	2-[2-(2,2,3,3,3-Pentafluoropropanoyl)oxyethoxy]ethyl 2,2,3,3,3-pentafluoropropanoate	73,10
	30,8	Benzenesulfonamide, N-butyl-	83,50

* RT – Retention Time (Tempo de Retenção)

6.3 Estruturação das comunidades bacterianas da rizosfera do trigo

6.3.1 Análise do gene rRNA 16S

Observamos a distribuição do gene rRNA 16S e foi possível apontar diferença significativa na quantificação de patógeno entre os tratamentos (Figura 26). Através do teste Tukey, os tratamentos foram separados em grupos.

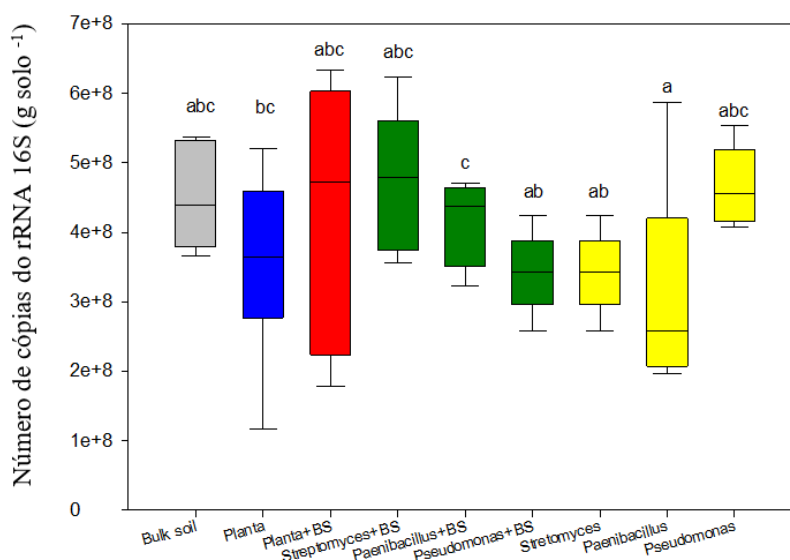


Figura 26 - Boxplot. Quantificação do gene rRNA16S via qPCR. Foi calculado o número de cópias do gene rRNA 16S e analisado a diferença entre os tratamentos. Teste Tukey ($p < 0,05$) foi aplicado. Não houve diferença

estatística significativa. ($n = 6$). Três controles foram usados de parâmetro para interpretação dos resultados: *Bulk soil* (controle neutro), Planta (controle positivo), Planta+BS (controle negativo). (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

6.3.2 Análise do gene *CosA*

Observamos a distribuição do gene *CosA* e não foi possível apontar diferença significativa na abundância dos grupos taxonômicos entre os tratamentos (Figura 27). De acordo com o teste F, as médias entre os tratamentos não podem ser consideradas diferentes.

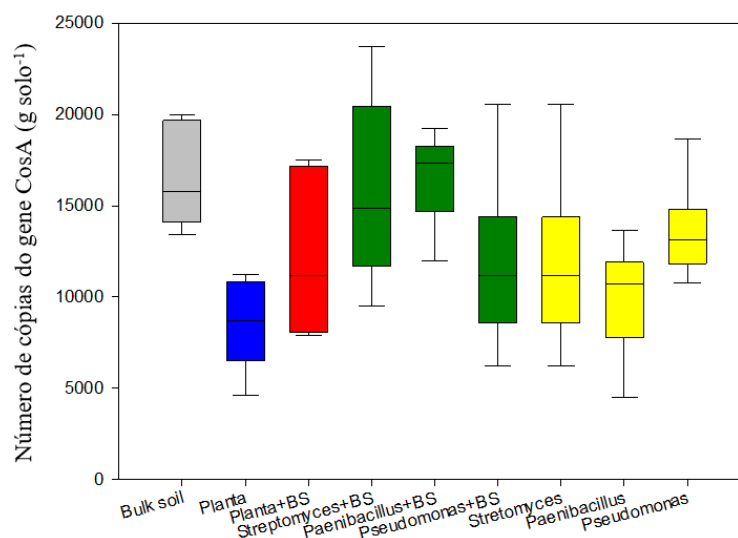


Figura 27 - Quantificação do fungo patogênico *Bipolaris sorokiniana* residente no solo via qPCR tendo o *CosA* como alvo. Teste Tukey $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ($n = 6$). Três controles foram usados de parâmetro para interpretação dos resultados: Bulk soil (controle neutro), Planta (controle positivo), Planta+BS (controle negativo). (BS) Tratamentos inoculados com patógeno.

Podemos observar a presença de patógeno residente no solo (Bulk Soil), no entanto, a população de *B. sorokiniana* possui tendência de ser reduzida na presença da planta (Plant).

6.3.3 Análise de abundância relativa e distribuição de taxa bacterianos

As análises taxonômicas (Figura 28 e Figura 29) demonstraram a presença de 41 filos bacterianos, sendo os 3 filos mais abundantes dentro da comunidade bacteriana: Proteobacteria, Bacteriodota e Actinobacteriota, respectivamente.

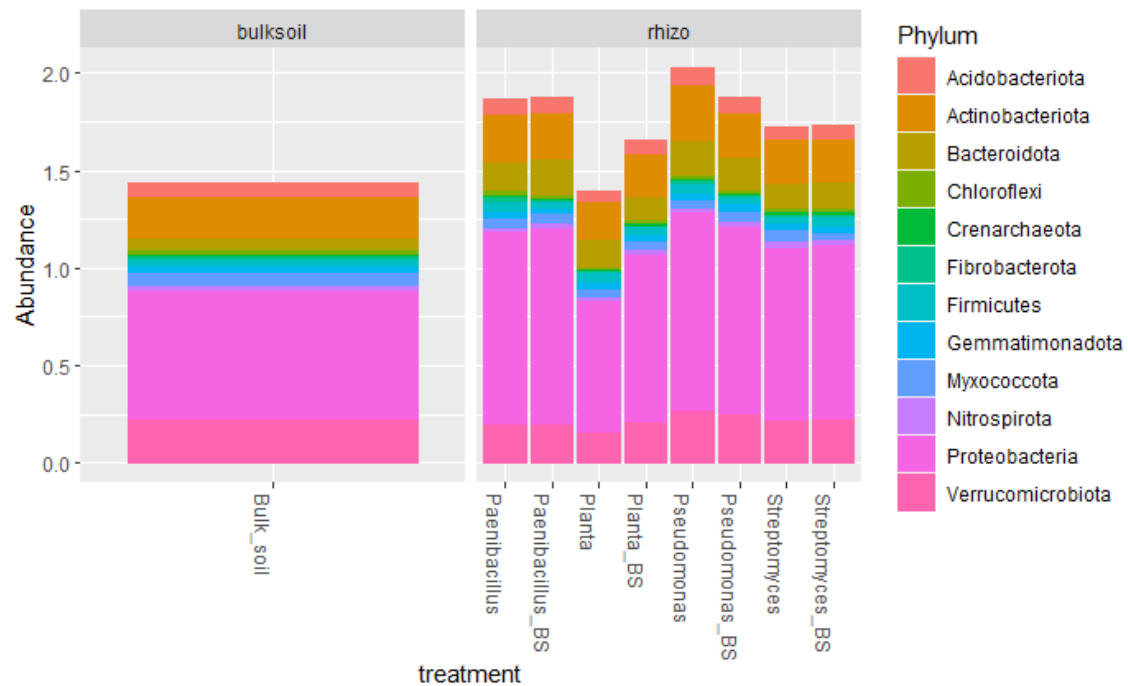


Figura 28 - Distribuição da Abundância relativa dos taxa bacterianos (16S rRNA) mostrando os principais filos presentes nos tratamentos.

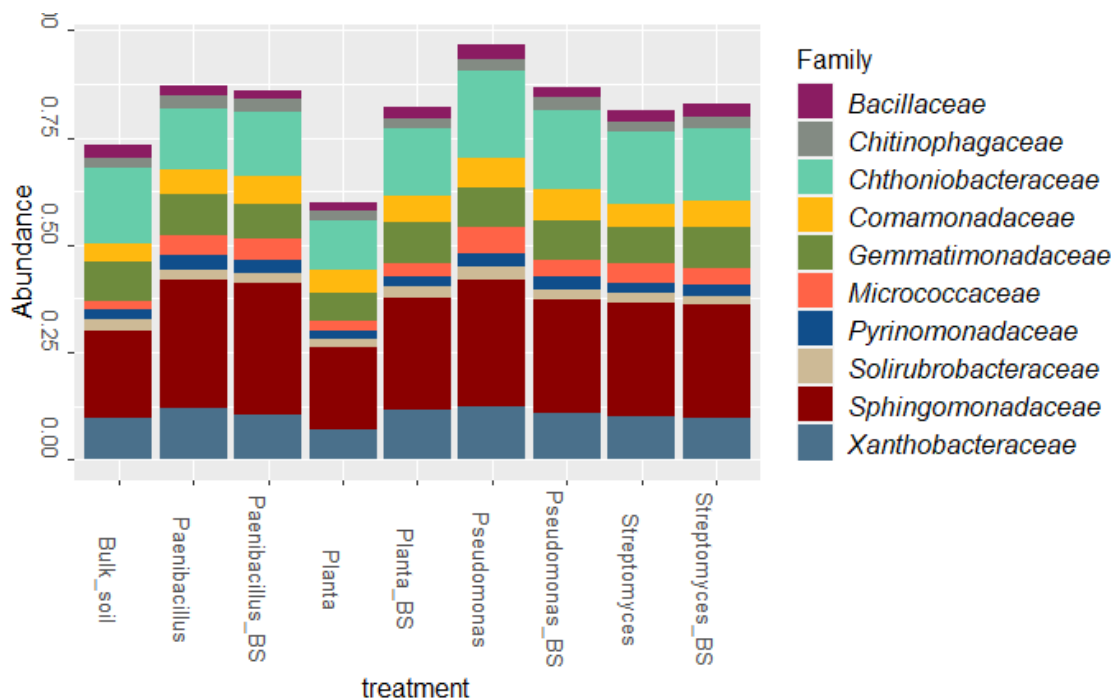


Figura 29 - Distribuição da abundância relativa dos taxa bacterianos (16S rRNA) mostrando as principais famílias presentes nos tratamentos.

6.3.4 Análise de diversidade bacteriana na rizosfera do trigo

A análise de alfa-diversidade (Figura 30) apresentou diferenças entre os tratamentos. Os controles negativos (Planta+BS) com o controle positivo (Planta) são consistentemente diferentes. O mesmo efeito é observado na análise de beta-diversidade (Figura 31), nessa análise podemos destacar a diferença entre os tratamentos “Pseudomonas” em relação a “Pseudomonas+BS”, “Paenibacillus” em relação a “Paenibacillus+BS” e Controle Positivo em relação ao Controle negativo (Planta e Planta+BS).

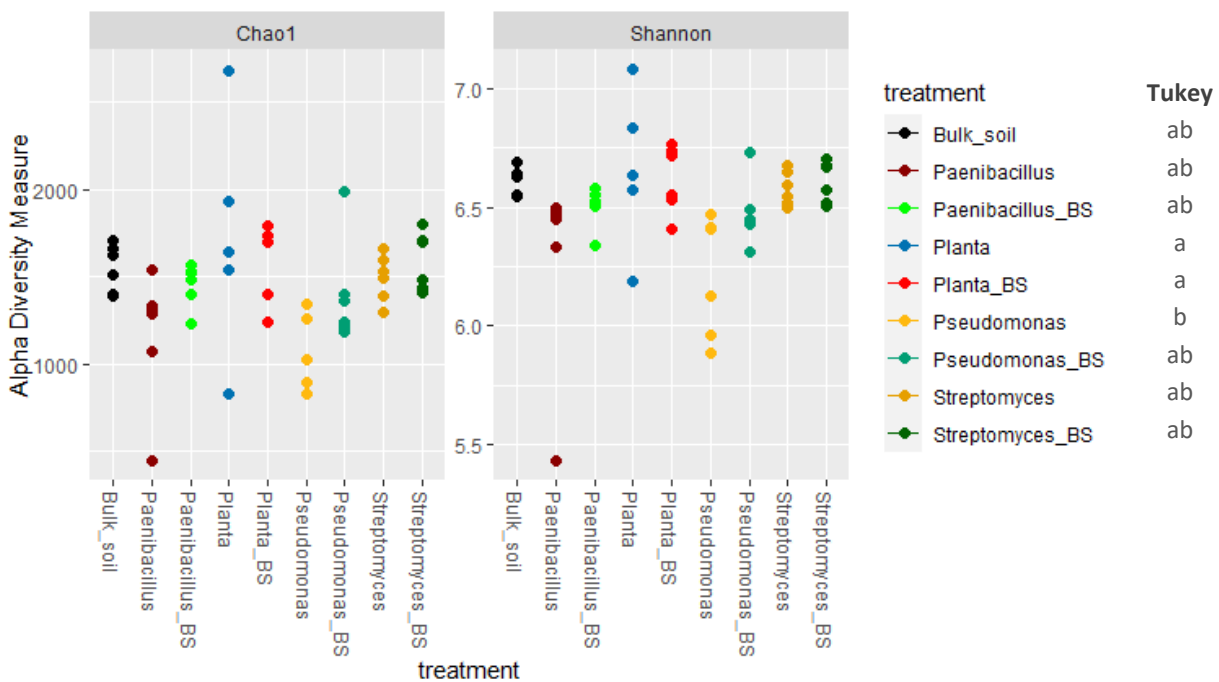


Figura 30 - Medida de alfa-diversidade das comunidades bacterianas de cada tratamento. Índices de Chao1 e Shannon da região V4 da subunidade do gene 16S rRNA. Teste Tukey usando o índice de Shannon ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ($n = 6$).

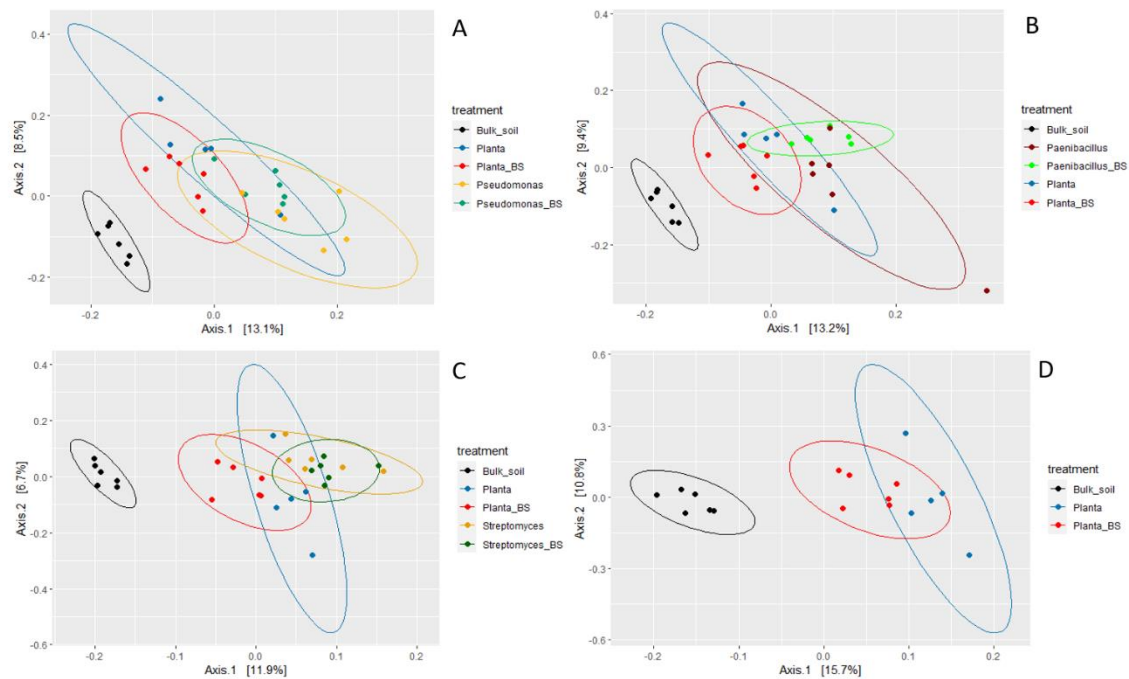


Figura 31 - Beta-diversidade das comunidades bacterianas (16 rRNA) utilizando PCoA e coeficiente de Bray-Curtis. A) Beta-diversidade dos tratamentos com *Pseudomonas* sp.; B) Beta-diversidade dos tratamentos com *Paenibacillus* sp.; C) Beta-diversidade dos tratamentos com *Streptomyces* sp.; D) Controle positivo, negativo e Bulk soil.

O resultado aponta que há diferença no índice de diversidade de Shannon observado entre os tratamentos, com isso, podemos observar que há diferença entre os tratamentos Planta (controle positivo) e o *Bulk soil* (controle neutro) devido ao efeito rizosférico. Também podemos ver similaridade entre o *Bulk soil* e os tratamentos em que foram inoculados patógeno e/ou bactéria, exceto nos tratamentos Planta_BS e Streptomyces_BS e Pseudomonas. O tratamento que foi inoculado apenas Pseudomonas foi o que apresentou menor índice de diversidade de Shannon.

6.3.5 - Análise de abundância relativa e distribuição de taxa fúngicos

As análises taxonômicas (Figura 32 e Figura 33) demonstraram a presença de 5 filos fúngicos, sendo Ascomycota o filo mais abundante. O tratamento controle positivo (planta sem inoculante) foi o que apresentou maior enriquecimento do filo Ascomycota. No tratamento com *Pseudomonas* sp. apresentou maior enriquecimento no filo Basidiomycota, seguido pelo tratamento com *Streptomyces* sp.. Os demais tratamentos não aparentam divergência com o *bulk soil*.

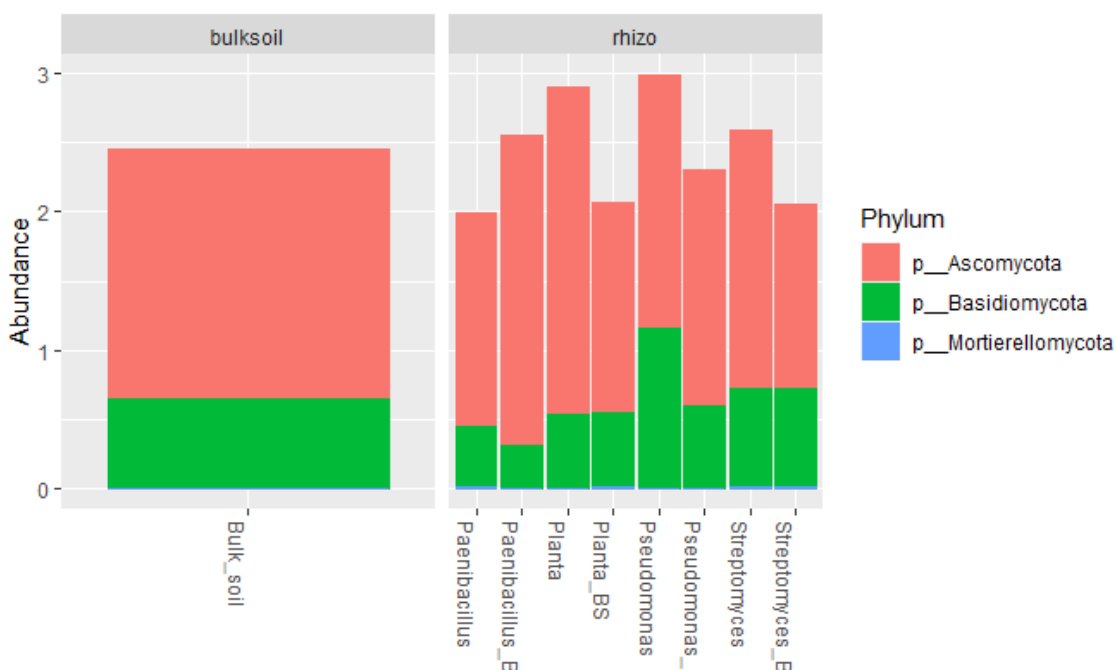


Figura 32 - Distribuição da abundância relativa dos taxa fúngicos (ITS) mostrando os principais filos presentes nos tratamentos.

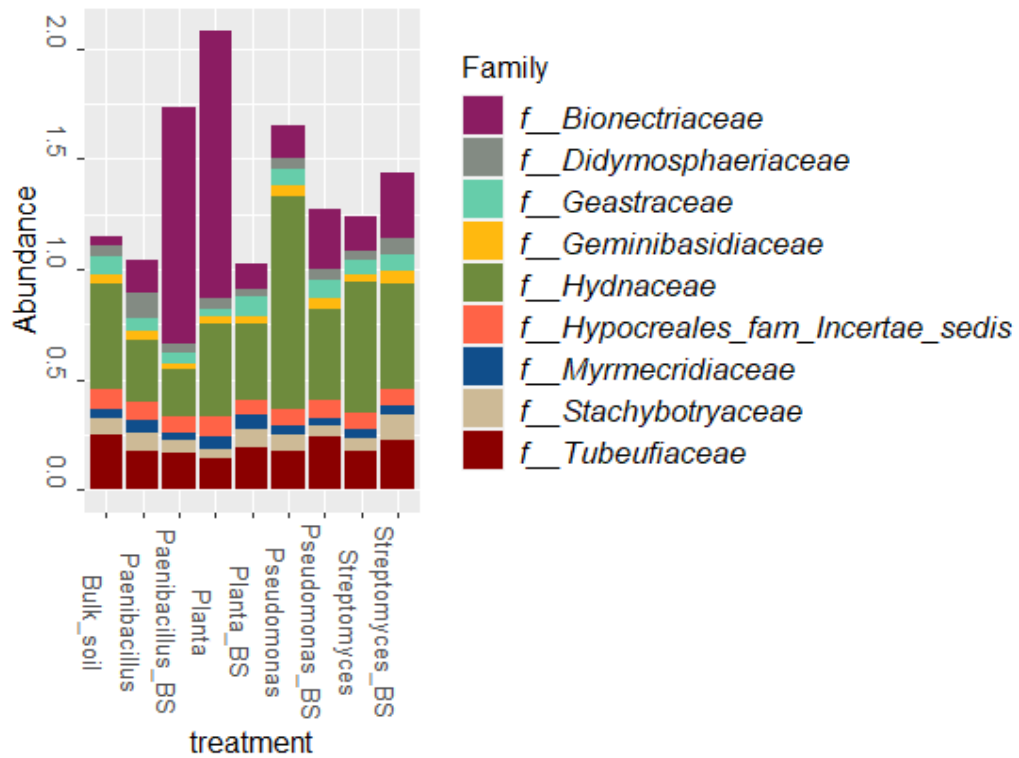


Figura 33 - Distribuição da abundância relativa dos taxa fúngicos (ITS), mostrando as principais famílias presentes nos tratamentos. Alvo, região ITS

6.3.6 Análise de diversidade de fungos

Na análise de alfa-diversidade (Figura 34) podemos observar que na presença da planta a diversidade de fungo tende a diminuir, todavia, os tratamentos com introdução de bactéria ou patógeno apresentam diversidade de fungos maior que o controle positivo (planta sem inoculante), sendo que não divergem do *bulk soil*.

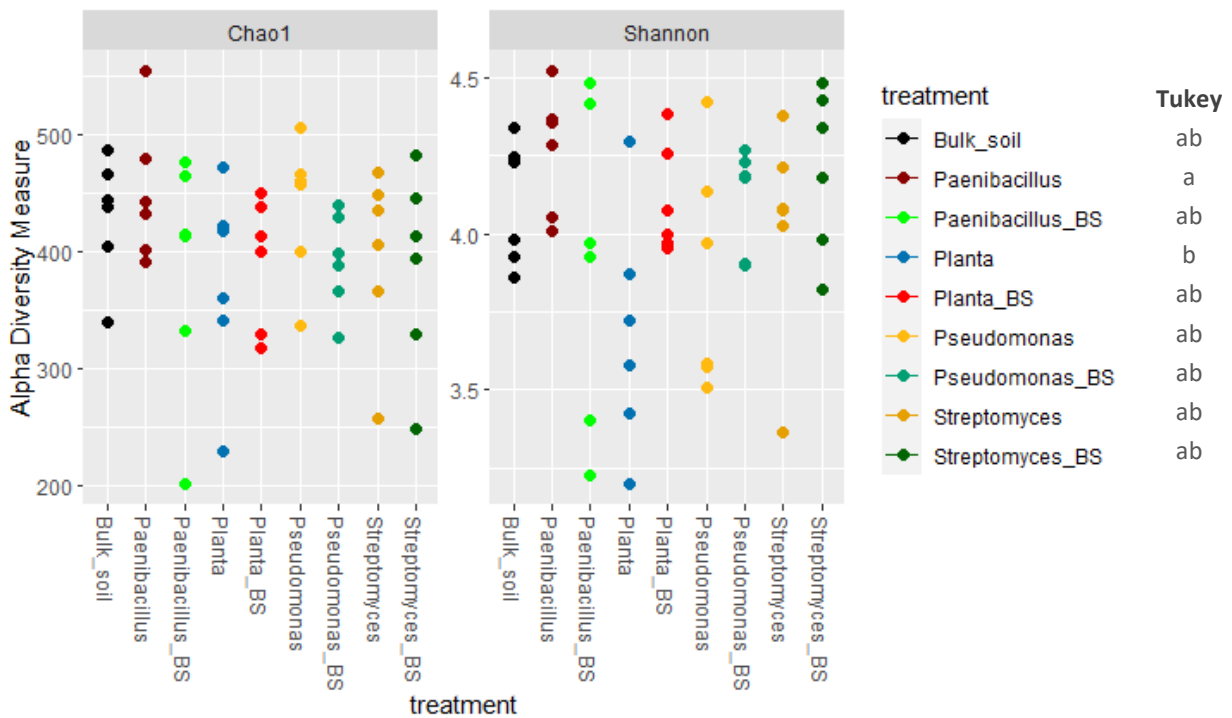


Figura 34 - Medida de alfa-diversidade das comunidades fúngicas de cada tratamento. Índices de Chao1 e Shannon da região ITS1. Teste Tukey usando índice de Shannon ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ($n = 6$).

Foram feitas análises de beta-diversidade (Figura 35) para melhorar a exploração dos dados. Podemos observar, apesar de não tão notável quanto na Figura 28, que o solo rizosférico se difere do *bulk soil*, sendo o solo rizosférico mais diverso. Os demais tratamentos não são possíveis distinguir.

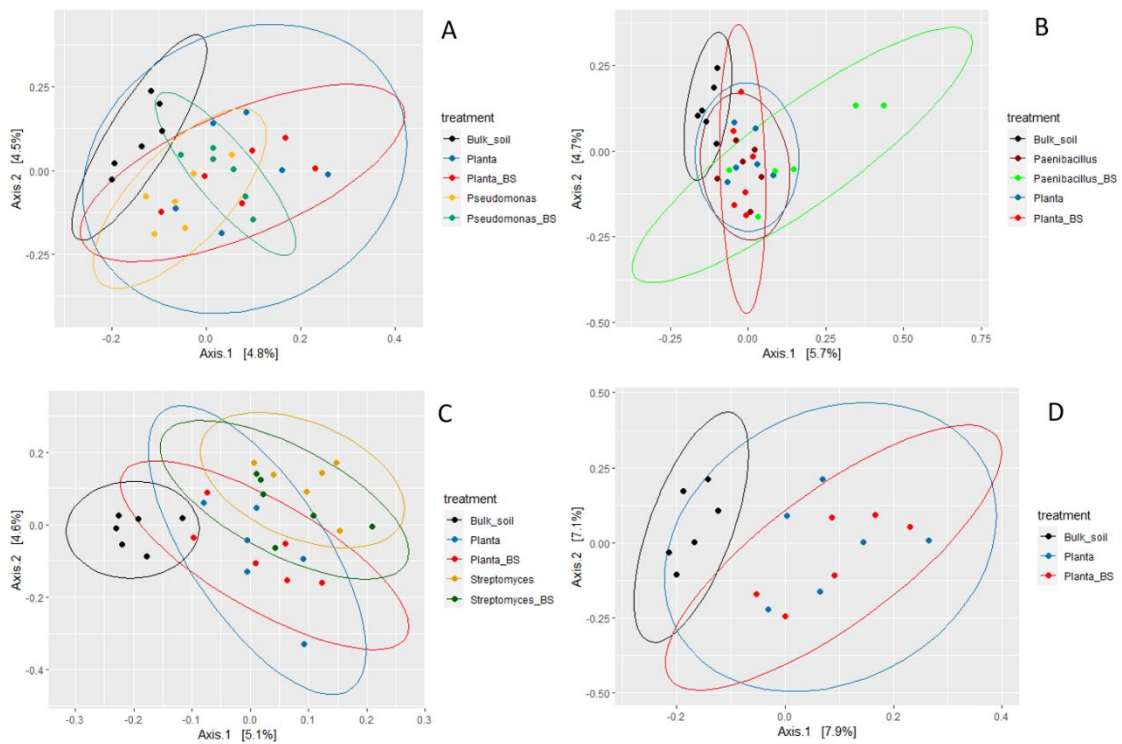


Figura 35 - Beta-diversidade das comunidades de fungos (ITS) utilizando PCoA e coeficiente de Bray-Curtis. A) Beta-diversidade dos tratamentos com *Pseudomonas* sp.; B) Beta-diversidade dos tratamentos com *Paenibacillus* sp.; C) Beta-diversidade dos tratamentos com *Streptomyces* sp.; D) Beta-diversidade dos tratamentos controle.

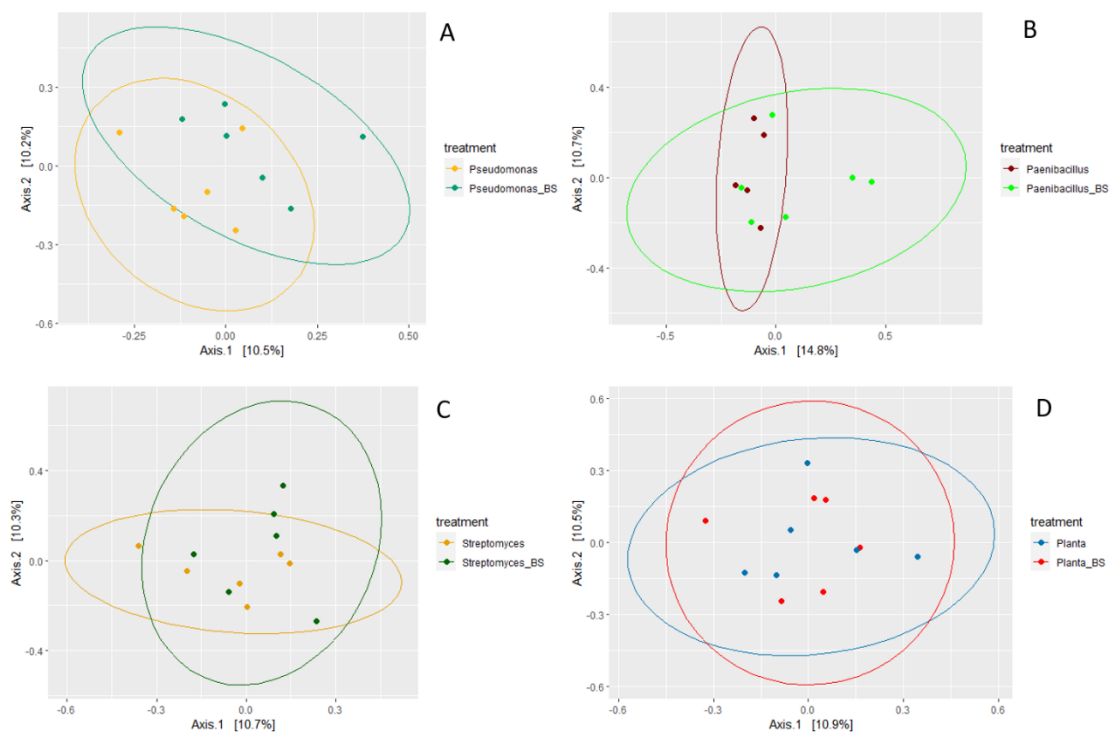


Figura 36 - Beta-diversidade das comunidades de fungos utilizando PCoA e coeficiente de Bray-Curtis. Alvo, região ITS. A) Beta-diversidade dos tratamentos *Pseudomonas* vs *Pseudomonas*+BS.; B) Beta-diversidade dos tratamentos *Paenibacillus* vs *Paenibacillus*+BS.; C) Beta-diversidade dos tratamentos *Streptomyces* vs *Streptomyces*+BS; D) Beta-diversidade dos tratamentos Planta vs Planta+BS.

Na análise de alfa-diversidade (Figura 30) podemos observar que o controle positivo (Planta) foi o tratamento que mais divergiu entre as réplicas ($n = 6$). Todavia, no tratamento onde observamos o *bulk soil* e o controle negativo, onde há plantas com patógeno (BS), demonstram comportamento fidedigno para podermos usar como parâmetro. Observamos uma tendência do tratamento controle positivo apresentar maior alfa-diversidade e o tratamento com *Pseudomonas* sp. sem patógeno apresentar menor alfa-diversidade. Contudo, não podemos afirmar que há diferenças entre os tratamentos que houve inoculação de bactéria. Assim como observado na Figura 26, que demonstrou diferença significativa entre os tratamentos nas análises de qPCR sobre o gene rRNA16S, a análise de alfa-diversidade com os dados de sequenciamento do gene rRNA16 sobre a região V4, sob teste de Tukey usando o índice de Shannon, apresentaram diferenças observáveis entre os controles positivo, negativo e neutro. Sobre a interpretação dos dados de sequenciamento, podemos observar que a introdução dos inoculantes com traços benéficos não interferiu em outras comunidades bacterianas residentes no solo (Figura 28), assim como não interferiu na comunidade de *B. sorokiniana* residente no solo (Figura 32), todavia, forneceu a planta proteção contra doenças (Figura 12).

7. DISCUSSÃO

O microbioma rizosférico do trigo é associado a uma ampla diversidade de bactérias que ocupa diversos nichos funcionais neste ecossistema (KATZNELSON & BOSE, 1959). Esses microrganismos, atraídos pelas raízes, possuem características benéficas incluindo a capacidade de solubilizar fósforo, fixar nitrogênio e promover crescimento de plantas (MENDES et al., 2011; BERENDSEN et al, 2012; CHAPELLE et al., 2015, GODOY, 2020). Ainda que ferramentas moleculares possibilitem a identificação dos grupos enriquecidos nos microbiomas, não há garantia de que esses grupos possam ser resgatados por técnicas tradicionais de cultivo para serem estudados e aplicados como produtos biotecnológicos. A triagem para escolha de inoculante complementar as necessidades das plantas ainda ocorrem por técnicas tradicionais de cultivo e tendo como critério características benéficas que auxiliam as plantas na nutrição, crescimento e defesa. Estudos mostram que a rizosfera é enriquecida por microrganismos com características benéficas, os quais são “chamados” ou “recrutados” para atender demandas fisiológicas das plantas (MENDES et al., 2011; BERENDSEN et al, 2012; CHAPELLE et al., 2015). Dentro de *pool* de microrganismos associados as raízes existem microrganismos que podem ser cultivados em laboratório e manipulados para aplicações tecnológicas (FISCHER *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2008). O filo resgatado com maior frequência é o Proteobacteria, no qual se enquadra o gênero *Pseudomonas* sp.. Muitos dos membros que compõem o grupo de Proteobacterias podem ser cultivados por técnicas tradicionais de cultivo, são grupos cosmopolitas, dominantes em solo de forma global (ANZAI et al., 2000; FISCHER *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2008; DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2018). Para este trabalho foram selecionados isolados bacterianos resgatados a partir da rizosfera de trigo crioulo (genótipos Karakilcik e Iran) sendo uma *Pseudomonas* sp. (Proteobacteria), um *Streptomyces* sp. (Actinobacteria) e um *Paenibacillus* sp. (Firmicutes). Estes grupos são conhecidos pelo potencial de biocontrole contra patógenos fúngicos, sendo que todos esses gêneros de bactérias apresentados possuem boa aptidão para recolonizar as raízes do trigo (JUHNKE *et al.*, 1987, GODOY et al., 2020), portanto, podem ser considerados bons inoculantes.

7.1 Seleção de inoculantes bacterianos antagonistas ao patógeno causador de podridão de raiz

A busca por recursos biotecnológicos para serem aplicados na agricultura sustentável traz a necessidade de garantir a funcionalidade das técnicas de preservação e manutenção das

cepas que serão usadas como inoculantes (SOLA et al., 2012). As características morfológicas e fisiológicas das cepas devem estar em perfeitas condições para serem utilizadas em qualquer momento (SOLA et al., 2012). Para testar a funcionalidade das cepas armazenadas na nossa coleção foi realizado um teste de antagonismo (Figura 7), que confirmou as características fisiológicas que queríamos, entre elas, a finalidade de biocontrole do patógeno *Bipolaris sorokiniana* por meio de inibição.

A resposta observada no teste de inibição feito em placa (Figura 7) poderia ter sido diferente na planta. Isso pode acontecer porque a planta consegue acessar outros recursos além dos microrganismos do solo como também as bactérias podem expressar diferentes perfis funcionais quando cultivadas *in vitro* ou *in planta*. A linha de defesa da planta está atrelada ao estágio de desenvolvimento vegetal, no estágio vegetativo a semente é dependente do microbioma do endosperma, do solo e da fisiologia da germinação. Por outro lado, a planta adulta pode recorrer a outras linhas de defesas bioquímicas como produção de peroxidase em resposta de defesa sistêmica (BERENDSEN et al, 2012; CHAPELLE et al., 2016; FARIA, 2020). No Bioensaio 1 podemos observar que o tempo de germinação influenciou no resultado, a inoculação de patógeno na planta com 14 dias de desenvolvimento apresentou menos sintomas de lesões de doença que as plantas do Bioensaio 2 no qual o patógeno foi inoculado na planta após 7 dias da sementeira.

O marcador taxonômico desse fungo é indicado pelo gene *CosA* (MATUSINSKY et al., 2010; HORNE, 2015), com o foco nesse marcador podemos monitorar a distribuição do gene entre os tratamentos e assim conseguimos observar que ocorre diminuição do número de cópias do gene *CosA* na presença da planta (Figura 27). Em contraste, nos tratamentos com inoculantes bacterianos nas sementes, a distribuição do gene *CosA* não seguiu o padrão observado pelos sintomas causados pela doença, apontado pelo ISD (Figura 12), ou seja, era esperado que as plantas que apresentaram baixo ISD, por exemplo, tivessem menor abundância do gene *CosA*. Isso pode indicar que a bioinoculação de bactérias, além de apresentar traços benéficos para as plantas, não interfere na abundância de fungos residentes no solo. A população de fungos no solo não foi reduzida, no entanto, os sintomas da doença causada pelo fungo foi atenuada ou barrada nas plantas pela presença dos inoculantes bacterianos. Essa observação sugere que o controle da doença não se dá pela diminuição do inóculo no solo, mas pela incapacidade do patógeno infectar e desenvolver a doença na planta hospedeira na presença do inoculante antagonista.

Em relação ao biocontrole do patógeno *Bipolaris sorokiniana* (Figura 12), os resultados do índice de severidade de doenças apresentados após a inoculação de *Streptomyces* sp. não foram melhores dos que apresentados por *Pseudomonas* sp. e *Paenibacillus* sp.. Todavia, podemos observar que a *Streptomyces* sp. pode controlar o patógeno *in vitro* (Figura 7) e isso foi confirmado em bioensaio (Figura 12). Estudos como de Jollès & Muzzarelli, (1999) e Zhang *et al.*, (2000) apontam que as estratégias de *Streptomyces* sp. para o controle de fungos envolvem produção de proteína enzimática quitinase e amilase, isto porque a parede celular do fungo é composta por polissacarídeos, como quitina e quitosina. A enzima quitinase é capaz de clivar o polissacarídeo da parede do fungo em moléculas de baixo peso molecular (oligossacarídeos) comprometendo a estrutura do patógeno (JOLLÈS & MUZZARELLI, 1999; ZHANG *et al.*, 2000). O bom resultado observado na inoculação de *Paenibacillus* sp. pode estar relacionado ao potencial genético desse grupo taxonômico; sabemos que esse gênero de bactéria é relevante para a agricultura. A respeito de promoção de crescimento de plantas, os gêneros *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. vem se destacando nas práticas agrícolas devido ao potencial biotecnológico de produzir fitohormônios, fixar nitrogênio e solubilizar fósforo (GOVINDASAMY *et al.*, 2010). A capacidade desses grupos de formar endósporo garante a habilidade de resistir ao estresse ambiental, o que permite que sejam abundantes no solo e na rizosfera (GOVINDASAMY *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2013). O padrão de formação das colônias de *Paenibacillus* sp. (eg. *P. polymyxa*) no solo é conhecido por modular e estabilizar a comunidade microbiana, dessa forma, estreita a competição espacial sob outros microrganismos no solo (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001). Além disso, os microrganismos do gênero *Paenibacillus* sp. são capazes de sintetizar antifúngicos que degradam quitina, relatados como biocontrolador de *Fusarium moliniforme* e *Fusarium oxysporum* (von der WEID *et al.*, 2003). Neste ponto de vista, aumentar a frequência desses microrganismos no solo, através de bioinoculação, pode ser uma estratégia para recolonizar o solo com microrganismo competitivo com traços benéficos para a planta.

Comparando os tratamentos, o inoculante que apresentaram melhores resultados em relação a promoção de crescimento, além de executar biocontrole contra o patógeno *Bipolaris sorokiniana*, foi o isolado de bactéria do gênero *Pseudomonas* sp. Assim como os outros inoculantes apresentados, este grupo apresenta relevância na agricultura; a importância agrícola do gênero *Pseudomonas* sp. está relacionada com promoção de crescimento de plantas e defesa contra patógenos fúngicos (GUTIÉRREZ-SANTA'ANA *et al.*, 2020). Em vários estudos podemos observar eficiência do gênero *Pseudomonas* sp. no controle de

patógeno residente no solo, como relatado por Urrea et al., 2011 que observou *P. fluorescens* e *P. luteola* sendo eficientes contra o patógeno *Fusarium* sp. (URREA et al., 2011). O patógeno *Bipolaris sorokiniana* pode ser controlado por *P. fluorescens* e *P. lindbergii* (HODGES et al., 1994; DAL-BELLO et al., 2003), enquanto *P. cepacia* e *P. putida* possuem resultados contra *Rhizoctonia solani* (FREITAS & GERMIDA, 1991). Por serem eficientes contra fungos, o uso de *Pseudomonas* sp. como inoculante é uma reconhecida alternativa ao uso de fungicidas e um recurso biotecnológico para controle de doenças. Além disso, *Pseudomonas* sp. são capazes de produzir sideróforos, quelantes de ferro, que modulam o microbioma aumentando a competição dos microrganismos por ferro e, conseqüentemente, aumentam a competição na rizosfera que impedem a invasão de patógenos nas plantas (O'SULLIVAN & O'GARA, 1992).

7.2 Caracterização genética, fenotípica e química dos inoculantes bacterianos antagonistas

Para explorar o potencial genético, foi sequenciado o genoma completo de cada uma das três cepas bacterianas. Cada genoma foi analisado e os clusters de genes de metabólitos secundários putativos foram identificados. A relevância de estudar os *clusters* gênicos dos inoculantes consiste no fato de identificar as estratégias de defesa que a cepas podem utilizar para controlar patógenos.

7.2.1 Caracterização genotípica e fenotípica da cepa CMAA 1741 – *Pseudomonas* sp.

Considerando a cepa CMAA 1741 e o banco de dados do NCBI, há apenas um genoma *P. Inefficax* depositado e disponível para consulta, que quando cruzando as referências com a sequência depositada (Ref.: #66792), podemos observar que não há valor percentual significativo na predição dos compostos no genoma sendo o composto predito mais relevante um NRPS chamado glidopetin (37%). Os demais compostos observados no genoma de referência #66792 também são preditos na cepa CMAA 1741. Como relatado, a cepa CMAA 1741 também não apresentou nenhuma predição de composto com valor percentual significativo. Foram observados a presença de um cluster gênico para o NRPS lankacidin C (13%), um cluster gênico para o redox-cofator crochelin_A (7%) e três clusters gênico para o NRPS pyoverdin (4%). A plataforma Antismash® correlaciona as informações com banco de dados alimentado, limitando a exploração para dados já descritos e disponíveis para acesso,

portanto, outras abordagens são necessárias para explorar o perfil químico e bioatividade desse microrganismo.

Os extratos obtidos no cultivo de *Pseudomonas* sp. em TSB, ISP-3 e BDA foram analisados em UPLC-MS, os resultados apresentados na tabela 5 indicam a presença de Surfactina C, enquanto os volatéis analisados pelo GC-MS apresentaram os compostos identificados pela biblioteca NIST (Tabela 10) onde observamos a ocorrência de compostos xenoestrogênicos como 1-Propanol, 3-bromo-2,2-bis(bromomethyl), cyclobutyl isobutyl ester e Benzenesulfonamide, N-butyl (GROSS et al., 2004; PubChem, 2022). Em relação ao biocontrole, as surfactinas são lipoproteínas comumente encontradas em bacilos e pseudomonas, apresentam atividade antibiótica e surfactante podendo alterar a solubilidade do substrato ou controlar a adesão de microrganismos na superfície (ZAJIC e SEFFENS, 1984; STELLER e VATER, 2000). Os compostos observados pela análise de GC-MS não possuem funções bem elucidadas, todavia, o modelo estatístico (Figura 25) sugere que os compostos relatados (Tabela 10) possuem influência na inibição da *Pseudomonas* sp. sobre *Bipolaris* sp. em condição *in vitro*.

7.2.2 Caracterização genotípica e fenotípica da cepa CMAA 1738 – *Streptomyces* sp.

O genoma da cepa CMAA 1738 foi capaz de predizer 7 clusters gênicos sendo Streptothricin (83%), Coelichelin (100%), Sap_B (100%), Venezuelin (100%), JBIR-126 (100%), Desferroxamine B/E (83%), Alkylresorcinol (100%). Os fenótipos foram confirmados a partir dos extratos obtidos no cultivo nos meios ISP-3, TSB e BDA. Utilizando a análise UPLC-MS foi possível localizar a massa exata da maioria dos compostos preditivos gênicos relacionados à bioatividade, porém não identificamos fragmentação de massa direcionada aos sideróforos coelichelina e desferrioxamina_B, aos antifúngicos alquilresorcinol e JBIR-126 e ao antibiótico estreptotricina. Também foram avaliados compostos voláteis e análises quimiométricas das amostras co-cultivadas que apontou algumas moléculas como potenciais agentes de biocontrole: 2-Methyl-2-bornene (91,80%), Formic acid, 1-methylethyl ester (71,88%), 2-Methylisoborneol (92,43%), Benzene, [1-(2-propenyloxy)-3-butenyl] (81,40%) mostrando grande potencial de biocontrole em razão da bioatividade de químicos e voláteis. 2-Metilisoborneol (MIB) é um monoterpene irregular derivado do precursor geranyl pirofosfato, assim como a geosmina, MIB possuem odor marcante, são produtos característicos de bactérias filamentosas da classe dos actinomicetos

no qual incluem o gênero *Streptomyces* sp. (JUTTNER e WATSON, 2007). A produção de MIB esta associada proliferação de colônias e esporulação de *Streptomyces* sp. (JUTTNER e WATSON, 2007, BECHER et al., 2020).

O papel ecológico desse terpenóide ainda é pouco compreendido, no entanto a conservação do gene de biossíntese de MIB em grande parte das espécies de *Streptomyces* sp. sugere que este VOC fornece vantagem seletiva para esses microrganismos no solo no qual pode desempenhar função de comunicação inter e intraespecífica (BECHER et al., 2020). Em estudo de biocontrole contra *Fusarium* sp. usando *Streptomyces* sp., Wang et al., (2013) reportou a produção de MIB durante a atividade de antibiose sendo relatado como um dos principais compostos antifúngicos. Em contraponto, no estudo de Fravel et al., (2002) que usou o produto MIB para testar biocontrole sobre sclerotinia, verificou que o composto isolado não tem ação antifúngica. Isso fortalece os apontamentos de Juttner & Watson (2007) e Becher et al., (2020) que relatam que MIB está relacionado com a esporulação podendo ser interpretado como resposta de estresse devido a presença de organismo antagônico, sendo assim, uma possível resposta da *Streptomyces* sp. sobre o crescimento do *Bipolaris sorokiniana* (Figura 7) MIB isoladamente não tem atividade antifúngica, mas pode ser gatilho para acionar outras vias metabólicas necessárias para o biocontrole.

Os metabólitos secundários são compostos naturais produzidos em plantas com objetivo principal de proteção a estresses abióticos e bióticos, eventualmente, a biossíntese do mesmo composto ou composto similar pode ocorrer em bactérias (BORGES e AMORIM, 2020). Observamos nas amostras de *Streptomyces* sp. VOC's que inicialmente haviam sido relatados como sendo emitidos por planta como é o caso do composto Formic acid, 1-methylethyl ester. Este VOC foi observado por Tyagi & Agarwal (2017), nesse trabalho o composto foi extraído das folhas, raízes e caule da planta *Pistia stratiotes*. De acordo com o Bancos de Dados Fitoquímicos E Etnobotânicos Dr. Duke's, o composto extraído por Tyagi & Agarwal (2017) teve a bioatividade relatada como sendo potencial antibiótico. Outro exemplo foi o VOC Benzene, [1-(2-propenyloxy)-3-butenyl], este composto foi observado no trabalho de Barakat et al., (2022) como sendo de origem fenólica, extraído de sementes e brotos de erva-doce, o composto teve a bioatividade relatada como sendo um agente antioxidante preservando células de ratos de estresse oxidativo e de danos no DNA. No trabalho de Borrego et al., 2012, foi relatado um sinônimo ao composto nomeado de Trans-anetol (*trans*-Anethole), em sua descrição observamos que é um antibiótico com ação contra bactérias e fungos. Este composto é caracterizado por apresentar propriedades anfífilas, o que permite a interação

com a membrana citoplasmática, fluidos de membrana, proteínas, lipídios, e outras moléculas vitais para as células microbianas (BORREGO et al, 2012). No trabalho de Borrego et al., (2012) foi relatado biocontrole de *Streptomyces* sp. utilizando óleo extraído de semente de anis estrelado (erva-doce). No trabalho Mafakheri & Mirghazanfari (2018), trans-anetol foi extraído da planta hortelã-pimenta e teve efeito de biocontrole sobre *Bipolaris sorokiniana*. Todavia, não havia registro desses compostos sendo produzido por microrganismos.

7.2.3 Caracterização genotípica e fenotípica da cepa CMAA 1739 – *Paenibacillus* sp.

O genoma da cepa CMAA 1739 foi capaz de predizer dois clusters gênico que correspondem ao antifúngico fusaricidin B (100%) e ao antibiotico tridecaptin (100%), desses, apenas fusaricidin B teve a massa exata localizada por meio de UPLC-MS (Figura 20). Os dados dos compostos voláteis, obtidos por GC-MS, foram analisados por quimiometria para identificar os compostos produzidos em co-cultivo que tiveram potenciais para biocontrole (Tabela 9), desses se descaram alguns álcoois, devido ao caráter fermentativo desse microrganismo, e os terpenos trans-.beta.-Ocimene (93,60%) e Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl (92,60%). O modelo estatístico proposto para indicar os compostos relevantes em co-cultivo (Figura 25) apontam para produção dos compostos (Tabela 10) Phenol, 4-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl- relatado Romero-Correa et al., (2014) como sendo um composto induzido pelo ácido araquidônico e atua na inibição de peróxido de hidrogênio produzido por patógenos, Butylated Hydroxytoluene é um composto etanólico com efeito antibiótico de amplo espectro (atinge gram positiva e negativa) sendo muito usado na indústria alimentícia como conservante devido as propriedades antibióticas (BHATT et al., 2018). De acordo com a plataforma PubChem (2022), o composto 2-Octenoic acid, 4-isopropylidene-7-methyl-6-methylene-, methyl ester é uma ácido oleanólico e tem atividade relatada sobre crioproteção. O composto Benzene, (1,1-diethylpropyl) é um ácido iônico pertencente ao grupo dos Alkylpheols, tem função detergente e em altas concentrações tem efeito xenoestrogênico (WANG et al., 2014). Por fim., o composto 3,4-Methylenedioxymandelic acid é uma ácido mandálico cuja função é antibiótica com alcance de amplo espectro, é usado como fármaco sendo que suas propriedades tem efeito contra infecções urinárias (PubChem, 2022). Em teste *in vitro* a cepa CMAA 1739 (*Paenibacillus* sp.) foi o antagonico que apresentou melhor performance de inibição alterando o padrão de crescimento do fungo e mudando a coloração das hifas. A presença de antibióticos produzidos

pela bactéria *Paenibacillus* sp. poderia ser uma justificativa do estresse causado sobre o fungo *Bipolaris* sp (Figura 7) e ao fungo *Fusarium* sp. (Anexo I), o mesmo efeito de inibição também foi observado por Carvalho et al., 2018 para bactérias *Paenibacillus* sp (CMAA 1738). e *Streptomyces* sp. (CMAA 1739), porém, o efeito de inibição para *Pseudomonas* sp. (CMAA 1741) foi relatado apenas nesse trabalho. Em resumo, assim como os demais inoculantes utilizados nesse ensaio, *Paenibacillus* sp. também foi capaz de barrar a doença desenvolvida por *Bipolaris sorokiniana* (Figura 9, Figura 12), mostrando bom desempenho tanto *in vitro* (Figura 7) quanto no bioensaio e apresentando moléculas bioativas durante esse processo (Tabelas 4, 5 e 6).

7.2.4 Caracterização fenotípica do patógeno – *Bipolaris sorokiniana*

Através das análises de UPLC verificamos que a principal estratégia do fungo está voltada para produção de terpenos. Os compostos Cloqueoquina_A e Anidrocloquioquina_A são característicos do gênero *Bipolaris*. Sendo uma das principais ferramentas de infecção sobre cereais como trigo e cevada (Phuwapraisirisan et al., 2007). Apesar de ser uma ferramenta de infecção, o composto Anidrocloquioquina_A possui propriedades antibióticas podendo ter efeito de antibiose sobre outros microrganismos. Outro composto presente foi o carofileno Walleminone, este composto geralmente é associado ao basidiomyceto *Wallemia* spp. (ZALAR et al., 2005), contudo, podemos observar precisão na identificação do composto exsudado por *Bipolaris sorokiniana* no espelho da biblioteca do GNPS (Figura 23b). O trabalho de Aminundi et al., (2022) relata que o composto Walleminone possui propriedades antibióticas podendo ser um mecanismo de antibiose para outros microrganismos. Por fim, outra estratégia reconhecida é o uso de surfactina que de acordo com Steller e Vater (2000) pode modificar a solubilidade do meio e moldar a adesão ao substrato. A mesma estratégia foi observada para as *Pseudomonas* sp. (Figura 24) isso pode justificar a menor eficiência em controlar o patógeno *in vitro* (Figura 7) e maior eficiência em controle de patógeno em bioensaio (Figura 9 e Figura 12) uma vez que surfactina pode ser um indutor de resistência sistêmica em plantas (DEBOIS et al., 2015).

7.3 Impacto da inoculação de bactérias benéficas na estruturação do microbioma da rizosfera durante a invasão pelo fungo patogênico

Considerando que os tratamentos referentes ao controle positivo (Planta) e controle negativo (Planta+BS) são consistentemente diferentes, podemos sugerir que a presença da planta altera o microbioma do solo confirmando o efeito rizosférico (Figura 30). Outra observação que podemos destacar é que o tratamento referente ao controle negativo (Planta+BS) difere dos tratamentos inoculados com a bactéria, indicando que a estrutura do microbioma da rizosfera é influenciada diferentemente quando há inoculação com o patógeno ou com a bactéria benéfica. Apesar disso, não houve divergência entre os todos os tratamentos que foram inoculadas bactéria incluindo os tratamentos que foram inoculados bactéria e patógeno, isto indica que o efeito da bactéria na estruturação das comunidades biológicas pode prevalecer sobre o efeito da inoculação simultânea do patógeno. Por fim, percebemos que a introdução de inoculante (benéfico ou patogênico) altera o comportamento natural da estruturação de bactérias gerenciado pela planta, observamos que as amostras do tratamento que se refere ao controle positivo (Planta) parecem ser mais dispersas quando comparadas aos demais tratamentos inoculados com microrganismos, indicando que a inoculação com o patógeno, com a bactéria benéfica ou ambos, levou a uma homogeneização das amostras em cada um desses tratamentos.

A estabilidade da cepa CMAA 1741 como inoculante foi observada por Godoy (2020) no genótipo comercial de trigo BRS Parrudo, os resultados mostraram que com a inoculação de *Pseudomonas* sp. houve aumento da classe de Gammaproteobacteria (filo Proteobacteria, qual pertencem ao gênero *Pseudomonas* sp.), porém, ao decorrer dos dias após a inoculação, a abundância desse táxon na rizosfera diminuiu. Apesar de Godoy (2020) observar diminuição de Gammaproteobacteria ao decorrer dos dias, a quantidade ainda foi maior que apresentada inicialmente no solo demonstrando que o grupo introduzido foi somado à comunidade natural. Em resposta à inoculação de *Pseudomonas* sp. no genótipo de trigo Parrudo, houve enriquecimento da classe Oscillatoriothycidae, e conseqüentemente, aumento do ganho de biomassa pela planta. Algumas rizobactérias são conhecidas como promotoras de crescimento, tal como *Pseudomonas* sp. e *Streptomyces* sp. (HAAS & DÉFAGO, 2005; ANDREOTE & CARDOSO, 2016). Com o uso de *Pseudomonas cepacia* e *P. putida* como inoculante no genótipo de trigo argentino cv. *Norstar*, foi relatada promoção de crescimento de 128% da biomassa das raízes e 48% da biomassa da parte aérea da planta (FREITAS & GERMIDA, 1991). Segundo os autores, este crescimento pode ter sido estimulado por um

efeito de antibiose causado durante a invasão do patógeno *Rhizoctonia solani* no tecido da planta (FREITAS & GERMIDA, 1991). Além disso, Freitas e Germida (1991) também observaram que após a inoculação dos isolados houve produção de sideróforos, aumentando a concentração de ferro e da disponibilidade de fósforo por efeito do inoculante. Esperávamos observar promoção de crescimento com nossas inoculações, no entanto, em ambos os ensaios (bioensaio 1 e bioensaio 2), não foram observadas diferenças significativas em relação a ganho de massa no fenótipo das plantas, embora tenha havido uma tendência de aumento de biomassa com a inoculação de *Streptomyces* sp. Isso pode ter acontecido pelo tempo do experimento ser demasiadamente curto para verificar esses atributos, ou que, conforme relatado em Godoy (2020), existe um efeito dependente do genótipo para os inóculos utilizados.

Outro ponto interessante está voltado ao índice de diversidade, o aumento da abundância de Gammaproteobacteria observada por Godoy (2020) foi acompanhada pela redução da alfa-diversidade. Contudo, Godoy (2020) observou que ao decorrer dos dias, com a estabilização do inoculante, a alfa-diversidade regride ao índice de Simpson inicial (antes da inoculação). Isso pode indicar que a cepa CMAA 1741 oferta funções benéficas para a planta sem reduzir a diversidade natural do microbioma do genótipo BRS Parrudo. Em relação a abundância relativa dos taxa, observamos resultados similares (Figura 28), ao final do ensaio observamos que o enriquecimento do filo Proteobacteria foi sutil, porém maior que apresentado no *bulk soil*, seguido acompanhado pelo enriquecimento de Actinobactéria. Em relação à alfa-diversidade, houve redução observada pelo índice de Shannon, similar quando comparado com o mesmo índice em Godoy (2020), todavia, de acordo com o teste Tukey, o tratamento apenas com *Pseudomonas* sp., foi o que apresentou menor diversidade com base no índice de Shannon. Nesse ponto de vista, o resultado diverge do apresentado por Godoy (2020), mostrando que devido ao efeito do genótipo da planta, o estabelecimento do inoculante pode apresentar padrão diferente. Outro ponto que vale destacar é que os tratamentos “*Pseudomonas*” e “*Pseudomonas*+BS” se separam na análise de beta-diversidade (Figura 31) indicando que a introdução do fungo, e o aumento da competição, alteram a beta-diversidade na rizosfera.

Em relação à estabilidade da cepa CMAA 1738, Godoy (2020) observou que quando inoculado no genótipo de trigo BRS Parrudo, a abundância relativa de Actinobacteria quanto aos índices de diversidade de Shannon e Simpson se mantiveram altos ao longo do ensaio, nas análises recorrentes pós inoculação, indicando que o inoculante colonizou as raízes do trigo.

Sobre o trabalho de Godoy (2020), o aumento da abundância relativa de Actinobacteria acompanhou o aumento do grupo Bacilli o que indica que a introdução de *Streptomyces* sp. causou uma reestruturação na comunidade natural. No genótipo BRS Guamirim não obtivemos esse resultado, observando o índice de Shannon (Figura 30) verificamos alteração na diversidade entre os tratamentos *bulk soil* e “Streptomyces+BS” com o tratamento “Streptomyces”, podendo sugerir que a inoculação de *Streptomyces* sp. não alterou a alfa-diversidade, porém há mudança na diversidade quando se introduz a competição com o patógeno (Streptomyces+BS). Todavia, foi observado discriminação em relação a beta-diversidade (Figura 31) apontando que os tratamentos “Streptomyces” e “Streptomyces+BS” divergem do grupo Planta+BS (controle negativo), sugerindo que a inoculação de *Streptomyces* sp. possui mais efeito na estruturação da comunidade de bactérias do que a inoculação do fungo *Bipolaris sorokiniana*.

Em relação a estruturação da comunidade bacteriana da rizosfera, Godoy (2020) havia observado que a inoculação de *Paenibacillus* sp. no genótipo de trigo BRS Parrudo gerou reestruturação sobre a classe Bacilli mostrando que o grupo aumenta a frequência após a inoculação, se fixa e se estabiliza sobre a comunidade natural. Esse feito pode estar relacionado com a forma como *Paenibacillus* sp. coloniza o solo como observado por BLOEMBERG & LUGTENBERG (2001). A inoculação de *Paenibacillus* sp. no genótipo BRS Guamirim (Figura 29) não favoreceu o grupo Bacilli, em vez disso observamos enriquecimento dos grupos de Proteobacteria e Actinobacteria (Figura 28).

Apesar do recrutamento dos microrganismos para formação do microbioma da rizosfera ser dependente de genótipo (ROSSMANN et al., 2020; GODOY, 2020), a posição topológica de alguns grupos biológicos é recorrente em relação à abundância relativa de taxa, ou seja, os mesmos grupos de microrganismos são observados em diferentes trabalhos (FARIA et al., 2018; COSTA et al., 2019; ROSSMANN et al., 2020; GODOY, 2020). Por exemplo, nos trabalhos de Faria et al, (2018), Costa et al., (2019), Rossmann et al., (2020) e Ossowicki et al., (2020) com genótipo de trigo crioulo e moderno, nos trabalhos de Godoy (2020) com genótipos de trigo comerciais e até mesmo em outras plantas como beterraba (MENDES et al., 2011) e tomate (KWAK et al., 2018) a ocorrência do filo Acidobacteria é observada na centralidade da topografia das redes Vde interações, o que permite supor que o filo acidobacteria seja importante para a formação da rizosfera. Rodrigues et al., (2013) descreve o grupo de Acidobacterias como sendo pioneiras na colonização do solo após o revolvimento

(*turnover*), o táxon tem vantagem em ocupar novos nichos desempenhando o papel de sucessão ecológica primária, é o grupo que irá estabelecer condições para inserção de outros grupos naquele *habitat*, como por exemplo, o ambiente rizosférico, auxiliando na formação da rizosfera. No trabalho de Faria et al., (2018) e Costa et al., (2019) foi relatado que com a introdução do patógeno no sistema houve enriquecimento do filo Choloroflexi no microbioma do trigo dos genótipos modernos BRS Guamirin e Frontana e no genótipo crioulo Karakilcik. O filo enriquecido (Choloroflexi) pode estar envolvido com a linha de defesa da planta, cujo recrutamento de benéficos foi uma resposta antagônica à infecção do patógeno ou de supressividade induzida. No trabalho de Mendes et al. (2011), apontou que os principais grupos relacionados à supressão de doenças em beterraba eram os filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, todavia, também foi identificado a ocorrência do filo Choloroflexi, a sugestão em questão é que, apesar de não ser o filo mais abundante, o grupo Choloroflexi compõem o *core* responsável pela defesa da planta. Situação similar foi relatada no trabalho de Ossowicki et al. (2020) no qual observou o efeito de supressividade do solo a *Fusarium* spp. em plantio de trigo, nesse caso foi feita uma análise de rede no qual verificou o compartilhamento do táxon Acidobacteria com os solos supressivos, todavia, também há ocorrência do filo Choloroflexi, que apesar de não ter centralidade topográfica nesta análise, sabe-se do potencial desse grupo para suprimir doenças causadas por patógenos de solo como relatado por Faria et al., (2018) e Costa et al., (2019). Em nosso ensaio observamos que os filos mais abundantes foram o de Proteobacteria, que aumentou em todos os tratamentos que houve alguma inoculação (bactéria ou patógeno), seguido pelos filos Bacterioidota, Actinobacteriota e Firmicutes. Apesar do filo Choloroflexi poder ser observado na análise, não é o grupo mais abundante. Comparando nosso ensaio com os trabalhos de Costa et al., (2019) e Faria (2020), a ausência do Choloroflexi como o mais abundante pode sugerir que os grupos taxonômicos relevantes para o controle da doença se alterem ao decorrer dos ciclos de plantio ou necessidade fisiológica da planta ou devido aos grupos realizarem a mesma função (proteção contra doença) não há preferência sobre o táxon, sendo assim é recrutado o grupo mais abundante no solo que atenda às necessidades da planta.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dentro dos objetivos propostos foi possível (i) identificar bactérias antagonicas ao fungo *B. sorokiniana*, previamente isoladas da rizosfera do trigo, por meio do ensaio *in vitro*, (ii) confirmar o efeito das bactérias antagonicas selecionadas no ensaio *in vitro* em bioensaio, (iii) sequenciar e anotar o genoma das bactérias selecionadas, (iv) avaliar o perfil químico das bactérias selecionadas, (v) estudar a distribuição, abundância e diversidade dos taxa de bactérias no solo com e sem inoculação de microrganismos.

Apesar de BRS Guamirim ser suscetível ao fungo *B. sorokiniana* e de termos dado vantagem ao patógeno na inoculação, os resultados demonstraram a eficiência dos inoculantes em diminuir a incidência da doença nos tratamentos que tiveram patógeno inoculado e evitaram manifestação tardia de doença causada pelos conídios dormentes no solo.

A anotação dos genomas das bactérias antagonistas associada às análises químicas revelaram o potencial metabólico apresentado por cada bactéria selecionada para este estudo. Apesar de detectar as massas exatas, as informações dos metabólitos secundários preditos no genoma não foram confirmadas pelo perfil químico detectado via UPLC-MS devido à ausência de fragmentação MS/MS. Por outro lado, foi possível detectar o perfil químico de cada inoculante e identificar moléculas bioativas envolvidas no processo de antagonismo *in vitro* através de UPLC-MS e GC-MS.

Por fim, estudamos e analisamos a diversidade e distribuição dos taxa no microbioma da rizosfera nos tratamentos com e sem inoculação de microrganismos, concluímos que não houve diferença significativa entre os tratamentos considerando a comunidade bacteriana. A análise de alfa-diversidade sobre a região V4 do gene rRNA16S também não apresentou discriminação sob os tratamentos submetidos. Apesar da alfa e beta diversidade não sejam discriminantes, observamos que a abundância relativa das comunidades bacterianas do microbioma da rizosfera é impactada tanto pela inoculação do patógenos quanto pela inoculação das bactérias antagonistas. Por outro lado, o componente fúngico do microbioma é menos afetado com a introdução do patógeno ou das bactérias antagonistas.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.. **Introducción a la microbiología del suelo**. México: libros y Editoriales, 1980.

ALLEN, A.E.; BOOTH, M.; VERITY, P.G.; FRISCHER, M. Influence of nitrate availability on the distribution and abundance of heterotrophic bacterial nitrate assimilation genes in the Barents Sea during summer. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 39, n. 3, p. 247-255, 2005.

AMADOR, M.L., JIMENO, J., PAZ-ARES, L., CORTES-FUNES, H., M. HIDALGO. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Annals of Oncology* (2003) 14:1607-1615.[2] Kijjoa A and P Sawangwong. Drugs and cosmetics from the sea (review paper). **Mar. Drugs** 2004:73-82.

ANDREOTE, F. D. ; CARDOSO, E. J. B. N.. Introdução à biologia do solo. **Microbiologia do solo**, 1(2), 9-22. 2016.

ANGOLINI, C. F., GONÇALVES, A. B., SIGRIST, R., PAULO, B. S., SAMBORSKY, M., CRUZ, P. L., OLIVEIRA, L. G. D. Genome mining of endophytic *Streptomyces wadayamensis* reveals high antibiotic production capability. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27, 1465-1475, 2016.

ANZAI, Y; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 1563–89., 2000.

APPRILL, A.; MCNALLY, S.; PARSONS, R.; WEBER, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, p. 129–137, 2015.

ASHRAF, N., BECHTHOLD, A., ANWAR, M. A., GHOURI, M. A., ANJUM, M. S., KHAN, A. N., KHALIQ, S. Production of a broad spectrum streptothricin like antibiotic from halotolerant *Streptomyces fimbriatus* isolate G1 associated with marine sediments. **Folia Microbiologica**, 1-11, 2021.

AVALOS, M., GARBEVA, P., VADER, L., VAN WEZEL, G. P., DICKSCHAT, J. S., ULANOVA. Biosynthesis, evolution and ecology of microbial terpenoids. **Natural Product Reports**, v. 39, n. 2, p. 249-272, 2022. Doi.org/10.1039/D1NP00047K

BADRI, D. V., DE-LA-PEÑA, C., LEI, Z., MANTER, D. K., CHAPARRO, J. M., GUIMARÃES, R. L., VIVANCO, J. M. Root secreted metabolites and proteins are involved in the early events of plant-plant recognition prior to competition. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46640, 2012.

BADRI, D. V., WEIR, T. L., van der LELIE, D., VIVANCO, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. **Current opinion in biotechnology**, 20(6), 642-650.

BAKER, K. F., and COOK, R. J. (1974). **Biological control of plant pathogens** (San Francisco, USA: WH Freeman and Company). doi: 10.1017/S001447970000661X

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BECHER, P. G., VERSCHUT, V., BIBB, M. J., BUSH, M. J., MOLNÁR, B. P., BARANE, E., FLÄRDH, K. Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 821-829, 2020.

BECHER, P. G., VERSCHUT, V., BIBB, M. J., BUSH, M. J., MOLNÁR, B. P., BARANE, E., FLÄRDH, K. Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 821-829, 2020.

BEHSAZ, B., MOHIMANI, H., GUREVICH, A., PRJIBELSKI, A., FISHER, M., VARGAS, F., PEVZNER, P. A. De novo peptide sequencing reveals many cyclopeptides in the human gut and other environments. **Cell Systems**, v. 10, n. 1, p. 99-108. e5, 2020.

BENAUD, N., EDWARDS, R. J., AMOS, T. G., D'AGOSTINO, P. M., GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, C., MONTGOMERY, K., FERRARI, B. C. Antarctic desert soil bacteria exhibit high novel natural product potential, evaluated through long-read genome sequencing and comparative genomics. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 3646-3664, 2021.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Micfobiome**, v. 8, n. 103, p. 1-22, 2020. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0

BHATT, V., KUMAR, M., SELVAM, P. Antimicrobial effect of ajwain seed ethanolic extract against food borne pathogenic bacteria. **Int Food Res J**, v. 25, n. 3, p. 908-12, 2018.

BLIN, K.; SHAW, S.; KLOOSTERMAN, A.M.; CHARLOP-POWERS, Z.; WEEZEL, G.P.V.; MEDEMA, M.H.; WEBER, T. **Nucleic Acids Research**, 2021.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG B.J.. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr Opin Plant Biol** , 4:343-350. 2001.

BORREGO, S., VALDÉS, O., VIVAR, I., LAVIN, P., GUIAMET, P., BATTISTONI, P., BORGES, P. Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

BRANDÃO, E.M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C. (Eds.). **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992, p.1-15.

CALLAHAN, B J, MCMURDIE, P J, ROSEN, M J, HAN, A W, JOHNSON, A J A, HOLMES, S P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods** 13, 581-583, 2016. DOI: 10.1038/nmeth.3869

CARVALHO, J. C.; COSTA, L.; CHIARAMONTE, J.; ROSSMANN, M.; MENDES, R.. Impacto da domesticação do trigo em sua interação com bactérias benéficas da rizosfera. In Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**. Anais. Campinas: Instituto Agrônômico, N° 18407, 2018.

CHACHAIYA, P. K., MEHTA, G. Evaluation of Secondary Metabolites in Wheat Grain (*Triticum Sp.*) Grown in Humid South Eastern Plain Zone of Rajasthan (India). *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 249-260, 2019.

CHAPELLE, E.; MENDES, R.; BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. **The ISME Journal**, v. 10, p. 265-268, 2016.

CHAUMEIL, P.-A.; MUSSIG, A.J.; HUGENHOLTZ, P.; PARKS, D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1925-1927, 2019.

CHEN, J. H., XIANG, W., CAO, K. X., LU, X., YAO, S. C., HUNG, D., LI, L. B. Characterization of volatile organic compounds emitted from endophytic Burkholderia cenocepacia ETR-B22 by SPME-GC-MS and their inhibitory activity against various plant fungal pathogens. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3765, 2020.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **bioRxiv**, 2018.

CHENG, A.X.; LOU, Y.G.; MAO, Y.B.; LU, S.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.* 2007, 49, 179–186.

CHOI, S. K., PARK, S. Y., KIM, R., LEE, C. H., KIM, J. F., PARK, S. H. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 365, n. 1, p. 89-95, 2008.

COCHRANE, S. A., LOHANS, C. T., VAN BELKUM, M. J., BELS, M. A., VEDERAS, J. C. Studies on tridecaptin B 1, a lipopeptide with activity against multidrug resistant Gram-negative bacteria. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 21, p. 6073-6081, 2015.

COSTA, L. S. A. S.; FARIA, M. R. ; CHIARAMONTE, J. B. ; MAUCLINE, T. ; BETTIOL, W. ; MENDES, R. . Wheat rhizosphere bacterial communities and protection against root rot caused by *Bipolaris sorokiniana*. In: 51 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2019, Recife. 51 **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**,, 2019.

CUCCURU, G.; ORSINI, M.; PINNA, A.; et al. Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. **Bioinformatics**, v. 30, n. 13, p. 1928-29, 2014.

CUNHA, G. R.; CAIERÃO, E.; ROSA, A. C. Informações técnicas para trigo e triticale–safra 2015. **Brasília, DF: Embrapa**. 2014.

DAL BELLO, G. M.; SISTERNA, M. N.; MONACO, C. I. Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight. **International journal of pest management**, v. 49, n. 4, p. 313-317, 2003.

DAS, A., SATYAPRAKASH, K., DAS, A. K.. Extremophilic Fungi as a Source of Bioactive Molecules. In: **Extremophilic Fungi**. Springer, Singapore, 2022. p. 489-522.

DAVIS, E. e CROTEAU, R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. **Biosynthesis**, p. 53-95, 2000.

DELGADO-BAQUERIZO, M., OLIVERIO, A. M., BREWER, T. E., BENAVENT-GONZÁLEZ, A., ELDRIDGE, D. J., BARDGETT, R. D., FIERER, N.A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, v. 359, n. 6373, p. 320-325, 2018.

DENG, S., LIU, Y., DENG, Z., & HUANG, Y. Isolation of actinobacterial endophytes from wheat sprouts as biocontrol agents to control seed pathogenic fungi. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 10, p. 6163-6171, 2021.

DIMKIĆ, I., JANAKIEV, T., PETROVIĆ, M., DEGRASSI, G., FIRA, D. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 117, p. 101754, 2022.doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754

DINI-ANDREOTE, F.. Endophytes: The Second Layer of Plant Defense. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 4, p. 319-322, 2020.

DUTCHER, James D. The discovery and development of amphotericin B. **Diseases of the Chest**, v. 54, p. 296-298, 1968.

ERICKSON, K. L., GUSTAFSON, K. R., MILANOWSKI, D. J., PANNELL, L. K., KLOSE, J. R., BOYD, M. R. Myriastramides A–C, new modified cyclic peptides from the Philippines marine sponge *Myriastra clavosa*. **Tetrahedron**, v. 59, n. 51, p. 10231-10238, 2003.

FARIA, M. R. D. Dinâmica da comunidade bacteriana da rizosfera de trigo durante à infecção por *Bipolaris sorokiniana*. Tese. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, 2020.

FARIA, M. R. ; COSTA, L. S. A. S. ; CHIARAMONTE, J. B. ; ROSSMAN, M. ; BETTIOL, W. ; MENDES, R. . Rhizosphere Bacterial Communities as A Strategy In Wheat Protection Against Root Rot Caused By *Bipolaris sorokiniana*. In: XVIII **Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas 'Biotecnologia aplicada a Fitopatologia'**, 2018, Lavras. "Biotecnologia aplicada a Fitopatologia", 2018.

FERRARI, J. T. Incidência de *Bipolaris sorokiniana* nas sementes e a transmissão para plantas de cevada. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2002.

FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952, 2014.

FISCHER, S. E., FISCHER, S. I., MAGRIS, S., MORI, G. B. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 895-903, 2007.

FRANK, M., KINGSTON, E., JEFFERY, J. C., MOSS, M. O., MURRAY, M., SIMPSON, T. J., SUTHERLAND, A. Walleminol and walleminone, novel caryophyllenes from the toxigenic fungus *Wallemia sebi*. **Tetrahedron letters**, v. 40, n. 1, p. 133-136, 1999. doi.org/10.1016/S0040-4039(98)80039-7

FRAVEL, D. R., CONNICK, W. J., GRIMM, C. C., LLOYD, S. W. Volatile compounds emitted by sclerotia of *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3761-3764, 2002.

FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J.. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Microbiology**, 37, 780 – 784, 1991.

FRITZ, J. S.; MACKA, M.. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 137-166, 2000.

GAO, M.; YANG, H.; ZHAO, J.; LIU, J.; SUN, Y. H.; WANG, Y. J.; SUN, J. G.. *Paenibacillus brassicae* sp. nov., isolated from cabbage rhizosphere in Beijing, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 3, p. 647-653, 2013.

GEURTS, B. P.; NEERINCX, A. H.; BERTRAND, S.; LEEMANS, M. A.; POSTMA, G. J.; WOLFENDER, J. L. & JANSEN, J. J.. Combining ANOVA-PCA with POCHEMON to analyse micro-organism development in a polymicrobial environment. **Analytica chimica acta**, v. 963, p. 1-16, 2017.

GODOY, F. A. Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera. Dissertação. Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 2020. <https://doi.org/10.11606/D.11.2020.tde-18052020-141913>

GÓRSKI, A., KASPRZYCKA, M., NOWACZYK, M., WIECZORECK, Z., & SIEMION, I. Z.Cyclolinopeptide: a novel immunosuppressive agent with potential anti-lipemic activity. In: **Transplantation proceedings**. 2001.

GOVINDASAMY, V.; SENTHILKUMAR, M.; MAGHESHWARAN, V.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA, V.; ANNAPURNA, K.. *Bacillus and Paenibacillus spp.*: potential PGPR for sustainable agriculture. In: **Plant growth and health promoting bacteria**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 333-364, 2010.

GROSS, B., MONTGOMERY-BROWN, J., NAUMANN, A., REINHARD, M. Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 23, n. 9, p. 2074-2083, 2004.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.

GUTIÉRREZ-SANTA'ANA, A.; CARRILLO-CERDA, H. A.; RODRIGUEZ-CAMPOS, J.. Volatile emission compounds from plant growth-promoting bacteria are responsible for the antifungal activity against *F. solani*. **3 Biotech** 10, 292, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02290-6>.

HAAS, D. & DÉFAGO, G.. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature reviews microbiology**, 3(4), 307. 2005.

HAICHAR, F. Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J. I.; PROSSER, J. I.; BALESSENT, J. & ACHOUAK, W.. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME journal**, 2(12), 1221. 2008.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; van TUINEN, D. & BERG, G.. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, 321(1-2), 235-257. 2009.

HARTMANN, T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: A case study in chemical ecology. **Planta**, 2004, 219, 1–4.

HILTNER, L. Ueber neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache. Arbeiten der **Deutschen Landwirtschaftliche Gesellschaft**, v. 98, p. 59–78, 1904

HODGES, C. F.; CAMPBELL, D. A.; CHRISTIANS, N. Potential biocontrol of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Bipolaris sorokiniana* on the phylloplane of *Poa pratensis* with strains of *Pseudomonas spp.* **Plant Pathology**, v. 43, n. 3, p. 500-506, 1994.

HOPKINS, R. J.; VAN DAM, N. M., VAN LOON, J. J. A. Role of Glucosinolates in Insect-plant relationships and multithopic Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 54, pp. 57 - 83, 2009.

HORNE, Maree. Inter-relationships between *Bipolaris sorokiniana* isolates involved in spot blotch, common root rot and black point in winter cereals. 2015. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Philosophy, Centre For Crop Health, University of Southern Queensland, Toowoomba, 2015.

HOTHORN, T., BRETZ, F., AG, P., WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences**, v. 50, n. 3, p. 346-363, 2008.

IZUMIKAWA, M., KAWAHARA, T., KAGAYA, N., YAMAMURA, H., HAYAKAWA, M., TAKAGI, M., SHIN-YA, K. Pyrrolidine-containing peptides, JBIR-126,-148, and-149, from *Streptomyces* sp. NBRC 111228. **Tetrahedron letters**, 56(39), 5333-5336, 2015.

JANGRA, M., KAUR, M., TAMBAT, R., RANA, R., MAURYA, S. K., KHATRI, N. Nandanwar, H. Tridecaptin M, a new variant discovered in mud bacterium, shows activity against colistin-and extremely drug-resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. e00338-19, 2019.

JIAO, S., XU, Y., ZHANG, J., HAO, X., LU, Y. Core microbiota in agricultural soils and their potential associations with nutrient cycling. **Applied and Environmental Science**, v. 4, n. 2, p. 1-16, 2019. DOI: 10.1128/mSystems.00313-18

JING, X., SANDERS, N. J., SHI, Y., CHU, H., CLASSEN, A. T., ZHAO, K., CHEN, L., SHI, Y., JIANG, Y., HE, J. S. The links between ecosystem multifunctionality and above- and belowground biodiversity are mediated by climate. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-8, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9159

JOLLÈS, P.; MUZZARELLI, R. A.. **Chitin and Chitinases**. Basel: Birkhäuser. ISBN 978-3-7643-5815-0, 1999.

JUHNKE, M. Elliott; MATHRE, D. E.; SANDS, D. C. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2793-2799, 1987.

JUTTNER, F. WATSON, S B. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4395-4406, 2007.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 79-85, 1959.

KODANI, S., HUDSON, M. E., DURRANT, M. C., BUTTNER, M. J., NODWELL, J. R., WILLEY, J. M. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(31), 11448-11453, 2004.

KODANI, S., SATO, K., HEMMI, H., & OHNISH-KAMEYAMA, M. Isolation and structural determination of a new hydrophobic peptide venepeptide from *Streptomyces venezuelae*. **The Journal of antibiotics**, 67(12), 839-842, 2014.

KOVANDA, L., ZHANG, W., WEI, X., LUO, J., WU, X., ATWILL, E. R., LIU, Y. In vitro antimicrobial activities of organic acids and their derivatives on several species of gram-negative and gram-positive bacteria. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3770, 2019.

KWAK, M. J., KONG, H. G., CHOI, K., KWON, S. K., SONG, J. Y., LEE, J., KIM, J. F. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. **Nature biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1100-1109, 2018.

KÖLJALG, U, NILSSON, H R, SCHIGEL, D. The taxon hypothesis paradigm - On the unambiguous detection and communication of taxa. **Microorganisms**, 8:12, 1-25, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8121910

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Eds) **Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics**, p. 115–147. John Wiley & Sons, Chichester, 1991.

LANGMEAD, B. e SALZBERG, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, 10:R25, 2009.

LAUTRU, S., DEETH, R. J., BAILEY, L. M., CHALLIS, G. L. (2005). Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. **Nature Chemical Biology**, 1(5), 265–269, 2005.

LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; LUNDBERG, D. S.; BREAKFIELD, N.; GEHRING, J.; MCDONALD, M. & DANGL, J. L.. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. **Science**, 349(6250), 860-864. 2015.

LEGENDRE, P., BORCARD, D., PERES-NETO, P. R. Analyzing beta diversity: Partitioning the spatial variation of community composition data. **Ecological Monographs**, 75, 435–450, 2005.

LETTICE, E. P. The rhizosphere: measuring the zone of interaction. **Annual Plant Reviews**, v. 2, p. 1-17, 2019. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0683

LIU, H.; BRETTELL, L.E. Plant Defense by VOC-Induced Microbial Priming. **Trends Plant Sci.** v. 24, pp.187–189, 2019.

LOURENÇO, K. S., SULEIMAN, A. K., PIJL, A., VAN VEEN, J. A., CANTARELLA, H., KURAMAE, E. E. Resilience of the resident soil microbiome to organic and inorganic amendment disturbances and to temporary bacterial invasion. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1186/s40168-018-0525-1

MALABARBA, A., PALLANZA, R., BERTI, M., & CAVALLERI, B. Synthesis and biological activity of some amide derivatives of the lantibiotic actagardine. **The Journal of antibiotics**, v. 43, n. 9, p. 1089-1097, 1990.

MASCARENHAS, H.A.A. Soja. In: RAIJ, B. van; SILVA, N.M. da; BATAGLIA, O.C.; QUAGGIO, J.A.; HIROCE, R.; CANTARELLA, H.; BELLINAZI JUNIOR, R.; DECHEN, A.R. TRANI, P.E. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas, Instituto Agrônômico, 1985. p.20. (**Boletim técnico**, 100).

MATUSINSKY, P.; FREI, P.; MIKOLASOVA, R.; et al. Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. **Crop Protection**, v. 29, p. 1325-1330, 2010.

MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1, p. 557-564, 2002.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M.. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; van der VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H. & RAAIJMAKERS, J. M.. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, 332(6033), 1097-1100. 2011.

MEYER, S. T., PTACNIK, R., HILLEBRAND, H., BESSLER, H., BUCHMANN, N. Biodiversity–multifunctionality relationships depend on identity and number of measured functions. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, p. 44-49, 2018. DOI: 10.1038/s41559-017-0391-4

MIKKOLA, R., ANDERSSON, M. A., GRIGORIEV, P., HEINONEN, M., SALKINOJA-SALONEN, M. S. The toxic mode of action of cyclic lipodepsipeptide fusaricidins, produced by *Paenibacillus polymyxa*, toward mammalian cells. **Journal of applied microbiology**, 123(2), 436-449, 2017.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª Edição. Editora da Universidade Federal de Lavras. 729 p., 2006.

NILSSON, R H, LARSSON, K H, TAYLOR, A F S, BENGTSSON-PALME, J, JEPPESEN, T S, SCHIGEL, D, KENNEDY, P, PIZARD, K, GLOCKNER, F O, TEDERSOO, L, SAAR, I, KÖLJALG, U, ABARENKOV, K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic Acids Research**, 47:1, 259-264, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky1022

NAKANO, C., FUNA, N., OHNISHI, Y., HORINOUCI, S. The O-methyltransferase SrsB catalyzes the decarboxylative methylation of alkylresorcylic acid during phenolic lipid biosynthesis by *Streptomyces griseus*. **Journal of bacteriology**, 194(6), 1544-1551, 2012.

NAYLOR, D., FANSLER, S., BRISLAW, C., NELSON, W. C., HOFMOCKEL, K. S., JANSSON, J. K., MCCLURE, R. Deconstructing the soil microbiome into reduced-complexity functional modules. **Applied and Environmental Science**, v. 11, n. 4, p. 1-19, 2020. DOI: 10.1128/mBio.01349-20

NEAL, A. L.; AHMAD, S.; GORDON-WEEKS, R. & TON, J.. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. **PloS one**, 7(4). 2012.

NILSSON, P., ÅKESSON, H., JANSSON, H. B., ODHAM, G. Production and release of the phytotoxin prehelminthosporol by *Bipolaris sorokiniana* during growth. **FEMS microbiology ecology**, v. 11, n. 2, p. 91-98, 1993.

NISHISAKA, C. S., QUEVEDO, H. D., MENDES, R. . Técnicas avançadas de biologia molecular no microbioma da soja. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. (Org.). **Bioinsumos na Cultura da Soja**. 1ed. Brasília DF: EMBRAPA, 2022, v. , p. 269-282.

NOTHIAS, L. F., PETRAS, D., SCHMID, R., DÜHRKOP, K., RAINER, J., SARVEPALLI, A., DORRESTEIN, P. C. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature methods**, v. 17, n. 9, p. 905-908, 2020.

OSSOWICKI, A., TRACANNA, V., PETRUS, M. L., VAN WEZEL, G., RAAIJMAKERS, J. M., MEDEMA, M. H., GARBEVA, P. Microbial and volatile profiling of soils suppressive to *Fusarium culmorum* of wheat. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1921, p. 20192527, 2020.

O'SULLIVAN, D. J.; O'GARA, F.. Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(4), 662-676, 1992.

PARADA, A.E.; NEEDHAM, D.M.; FUHRMAN, J.A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2015.

PARRY, D. W. The incidence of *Fusarium spp.* in stem bases of selected crops of winter wheat in the Midlands, UK. **Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 619-622, 1990.

PASCALE, A.; PROIETTI, S.; PANTELIDES, I. S.; STRINGLIS, I. A. Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion. **Frontier in Plant Science**, v. 10, n. 1741, p. 1-23, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2019.01741

PASSERA, A., VENTURINI, G., BATTELLI, G., CASATI, P., PENACA, F., QUAGLINO, F., & BIANCO, P. A. Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. **Microbiological Research**, v. 198, p. 16-26, 2017.

PÉREZ-JARAMILLO, J. E.; MENDES, R.; RAAIJMAKERS, J. M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 635-644, 2016. DOI: 10.1007/s11103-015-0337-7

PHUWAPRAISIRISAN, P., SAWANG, K., SIRIPONG, P., TIP-PYANG, S. Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 30, p. 5193-5195, 2007.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Avaliação de fungicidas no controle de doenças da parte aérea da cultura de cevada cervejeira – ensaio dos anos de 1999 e 2000. In: **REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA**, 21, 2001, Guarapuava. Anais... Passo Fundo, RS: EMBRAPA-Trigo, 2001. p. 521-530.

PORTER, S. S. & SACHS, J. L. Agriculture and the disruption of plant–microbial symbiosis. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 35, n. 5, p. 426-439, 2020. DOI: 10.1016/j.tree.2020.01.006

QUAST, C, PRUESSE, E, YILMAZ, P, GERKEN, J, SCHWEER, T, YARZA, P, PEPLIES, J, GLOCKNER, F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, 41:1, 590-596, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks1219

QUINCE, C.; LANZEN, A.; DAVENPORT, R.J.; TURNBAUGH, P.J. Removing Noise from Pyrosequenced Amplicons. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 38, 2011. DOI: 10.1186/1471-2105-12-38.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 341-361, 2009.

RAAIJMAKERS, J.; MAZZOLA, M. Soil immune responses. **Science**, v. 352, n. 6292, p. 1392-1393, 2016.

REIF, J. C., ZHANG, P., DREISIGACKER, S., WARBURTON, M. L., van GINKEL, M., HOISINGTON, D., MELCHINGER, A. E. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 5, p. 859-864, 2005.

REIS, E.M.; CASA, R.T.. Cereias de inverno (trigo, cevada, aveia, triticale) In: VALE, F.X.R.do; ZAMBOLIM, L. **Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas**, vol.1.Viçosa: UFV, 1997. p.231-287.

RODRIGUES, J. L., PELLIZARI, V. H., MUELLER, R., BAEK, K., JESUS, E. D. C., PAULA, F. S., NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.

ROMAGNOLI, E. M. & ANDREOTE, F. D.. Rizosfera. **Microbiologia do solo**, 1(2), 47-60. 2016.

ROSSMANN, M., PÉREZ-JARAMILLO, J. E., KAVAMURA, V. N., CHIARAMONTE, J. B., DUMACK, K., FIORE-DONNO, A. M., MAUHLIN, T. H. Multitrophic interactions in the rhizosphere microbiome of wheat: from bacteria and fungi to protists. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 4, p. f1aa032, 2020.

SAPP, M., PLOCH, S., FIORE-DONNO, A. M., BONKOWSKI, M., ROSE, L. E. Protists are an integral part of the Arabidopsis thaliana microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 30-43, 2018. DOI: 10.1111/1462-2920.13941

SCHEEREN, P. L.; CASTRO, R. L.; CAIERÃO, E. **Botânica, Morfologia e Descrição Fenológica**. In.: BOREM, A; SCHEEREN, P.L. (Eds) Trigo, do plantio à colheita. Viçosa: UFV, 2015. p. 36-55.

SCHEEREN, P. L., CAIERÃO, E., SILVA, M. S., DEL DUCA, L. D. J. A., NASCIMENTO JUNIOR, A. D., LINHARES, A. EICHELBERGER, L. BRS Guamirim: cultivar de trigo da classe pão, precoce e de baixa estatura. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, p. 293-296, 2007.

SCHILLING, C., CICCONE, R., SIEBER, V., & SCHMID, J.. Engineering of the 2, 3-butanediol pathway of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 381-388, 2020.

SCHMIDT, R.; DURLING, M. B.; DE JAGER, V.; MENEZES, R. C.; NORDKVIST, E.; SVATOŠ, A.; GARBEVA, P.. Deciphering the genome and secondary metabolome of the plant pathogen *Fusarium culmorum*. **FEMS microbiology ecology**, v. 94, n. 6, p. fiy078, 2018.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-69, 2014.

SONG, G. C., CHOI, H. K., & RYU, C. M. Gaseous 3-pentanol primes plant immunity against a bacterial speck pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. tomato via salicylic acid and jasmonic acid-dependent signaling pathways in *Arabidopsis*. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 821, 2015.

STELLER, S.; VATER, J.; J. Chromatogr., B: **Anal. Technol.** Biomed. Life Sci. 2000, 737, 267.

SUDHA, A., DURGADEVI, D., ARCHANA, S., MUTHUKUMAR, A., SUTHIN RAJ, T., NAKKEERAN, S., SAYYED, R. Z. Unraveling the tripartite interaction of volatile compounds of *Streptomyces rochei* with grain mold pathogens infecting sorghum. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 923360, 2022.

SUTHIPHASILP, V., RAKSAT, A., MANEERAT, T., HADSADEE, S., JUNGSUTTIWONG, S., PYNE, S. G., LAPHOOKHIEO, S. Cytotoxicity and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of Compounds Isolated from the Plant Pathogenic Fungus *Curvularia* sp. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 408, 2021. doi.org/10.3390/jof7060408

SOLA, M. C. ; FEISTEL, J. C.; OLIVEIRA, A. P.; REZENDE, C. S. Minafra e. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SWENSON, T.; NORTHEN, T.. Untargeted Soil Metabolomics Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. In: **Microbial Metabolomics**. Humana Press, New York, NY. p. 97-109, 2019.

TAKESAKO, K., KURODA, H., INOUE, T., HARUNA, F., YOSHIKAWA, Y., KATO, I., YAMAGUCHI, H. Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. **The Journal of antibiotics**, v. 46, n. 9, p. 1414-1420, 1993.

TERRA, L. R., QUEIROZ, S. C., TERAPO, D. & FERREIRA, M. M. Detection and discrimination of *Carica papaya* fungi through the analysis of volatile metabolites by gas chromatography and analysis of variance-principal component analysis. **Journal of Chemometrics**, p. e3244, 2020.

TINOCO, M. L. P. Silenciamento trans-específico in vivo entre fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides*. Dissertação. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2010.

TRAXLER, M. F., WATROUS, J. D., ALEXANDROV, T., DORRESTEIN, P. C., KOLTER, R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. **MBio**, 4(4), e00459-13, 2013.

TREMACOLDI, C. R.; SOUZA FILHO, A.D.S. Toxinas produzidas por fungos fitopatogênicos: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

TYAGI, T., AGARWAL, M. GC-MS analysis of invasive aquatic weed, *Pista Stratiotes* L. and *Eichhornia Crassipes* (Mart.) Solms. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 111, 2017

UENO, H.; MIYASHITA, K.; SAWADA, Y., OBA, Y. Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* species S-84. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 36, p. 377-392, 1990.

URREA, R.; CABEZAS, L.; SIERRA, R.; CÁRDENAS, M.; RESTREPO, S.; JIMÉNEZ, P.. Selection of antagonistic bacteria isolated from the *Physalis peruviana* rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 3, p. 707-716, 2011.

V. VANČURA, A. HANZLIKOVÁ. Root exudates of plants IV. Differences in chemical composition of seed and seedling exudates. **Plant and Soil**, 36 (1972), pp. 271-282.

VALADARES, R. B. S.; MESCOLOTTI, D. L. C.; CARDOSO, E. J. B. N.. Micorrizas. **Microbiologia do solo**, 1(2), 179-196. 2016.

von der WEID I, ALVIANO DS, SANTOS AL, SOARES RM, ALVIANO CS, SELDIN L: Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. **J Appl Microbiol**, 95:1143-1151, 2003.

WANG, C., WANG, Z., QIAO, X., LI, Z., LI, F., CHEN, M., CUI, H.. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. **FEMS microbiology letters**, v. 341, n. 1, p. 45-51, 2013.

WANG, M., CARVER, J. J., PHELAN, V. V., SANCHEZ, L. M., GARG, N., PENG, Y., BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WATVE, M. G.; TICKOO, R.; JOG, M. M.; BHOLE, B. D.. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. **Archives of microbiology**, 176(5), 386-390, 2001.

WELLER, D. M., RAAIJMAKERS, J. M., GARDENER, B. B. M., THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 309-348, 2002.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications** (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), p. 315–322. Academic Press, San Diego, California, 1990.

WICKHAM, H; CHANG, W; WICKHAM, M H. Package ‘ggplot2’. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. **Version**, v. 2, n. 1, p. 1-189, 2016.

WIECZOREK, Z., SIEMION, I. Z., BOLEWSKA-PEDYCZAK, E., WIELAND, T. Immunosuppressive activity in the series of cycloamanide peptides from mushrooms. **Peptides**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 1993.

XU, J., ZHANG, T., YAO, J., LU, J., LIU, Z., DING, L. Recent advances in chemistry and bioactivity of marine cyanobacteria *Moorea* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 201, p. 112473, 2020.

YAO, T.; YASMIN, S.; Y HAFEEZ, F. Potential role of rhizobacteria isolated from Northwestern China for enhancing wheat and oat yield. **The Journal of Agricultural Science**, v. 146, n. 1, p. 49, 2008.

YI, Y., SHAN, Y., LIU, S., YANG, Y., LIU, Y., YIN, Y., & LI, R. Antagonistic strain *Bacillus amyloliquefaciens* XZ34-1 for controlling *Bipolaris sorokiniana* and promoting growth in wheat. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1526, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111526>

YIN, J.; DENG, C. B.; WANG, X. F.; CHEN, G.; MIHUCZ, V. G.; XU, G. P.; DENG, Q. C. Effects of long-term application of vinasse on physicochemical properties, heavy metals content and microbial diversity in sugarcane field soil. **Sugar Tech**, v. 21, n. 1, p. 62-70, 2019. DOI: 10.1007/s12355-018-0630-2

ZAJIC, J. E., and W. SEFFENS. 1984. Biosurfactants. **Crit. Rev. Biotechnol.** 1:87–107.

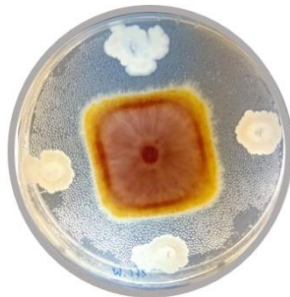
ZHANG, Zhongge; YUEN, Garry Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 90, n. 4, p. 384-389, 2000.

ANEXO

Inibição sobre *Fusarium* sp.



Pseudomonas sp.



Paenibacillus sp.



Streptomyces sp.



Controle